LILIAN CRISTINA RUSSO

**ANÁLISE MOLECULAR DA SECREÇÃO NÃO
CONVENCIONAL DA ENDO-OLIGOPEPTIDASE
EC 3.4.24.15 (EP24.15)**

Tese apresentada ao Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Doutor em Ciências
(Farmacologia).

São Paulo

2009

LILIAN CRISTINA RUSSO

**ANÁLISE MOLECULAR DA SECREÇÃO NÃO
CONVENCIONAL DA ENDO-OLIGOPEPTIDASE
EC 3.4.24.15 (EP24.15)**

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências (Farmacologia).

Área de Concentração: Farmacologia

Orientador: Emer Suavinho Ferro

Co-orientador: Cristóforo Scavone

São Paulo

2009

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

© reprodução total

Russo, Lilian Cristina.

Análise molecular da secreção não convencional da endo-oligopeptidase EC3.4.24.15 (EP24.15) / Lilian Cristina Russo. -- São Paulo, 2009.

Orientador: Emer Suavinho Ferro.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia Molecular. Linha de pesquisa: Metabolismo de peptídeos.

Versão do título para o inglês: Molecular analysis of the unconventional endo-oligopeptidase EC3.4.24.15 (EP 24.15) secretion .

Descritores: 1. Biologia 2. Biologia celular 3. Transporte biológico
4. Transporte através da membrana I. Ferro, Emer Suavinho II.
Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas.
Programa de Pós Graduação em Farmacologia III. Título.

ICB/SBIB0161/2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Lilian Cristina Russo.

Título da Tese: Análise molecular da secreção não convencional da endo-oligopeptidase EC3.4.24.15 (EP24.15) .

Orientador(a): Emer Suavinho Ferro.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

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) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **010** nas fls. **28** do livro **2** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de Cristóforo Scavone, Coordenador(a) da Linha de Pesquisa "**Análise molecular da secreção não convencional da endo-oligopeptidase EC 3.4.24.15(EP 24.15)**" do qual participou(aram) o(s) alunos **Lilian Cristina Russo e o pesquisador Emer Suavinho Ferro**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **23.03.2006**.

São Paulo, 23 de março de 2006.

Prof. Dra. Marília C.L. Seelaender
Coordenadora -CEEA - ICB/USP

Prof. Dra. Patrícia Castelucci
Secretária Suplente CEEA – ICB/USP

*A Deus por ter me criado
e capacitado a trabalhar*

*Aos meus pais, por
acreditarem em mim e me
apoiares nos momentos em
que mais precisei.*

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Emer Suavinho Ferro, pela tão valiosa orientação no desenvolvimento desse trabalho e por todas as oportunidades que me foram dadas. Nesses quatro anos, além de conhecimentos técnicos, aprendi a gostar de fazer “ciência de verdade”.

Ao Dr. Cristóforo Scavone, por todo auxílio e paciência, durante a co-orientação desse trabalho.

Ao Dr. Szulim Ber Zyngier mais uma vez, que me ensinou a gostar de fazer ciência. E pelo valioso ensino durante o programa PAE.

Aos técnicos Leandro Mantovani de Castro, Priscilla Sayami, Larissa Lima, Roberto Cabado e Sandra Regina da Silva pelo auxílio nas práticas de laboratório e preparo de material.

Ao Elcio, por me ajudar, escutar, ter paciência durante toda essa etapa... por ser tão importante em minha vida...

Aos amigos de laboratório Denise, Fernanda, Graciela, Leandro e Sayami, pelas discussões técnicas, mas mais pelos momentos de descontração, festas e pela ajuda em todos os momentos difíceis.

Aos colegas dos demais laboratórios dos departamentos de Farmacologia e de Biologia Celular e do Desenvolvimento. Alguns estiveram mais presentes durante essa etapa, mas todos fizeram parte dessa jornada e deram ajuda quando foi preciso.

Às secretárias do Departamento de Farmacologia, Julieta e Selma que sempre se mostraram dispostas a resolver os problemas que surgiam, e não foram poucos!

Às secretárias do departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, Ana Lúcia, Elizabeth, Celiana e Eloise, e aos demais técnicos, Fernanda, Cleuza, Edson, Emília, Gaspar e Marley, por toda ajuda dada quando precisei.

Ao pessoal da biblioteca, pelo auxílio e revisão das referências e formatação.

À agência CAPES, CNPq e FAPESP, pelo suporte financeiro, indispensável à realização deste trabalho.

Apesar de ter citado nome apenas de pessoas diretamente ligadas a esse trabalho, agradeço a todos que passaram pela minha vida e que, deixando alegrias ou mágoas, boas ou más recordações, ajudaram a formar a pessoa que sou hoje... sem todas essas experiências que passei, talvez não tivesse sido guiada até aqui!

*Existe uma coisa que uma longa
existência me ensinou: toda a nossa
ciência comparada à realidade é
primitiva e inocente; e, portanto, é o
que temos de mais valioso.*

Albert Einstein

RESUMO

RUSSO LC. **Análise molecular da secreção não convencional da endo-oligopeptidase EC 3.4.24.15 (EP24.15).** 2009. 147 f. Tese (Farmacologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

A thimet oligopeptidase (EC 3.4.25.15; EP24.15) foi originariamente descrita como uma enzima metabolizadora de neuropeptídeos, sendo altamente expressa nos testículos, cérebro, rins e tecidos neuroendócrinos. A EP24.15 não possui um peptídeo sinal para entrada na via secretória clássica, mas é secretada pelas células através de um mecanismo não-convencional. Nesse trabalho, identificamos uma nova interação cálcio-dependente entre EP24.15 e calmodulina I (CaM), que é importante para a secreção estimulada, mas não constitutiva, da EP24.15. Nós demonstramos que, *in vitro*, a EP24.15 e a CaM interagem fisicamente apenas na presença de Ca^{2+} , com um K_d estimado de 0,52 μM . A microscopia confocal confirmou que a EP24.15 co-localiza com a CaM no citosol de células 293 de rim embrionário humano (HEK293). Essa co-localização aumenta consideravelmente quando as células são tratadas com o ionóforo de cálcio A23187 ou com o ativador da proteína quinase A (PKA), forskolin. A superexpressão da CaM em células HEK293 é suficiente para aumentar a secreção estimulada da EP24.15, podendo ser inibida pelo inibidor da CaM calmidazolium. O inibidor específico da PKA, KT5720 reduz a secreção estimulada de EP24.15 e inibe o efeito sinérgico entre forskolin e A23187. O tratamento das células HEK293 com KT5720 e calmidazolium praticamente aboliu o efeito estimulatório do A23187 sobre a secreção da EP24.15. Juntos, esses dados sugerem que a interação entre EP24.15 e calmodulina é regulada e relevante para a secreção estimulada da EP24.15 em células HEK293. Surpreendentemente, experimentos com *slices* (fatias) de cérebros de ratos sugerem que, fisiologicamente, a EP24.15 é secretada predominantemente de forma constitutiva, embora o tratamento com A23187 e forskolin sejam capazes de aumentar modestamente a secreção dessa enzima nessas preparações. Em conclusão, esse trabalho demonstra de forma original a interação entre EP24.15 e CaM e suas implicações funcionais no processo secretório não convencional. No cérebro, a EP24.15 parece ser secretada constitutivamente, no entanto, as implicações funcionais desse processo ainda precisam ser investigadas.

Palavras-chave: Calmodulina. Proteína quinase A. Thimet oligopeptidase. 14-3-3 ϵ . Secreção não-convencional. Interação proteína-proteína.

ABSTRACT

RUSO LC. **Molecular analysis of the unconventional endo-oligopeptidase EC3.4.24.15 (EP24.15) secretion.** 2009. 147 p. Thesis (Pharmacology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Thimet oligopeptidase (EC3.4.24.15; EP24.15) was originally described as a neuropeptide-metabolising enzyme that is highly expressed in the brain, kidneys and neuroendocrine tissue. EP24.15 lacks a typical signal-peptide sequence for entry into the secretory pathway and is secreted by cells via an unconventional and unknown mechanism. Here, we identify a novel calcium-dependent interaction between EP24.15 and calmodulin I (CaM) that is important for the stimulated, but not constitutive, secretion of EP24.15. We demonstrate that in vitro, EP24.15 and CaM physically interact only in the presence of Ca^{2+} with an estimated K_d of 0.52 μM . Confocal microscopy confirmed that EP24.15 co-localises with CaM in the cytosol of resting HEK293 cells. This co-localisation markedly increases when cells are treated with either the calcium ionophore A23187 or the protein kinase A activator forskolin. Overexpression of CaM in HEK293 cells is sufficient to greatly increase the A23187-stimulated secretion of EP24.15, which can be inhibited by the CaM inhibitor calmidazolium. The specific inhibition of PKA with KT5720 reduced the A23187-stimulated secretion of EP24.15 and inhibited the synergistic effects of forskolin with A23187. Treatment with calmidazolium and KT5720 nearly abolished the stimulatory effects of A23187 on EP24.15 secretion. Together, these data suggest that the interaction between EP24.15 and calmodulin is regulated within cells and is important for the stimulated secretion of EP24.15 from HEK293 cells. Surprisingly, the rat's brain *slices* experiments showed that, physiological, EP24.15 has a constitutive secretion, although the A23187 and forskolin treatment are able to increase a little this enzyme secretion in these preparations. In conclusion, this work demonstrates, of original form, that interaction between EP24.15 and CaM and its function implications in the no conventional secretory process. In the brain, the EP24.15 seems to be constitutively secretion, although, the functional implications of this process still needs to be investigated.

Key words: Calmodulin. Protein kinase A. Thimet oligopeptidase. 14-3-3 ϵ . Unconventional secretion. Protein-protein interaction.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estrutura cristalográfica da EC 3.4.24.15 (EP24.15)	21
Figura 2. Possíveis conformações da CaM	23
Figura 3. Estrutura cristalográfica das proteínas 14-3-3	25
Figura 4. Resumo esquemático da análise da secreção da EP24.15 em <i>slices</i> de cérebros de ratos	39
Figura 5. Esquema dos vetores plasmidiais utilizados	43
Figura 6. Resumo esquemático dos experimentos de interação protéica (“binding”) <i>in vitro</i>	53
Figura 7. Resumo esquemático: ressonância plasmônica de superfície (RPS)	55
Figura 8. Controle da atividade do glutamato em <i>slices</i> de cérebros de ratos	69
Figura 9: Secreção de EP24.15 em <i>slices</i> de cerebelo de rato em tampão aCFS	70
Figura 10: Secreção de EP24.15 em <i>slices</i> de cerebelos de ratos em tampão aCFS acrescido de glicina e sem Mg^{2+}	71
Figura 11: Secreção de EP24.15 em <i>slices</i> de cérebros de ratos com retirada de córtex e cerebelos, em tampão aCFS acrescido de glicina e sem Mg^{2+}	72
Figura 12: Secreção estimulada com A23187 e forskolin de EP24.15 em <i>slices</i> de cerebelos de ratos em tampão aCFS	73
Figura 13. Sequenciamento <i>sense</i> do plasmídeo p-GEX-4T-2 sub-clonado com cDNA codificante para CaM	74
Figura 14. Sequenciamento <i>anti-sense</i> do plasmídeo p-Shooter sub-clonado com cDNA codificante para CaM	74
Figura 15. Purificação de proteínas	75
Figura 16. Interação física entre EP24.15 e CaM (<i>binding in vitro</i>)	77
Figura 17. Sensorgrama do processo de imobilização da CaM no <i>sensor chip</i> CM5	79

Figura 18. Sensorgrama de interação entre EP24.15 e CaM através de ressonância plasmônica de superfície	80
Figura 19. Análise da secreção da EP24.15 estimulada com diferentes concentrações de A23187	81
Figura 20. Quantificação do cálcio intracelular citosólico em células HEK293 tratadas com A23187	83
Figura 21. Eficiência de transfecção com o uso do lipossoma HEKfectin®	84
Figura 22. Superexpressão da EP24.15 em células transfectadas transitoriamente	85
Figura 23. Superexpressão da CaM em células transfectadas transitoriamente	86
Figura 24. Secreção estimulada da EP24.15	88
Figura 25. CaM e a secreção estimulada da EP24.15	89
Figura 26. Co-localização da EP24.15 e CaM em células HEK293	92
Figura 27. Aumento de cálcio intracelular causa aumento da co-localização entre EP24.15 e CaM	93
Figura 28. Microscopia de fluorescência: controle da imunocitoquímica de células HEK293 para CaM e EP24.15	94
Figura 29. Descrição da propensão de sítios de ligação da CaM na estrutura da EP24.15 ..	95

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

14-3-3 ϵ – isoforma ϵ da proteína 14-3-3

aCFS – fluido cérebro-espinhal artificial

BSA – albumina sérica bovina

Ca²⁺-CaM – cálcio-calmodulina

CaM – calmodulina I

cAMP – AMP cíclico

CMZ – calmidazolium

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium

DEPC – dietil-piromcarbonato

DNA – ácido desoxirribonucléico

EP24.15 – endopeptidase 24.15 (EC3.4.24.15)

EP24.16 – endopeptidase 24.16 (EC 3.4.24.16)

GST – glutathione-S-transferase

HEK293 – rim embrionário humano 293

K_d – constante de dissociação

LB - Lennox L broth base

MTT – 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazoliumbromide

NMDA – N-metil-D-aspartato

NMWL – limite nominal de massa molecular relativa

PB – tampão fosfato de sódio

PBS – tampão fosfato-salina

PCR – reação de polimerização em cadeia

pGEX – vetor plasmidial contendo o gene de interesse fusionado a glutathione S-transferase

PKA – proteína quinase A

pShooter – vetor plasmidial pCMV/myc/ER contendo o gene de interesse fusionado à proteína myc, modificado para abolir qualquer endereçamento ao retículo endoplasmático

RER – retículo endoplasmático rugoso

RNA – ácido ribonucléico

RPS – ressonância plasmônica de superfície

RT – transcrição reversa

RU – unidades relativas de ressonância

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

SFB – soro fetal bovino

slices – fatias de 350 μm^3 de cérebros de ratos

SRP – partícula de reconhecimento de sinal

TBS – tampão tris-salina

TPBS – tampão fosfato-salina acrescido de 0,1% de tween 20

TTBS – tampão tris-salina acrescido de 0,1% de tween 20

UAF – unidades arbitrárias de fluorescência

QFS – substrato de fluorescência apagada (Abz-GGFLRRV-NH₂-EDDnp)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Peptidases	19
1.2 Endo-oligopeptidase EC 3.4.24.15 (EP24.15)	20
1.3 Calmodulina	23
1.4 Proteínas 14-3-3	24
1.5 Via clássica de secreção protéica	26
1.6 Vias não clássicas de secreção protéica	27
1.7 Secreção não convencional da EP24.15	31
3 MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1 Animais	37
3.2 Análise da secreção da EP24.15 em diferentes regiões cerebrais através de slices	37
<i>3.2.1 Determinação da atividade enzimática da EP24.15 para tecido.....</i>	<i>39</i>
<i>3.2.2 Controle de morte celular pelo método do MTT</i>	<i>40</i>
<i>3.2.3 Controle do glutamato por dosagem de sódio-potássio ATPase</i>	<i>41</i>
3.3 Construções dos plasmídeos contendo cDNA codificante para as proteínas EP24.15, CaM ou 14-3-3.....	42
<i>3.3.1 Vetores.....</i>	<i>42</i>
<i>3.3.2 Subclonagem nos vetores pGEX e pShooter</i>	<i>44</i>
<i>3.3.2.1 Extração de RNAs.....</i>	<i>44</i>
<i>3.3.2.2 Reações de RT</i>	<i>45</i>
<i>3.3.2.3 PCR.....</i>	<i>45</i>
<i>3.3.2.4 Purificação de DNA</i>	<i>46</i>
<i>3.3.2.5 Reações de digestão e ligação.....</i>	<i>46</i>

3.3.3 Sequenciamento nos vetores pGEX e pShooter.....	46
3.3.3.1 Eletroporação de bactérias e plaqueamento em Agar.....	47
3.3.3.2 PCR de colônia.....	47
3.3.3.3 Reação de sequenciamento.....	48
3.3.3.4 Precipitação do sequenciamento e leitura em aparelho Megabace.....	48
3.3.3.5 Análise dos sequenciamentos	49
3.4 Expressão de proteínas recombinantes em sistema procarionte e posterior purificação por cromatografia de afinidade	49
3.4.1 Bactérias.....	49
3.4.2 Expressão de proteínas.....	49
3.4.3 Purificação de proteínas.....	50
3.5 Interação física (“binding”) in vitro	51
3.5.1 Western blot	53
3.6 Interação física CaM-EP24.15 por ressonância plasmônica de superfície (RPS)	54
3.7 Cultura de células	57
3.8 Secreção estimulada da EP24.15 sob diferentes concentrações de A23187.....	57
3.8.1 Determinação da atividade enzimática para EP24.15	58
3.9 Quantificação do Ca²⁺ intracelular	59
3.10 Isolamento do DNA plasmidial para transfecção (Maxiprep)	60
3.11 Transfecções.....	60
3.11.1 Controle da eficiência de transfecção.....	61
3.11.2 Controle da superexpressão das proteínas estudadas	61
3.11.2.1 Preparo dos extratos celulares.....	61
3.11.2.2 Superexpressão da EP24.15.....	62
3.11.2.3 Superexpressão da CaM.....	62

3.12 Análise da secreção da EP24.15 em cultura de células submetidas a diversos tratamentos	63
3.12.1 Viabilidade celular.....	64
3.12.1.1 Viabilidade celular por exclusão de azul de Trypan.....	64
3.12.1.2 MTT	65
3.13 Análise imunocitoquímica da co-localização EP24.15-CaM em células HEK293 através de microscopia confocal de varredura a laser	65
3.14 Análises Estatísticas.....	66
3.15 Modelagem dos sítios de interação entre CaM e EP24.15.	66
4 RESULTADOS	68
4.1 Análise da secreção da EP24.15 em diferentes regiões cerebrais através de slices	68
4.3 Purificação de proteínas.....	75
4.4 Ensaio de interação física (binding) in vitro	76
4.5 Interação física entre CaM e EP24.15 medida através de ressonância plasmônica de superfície (RPS)	78
4.6 Análise da secreção estimulada da EP24.15.....	81
4.7 Quantificação do Ca²⁺ intracelular	82
4.8 Controle da eficiência de transfecção	84
4.9 Controle da superexpressão das proteínas estudadas.....	85
4.10 Análise da secreção da EP24.15 em células HEK293 transfectadas e submetidas a diversos tratamentos	86
4.12 Modelagem dos sítios de interação da CaM na EP24.15	94
5 DISCUSSÃO	96
6 CONCLUSÃO.....	106
REFERÊNCIAS	107
ANEXOS	122

1 INTRODUÇÃO

O estudo de peptídeos começou a despertar o interesse de farmacologistas apenas em 1931, quando Euler e Gadun descobriram a substância P, o primeiro neurotransmissor peptídico, relacionado à passagem do estímulo nociceptivo da periferia para a medula e estruturas altas (HARRISON e GEPPETTI, 2001). Mas foi em 1953, quando du Vigneaud ganhou o Prêmio Nobel ao estabelecer a estrutura e o processo de síntese da ocitocina (primeiro mediador peptídico a ser caracterizado e sintetizado comercialmente) que a verdadeira importância aos peptídeos foi dada. Historicamente, esse fato tardio é decorrente de duas razões. A primeira, é que o estudo farmacológico remonta à época em que foi iniciada a análise das ações de produtos naturais, principalmente vegetais, que em sua grande maioria não eram compostos peptídicos. A segunda, é que o estudo dos peptídeos só pôde começar a ser realizado em maior escala com o desenvolvimento de tecnologias modernas e práticas de biologia e farmacologia molecular.

Os peptídeos que são secretados normalmente por células, atuam como sinalizadores de receptores da membrana plasmática. Nesse caso, eles podem ser neurotransmissores e mediadores neuroendócrinos, hormônios de fontes não-neurais (angiotensina, bradicinina, insulina, endotelina, peptídeo natriurético atrial, leptina), fatores de crescimento e mediadores do sistema imune (citocinas e quimiocinas) (RANG *et al.*, 2004).

A thimet-oligopeptidase (EC 3.4.24.15; EP24.15) é uma enzima envolvida no metabolismo de oligopeptídeos contendo entre 5 e 17 aminoácidos, tanto no meio extracelular (FERRO *et al.*, 1999), como no meio intracelular (BERTI *et al.*, 2009). Essa enzima é responsável por degradar neuropeptídeos como a bradicinina, neurotensina, angiotensina I, GnRH, somatostatina (ORLOWSKI *et al.*, 1983; CHU e ORLOWSKI, 1985), além de dinorfinas e encefalinas (RIOLI *et al.*, 1998). Um fato interessante com relação ao papel da EP24.15 no metabolismo de neuropeptídeos no meio extracelular é sua via de secreção, já que trata-se de proteína desprovida de região hidrofóbica para inserção em membranas biológicas, bem como de peptídeo

sinal para entrada na via secretória convencional. Dessa maneira, a secreção da EP24.15 parece ocorrer através de uma via secretória não convencional, ou alternativa, que depende da interação com a proteína 14-3-3 ϵ , como demonstrado pelo nosso laboratório (CARRENO *et al.*, 2005). Ensaio de duplo híbrido sugeriram que a EP24.15 poderia interagir também com a calmodulina I (GOÑI, C.N e FERRO, E.S., dados não publicados). Assim, a exemplo do conduzido por para a 14-3-3 ϵ (CARRENO *et al.*, 2005), ao longo desse trabalho procuramos caracterizar o possível envolvimento da calmodulina I na secreção não convencional da EP24.15. A CaM foi clonada e superexpressa em células HEK293 para avaliarmos o seu envolvimento na secreção da EP24.15. Além disso, para uma melhor caracterização do envolvimento dessa enzima no metabolismo extracelular de neuropeptídeos no encéfalo, avaliamos a secreção da EP24.15 a partir de fatias (*slices*) obtidas de diferentes regiões do cérebro de ratos.

1.1 Peptidases

Peptídeos são produzidos pelas células a partir de proteínas sintetizadas especificamente para esta finalidade, ou como subprodutos do metabolismo protéico. Muitos dos produtos formados no primeiro caso são conhecidos agentes moduladores da comunicação celular (neuropeptídeos, hormônios peptídicos) e contribuem assim para a manutenção da homeostase de organismos vivos. No segundo caso, em compartimentos outros que não aqueles especializados em degradação protéica, mecanismos celulares específicos induzem proteínas à digestão limitada, gerando peptídeos intermediários. Uma vez liberadas no meio extracelular, as moléculas de neuropeptídeos interagem com receptores específicos. Muitos desses receptores são metabotrópicos, acoplados a proteínas G, e ativam a formação de segundos mensageiros (BERTHOLD e BARTFAI, 1997). A inativação de neuropeptídeos se dá por mecanismo de degradação enzimática. De um modo geral, as enzimas que participam desse processo são exopeptidases (amino ou carboxipeptidases) ou

endopeptidases. As enzimas envolvidas na síntese e metabolismo de neuropeptídeos, bem como os locais onde esse processo ocorre, são bem conhecidas e sua manipulação tem importante impacto terapêutico.

No decorrer das últimas décadas, várias peptidases endógenas foram isoladas e caracterizadas como metabolizadoras de neuropeptídeos no meio extracelular (BARRETT *et al.*, 1998; FERRO *et al.*, 1999) o que é um pré-requisito essencial para que possamos associá-las ao metabolismo fisiológico de neuropeptídeos.

1.2 Endo-oligopeptidase EC3.4.24.15 (EP24.15)

A endopeptidase 24.15, também conhecida como thimet-oligopeptidase (E.C. 3.4.24.15; EP24.15) é uma metaloendopeptidase que pertence à família M3 de metalopeptidases (RAWLINGS e BARRETT, 1995). A EP24.15 é amplamente distribuída em mamíferos, sendo os maiores níveis de atividade enzimática encontrados no testículo, cérebro e hipófise (CHU e ORLOWSKI, 1985). A EP24.15 possui uma restrição por substratos oligopeptídicos de 5 a 17 resíduos de aminoácidos, tendo preferência por clivar ligações peptídicas no C-terminal de aminoácidos hidrofóbicos, não sendo capaz de hidrolisar proteínas (CAMARGO *et al.*, 1997; OLIVEIRA *et al.*, 2001).

A EP24.15 foi primariamente isolada da fração citosólica do homogenato do cérebro de ratos por Orłowski *et al.* (1983), como sendo uma metalopeptidase ativa em pH neutro, inibida por quelantes de cátions bivalentes. A inibição provocada pela remoção do metal do sítio catalítico com quelantes pode ser revertida pela adição de zinco, mesmo em baixas concentrações (TISLJAR e BARRETT, 1990). A presença de Zn^{+2} em seu sítio catalítico foi determinada por espectroscopia de absorção atômica (TISLJAR e BARRETT, 1990).

A estrutura cristalográfica dessa enzima foi determinada por difração de raios-X (BROWN *et al.*, 2001; RAY *et al.*, 2004), apresentando domínios compostos predominantemente por estruturas α -hélice, sendo que entre esses dois domínios forma-se um “canal profundo” onde o sítio ativo fica localizado (Figura 1). Através de mutações sítio dirigidas, foi elucidado quais eram os resíduos responsáveis pela coordenação do zinco no sítio ativo ($H^{473}ExxH^{477}$), mostrando ainda que, além das histidinas, há um terceiro ligante do zinco, o ácido glutâmico 502 (E502). A observação deste terceiro ligante de zinco a aproximadamente 25 resíduos de aminoácido do motivo “HEXXH” é uma característica dessa família de metalopeptidases (CUMMINS *et al.*, 1999).

Outra característica da EP24.15 é sua sensibilidade a compostos thióis. A adição de dithiotrietol (0,5 mM) ativa a enzima por romper pontes dissulfeto intermoleculares (SHRIMPTON *et al.*, 1997), mas não pela participação de cisteínas na catálise, como sugerido anteriormente (GOMES *et al.*, 1993). A ruptura destas interações intermoleculares permite que a enzima permaneça na forma monomérica tendo o substrato livre acesso ao centro catalítico (SHRIMPTON *et al.*, 1997). Uma vez que inibidores naturais da enzima não foram descobertos, a diferença entre o potencial redox do meio extracelular e intracelular pode ser o modo pelo qual a atividade da EP24.15 é regulada (SHRIMPTON *et al.*, 2002).

Figura 1 - Estrutura cristalográfica da E.C.3.4.24.15 (EP24.15). Endopeptidase responsável pela hidrólise de oligopeptídeos contendo entre 5 e 17 resíduos de aminoácidos. Possui um íon metálico de Zn^{2+} (zinco) no centro ativo (RAY *et al.*, 2004).

Desde que a EP24.15 foi isolada (ORLOWSKI *et al.*, 1983), acredita-se ela que participe do metabolismo e/ou processamento de uma série de neuropeptídeos. Entre os neuropeptídeos clivados por esta enzima estão a bradicinina (SANDEN *et al.*, 2008), a neurotensina (VINCENT *et al.*, 1997), o hormônio liberador de gonadotrofinas (WU *et al.*, 2009), a somatostatina e a angiotensina I (convertida a angiotensina 1-7) (CHAPPELL *et al.*, 2000; SHRIMPTON *et al.*, 2002) e II (SUGIURA *et al.*, 1992; MCKIE *et al.*, 1993). Foi demonstrado ainda que a EP24.15 é capaz de gerar encefalinas a partir de precursores opióides intermediários (CHU e ORLOWSKI, 1985). Essa enzima também interage fortemente com os receptores AT1 e B2 (receptores de angiotensina II e bradicinina, respectivamente) (SHIVAKUMAR *et al.*, 2005). Por estas razões a EP24.15 tem sido correlacionada a diversos processos fisiológicos. Dentre eles, a percepção de dor (MOLINEAUX e AYALA, 1990; KEST *et al.*, 1991; KEST *et al.*, 1992), a homeostase cardiovascular e renal (ORLOWSKI *et al.*, 1983; CARDOZO e ORLOWSKI, 1993; TELFORD *et al.*, 1995) e a reprodução (PIEROTTI *et al.*, 1991; LEW *et al.*, 1997; WU *et al.*, 1997; SMITH, SHRIMPTON *et al.*, 2000).

Embora a EP24.15 seja secretada, sua presença em vesículas secretórias contendo o marcador β -endorfina não foi observada, bem como o *time-course* de sua secreção foi demonstrado ser distinto daquele descrito para os neuropeptídeos. Mostrou-se então que a secreção da EP24.15 ocorre por um mecanismo secretório alternativo, mas que depende da integridade da via secretória convencional (FERRO *et al.*, 1999; GARRIDO *et al.*, 1999).

Apesar de ter sido descrita como uma processadora de neuropeptídeos, as evidências experimentais acumuladas ao longo dos últimos anos mostram que a maior quantidade de EP24.15 concentra-se no meio intracelular, mais especificamente no citoplasma e no núcleo das células (FONTENELE-NETO *et al.*, 2001). Assim, é muito provável que além das funções já descritas, a EP24.15 participe de processos intracelulares. De fato, diversos trabalhos associam a peptidase em questão à apresentação de antígenos pelas moléculas do MHC de classe I (PORTARO *et al.*, 1999; SILVA *et al.*, 1999; KIM *et al.*, 2003; YORK *et al.*, 2003).

1.3 Calmodulina

A calmodulina (CaM) pertence à superfamília da troponina C, e está altamente conservada em muitos diferentes tipos de células e espécies (COLLINS *et al.*, 1973). É pequena, formada por 148 aminoácidos (16.7 kDa), ácida (ponto isoelétrico 4) e relativamente estável. Existe em pelo menos duas conformações diferentes: apocalmodulina, quando ela não está ligada ao Ca^{2+} , e Ca^{2+} -CaM, onde faz 4 ligações iônicas com o Ca^{2+} por molécula, mudando sua conformação drasticamente (Figura 2). Sendo assim, a CaM pode existir potencialmente em 16 conformações: apocalmodulina, ou com 1, 2, 3 ou 4 ligações com o Ca^{2+} , variando as posições nos 4 sítios de ligações. (JURADO *et al.*, 1999). Também possui duas dobras maiores, cada uma contendo 2 ligações (ou menos) com o Ca^{2+} , sendo separadas por uma hélice central (HERZBERG e JAMES, 1985).

Figura 2 – Possíveis conformações da CaM. À esquerda: Ca^{2+} -CaM, e à direita, apocalmodulina (JURADO *et al.*, 1999).

De modo geral, a CaM é envolvida na regulação de diversos processos celulares, como a agregação plaquetária, interação célula-célula, proliferação celular, contração do músculo liso e secreção glandular (JURADO *et al.*, 1999).

A CaM também é vista envolvida na exocitose, e relacionada à reciclagem vesicular (SAKABA e NEHER, 2001). Seu motivo chamado de IQ-motif, com a sequência de aminoácidos IQxxxRGxxxR possui propriedade anfipática, podendo se ligar com miosinas não-convencionais, canais iônicos, proteínas envolvidas no crescimento axonal e metabolismo enzimático (BAHLER e RHOADS, 2002). Juntando-se a isso, também é sabido que Ca^{+2} -CaM, induz grande aumento no raio dos poros de fusão quando do aumento dos níveis de cálcio intracelular (PETERS *et al.*, 2001; BAYER *et al.*, 2003).

1.4 Proteínas 14-3-3

As proteínas 14-3-3 constituem uma família de moléculas altamente conservadas, que se apresentam na forma de homo ou heterodímeros, e estão presentes em todas as células eucarióticas (AITKEN *et al.*, 1992; BRUNET *et al.*, 2002). A designação 14-3-3 decorre da combinação do número encontrado na fração cromatográfica obtida com DEAE-celulose e a migração eletroforética destas proteínas (FU *et al.*, 2000). Devido a sua importância nas vias de transdução de sinal que controlam os pontos de checagem no ciclo celular, ativação de *mitogen activated protein* (MAP) quinases, apoptose, expressão gênica, tráfego de vesículas e exocitose, as proteínas da família 14-3-3 são alvo de grande interesse (YAFFE, 2002). Em mamíferos, estas proteínas ácidas de aproximadamente 30 KDa aparecem na forma de 7 isoformas diferentes: β , γ , ϵ , ζ , τ , η e σ (Figura 3). As isoformas α e δ são encontradas como sendo as formas β e ζ respectivamente (AITKEN *et al.*, 1995). Acreditava-se que a diversidade de isoformas de proteínas 14-3-3 pudesse ter relação

com a especificidade por ligantes, no entanto, apenas parte dos ligantes mostra maior afinidade por uma ou outra isoforma determinada (YAFFE *et al.*, 1997).

Antes de serem encontradas em uma grande variedade de células e tecidos, incluindo testículos, fígado e coração, foram localizadas de forma abundante em neurônios (FU *et al.*, 2000; BAXTER *et al.*, 2002). A distribuição sub-celular mostra essas proteínas tanto na forma citoplasmática quanto associadas às membranas; algumas isoformas expressas no cérebro podem ser encontradas ligadas à membrana plasmática de vesículas sinápticas (JONES *et al.*, 1995).

Figura 3 – Estrutura cristalográfica das proteínas 14-3-3. Como exemplos, as isoformas epsilon, à esquerda, e zeta, à direita.

Apesar de já terem sido identificadas interações com mais de 100 distintas proteínas, a real função das interações e os mecanismos moleculares que indicariam como as proteínas 14-3-3 atuam nestas interações permanecem desconhecidas (BRUNET *et al.*, 2002; YAFFE, 2002; MACKINTOSH, 2004). Algumas 14-3-3 funcionariam como moléculas adaptadoras (*scaffolds*, ou *hubs*) em um grande número de processos, e desta forma poderiam também alterar a localização sub-celular de seus ligantes, como ocorre na regulação do ciclo celular e prevenção de apoptose, em que as proteínas 14-3-3 exercem um controle na distribuição nuclear e citoplasmática de moléculas sinalizadoras com as quais interagem (VAN HEMERT *et al.*, 2001; BRUNET *et al.*, 2002). Além disso, as proteínas 14-3-3 estão, em alguns casos,

diretamente envolvidas na regulação da atividade de enzimas (VAN HEMERT *et al.*, 2001). Embora as 14-3-3 sejam encontradas preferencialmente no citoplasma das células, diversos de seus ligantes encontram-se desempenhando suas funções no núcleo (BRUNET *et al.*, 2002).

Uma característica interessante das proteínas 14-3-3 é a habilidade de se ligarem a uma variedade muito grande de proteínas envolvidas com a via de sinalização incluindo quinases, fosfatases e receptores de membrana (COUVE *et al.*, 2001). Em células cromafins permeabilizadas, o estímulo para exocitose dependente de cálcio mediado pela 14-3-3 é aumentado pela ativação da proteína quinase C (MORGAN e BURGOYNE, 1992a; b). Isto pode, em parte, explicar como as proteínas 14-3-3, uma vez solúveis, aparecem intimamente e seletivamente associadas com membranas sinápticas no sistema nervoso central (MARTIN *et al.*, 1994; JONES *et al.*, 1995; BAXTER *et al.*, 2002). As proteínas da família 14-3-3 estão envolvidas em uma diversidade enorme de processos biológicos (BRUNET *et al.*, 2002) que incluem organização espacial da sinalização celular (MOORE e PEREZ, 1967) e a modulação do tráfego vesicular e exocitose (MORRISON, 1994; CHAMBERLAIN *et al.*, 1995; ROTH *et al.*, 1999). A proteína 14-3-3 liga tanto resíduos protéicos como peptídeos fosforilados e não fosforilados, sendo que a fosforilação na proteína alvo resulta em uma regulação positiva na ligação com a 14-3-3 (MASTERS *et al.*, 1999; WANG *et al.*, 1999; MILS *et al.*, 2000).

1.5 Via clássica de secreção protéica

A secreção de proteínas pela via clássica ocorre através da compartimentação destas em vesículas de secreção. Esse processo tem início no citoplasma durante a biossíntese de peptídeos a partir da tradução de seus RNAs mensageiros no retículo endoplasmático rugoso (RER). A primeira porção traduzida nessas proteínas secretadas pela via clássica é uma sequência amino-terminal, denominada sequência sinal, ou peptídeo sinal, responsável pelo endereçamento do peptídeo nascente ao RER

(BLOBEL e DOBBERSTEIN, 1975). A sequência sinal da proteína nascente se liga a uma ribonucleoproteína citoplasmática, denominada partícula de reconhecimento do sinal (*signal recognition particle*, SRP). A síntese protéica cessa temporariamente sendo reiniciada após a ligação da SRP ao seu receptor localizado na superfície do RER. A proteína nascente passa então diretamente para o lúmen do RER através do canal translocacional que é formado pela ligação do ribossomo ao RER (RAPOPORT, 2007). Terminada a tradução da proteína pelos ribossomos, a sequência sinal é removida, na maioria dos casos, pela ação proteolítica da peptidase sinal.

A adição de oligossacárides N-ligados logo após ou durante a síntese do pré-pró-peptídeo parece ser, junto a fatores conformacionais, importante para sinalizar o transporte do pró-peptídeo do RER para o complexo de Golgi (BURGESS e KELLY, 1987; SHIELDS, 1991; SAKAGUCHI, 1997). Durante a passagem pelos compartimentos do complexo de Golgi os pró-peptídeos podem ser modificados pela maturação dos oligossacárides N-ligados, adição de cadeias de açúcar O-ligadas, fosforilação de resíduos específicos de serina/treonina e sulfatação de resíduos específicos de tirosina (HUTTNER, 1988). Em uma região posterior ao complexo de Golgi, denominada rede trans-Golgi, outros sinais intramoleculares específicos, além de um gradiente de pH (TOOZE *et al.*, 1991), parecem direcionar as proteínas para compartimentos celulares específicos. Por exemplo, proteínas contendo manose-6-fostato são segregadas para os lisossomos (SHIELDS, 1991). As proteínas que não foram direcionadas para os lisossomos, nem se associaram a esses compartimentos, são armazenadas em vesículas e posteriormente inseridas na membrana plasmática ou secretadas.

1.6 Vias não clássicas de secreção protéica

Diversos estudos têm demonstrado que células eucariontes secretam uma série de proteínas importantes fisiologicamente que não possuem um peptídeo sinal de reconhecimento pela SRP (MUESCH *et al.*, 1990; MIGNATTI e RIFKIN, 1991).

Muitas das conhecidas proteínas secretadas de forma não convencional são citocinas, fatores de crescimento, ou outras moléculas com importante papel na sinalização de processos como inflamação, angiogênese, diferenciação celular ou proliferação (NICKEL e SEEDORF, 2008). Como exemplos, podem ser mencionados interleucina 1- β (RUBARTELLI *et al.*, 1990; SIDERS e MIZEL, 1995), interleucina 1- α (PRUDOVSKY *et al.*, 2003), FGF-1 (PRUDOVSKY *et al.*, 2003), FGF-2 (FLORKIEWICZ *et al.*, 1995; ZEHE *et al.*, 2006), tioredoxina (RUBARTELLI *et al.*, 1992; ARNER e HOLMGREN, 2000), galectina-1 (COOPER e BARONDES, 1990), fator de acasalamento alfa de levedura (MCGRATH e VARSHAVSKY, 1989), lectinas solúveis ligantes de lactose L-14 e L-29 (COOPER e BARONDES, 1990; LINDSTEDT *et al.*, 1993), proteína tat do HIV, proteína B hidrofílica acetilada de superfície de *Leishmania* (HASP) (FLINN *et al.*, 1994), proteínas ligadoras da cromatina (HMGB1 e En2), galectina-3 (NICKEL, 2003), neurolisina (EC 3.4.14.16: EP24.16) (VINCENT *et al.*, 1995) e a endo-oligopeptidase EC3.4.24.15 (FERRO *et al.*, 1999; GARRIDO *et al.*, 1999; CARRENO *et al.*, 2005). Agentes farmacológicos que perturbam a função do aparelho de Golgi (nocodazol e brefeldin A) prejudicam a secreção de algumas proteínas desprovidas do peptídeo sinal citadas acima (FERRO *et al.*, 1999), mas podem também não provocar qualquer alteração em sua secreção (HUGHES, 1999; NICKEL, 2003; PRUDOVSKY *et al.*, 2003).

Esses dados sugerem que, embora a secreção dessas proteínas desprovidas de peptídeo sinal ocorra por uma via alternativa, não é possível afirmar que todas utilizam semelhantes mecanismos alternativos de exportação para o meio extracelular (COOPER e BARONDES, 1990; RUBARTELLI *et al.*, 1990; FLORKIEWICZ *et al.*, 1995). A tabela 1 mostra exemplos das primeiras proteínas que não apresentam peptídeo sinal.

Tabela 1 – Exemplo das primeiras proteínas secretadas que não apresentam peptídeo sinal.
Essas proteínas foram identificadas na década de 90 e cuja via de secreção foi sugerida como “alternativa”.

Proteína	Peso molecular (kDa)	Fonte
Lipocortina/Anexina I	37	Monócito, leucócito, medula renal, próstata (humanos)
Fator de coagulação XIII	83	Plaquetas, monócitos (humanos)
Transglutaminase	77	Fígado (porco)
Protimosina	13	Timo (rato)
Paratimosina	14	Timo (rato)
β 4-Timosina	14	Timo (bovino)
Inibidor do crescimento derivado da glândula mamária	13	Glândula mamária (bovino)
Fator de crescimento endotelial derivado de plaquetas	45	Plaquetas (humanos)
FGF básico e ácido	16-24	Células do conjuntivo (mamíferos)
Interleucina I	17-23	Monócitos (mamíferos)
Tioreodoxina/ADF	13	Linfócitos T durante leucemia (humanos)
L-14	14,5	Células musculares (galinha, humano)
Ancorina CII	34	Condrócito, fibroblasto (galinha)
Fator α de acasalamento de leveduras	2	Leveduras
Hemolisina	110	<i>Escherichia coli</i>
Ciclolisina	45-170	<i>Bordetella pertussis</i>
Protease Serratia	50	<i>Serratia marcescens</i>
Proteína NodO	42	<i>Rhizobium</i>
EP24.15 (thimet oligopeptidase)	78	Expressão ubíqua
EP24.16 (neurolisina)	80	Expressão ubíqua

A predominância de expressão do FGF 1 e FGF2 no citoplasma e núcleo das células está de acordo com o fato de ambos não apresentarem peptídeo sinal para entrada na via secretória. No entanto, ambos são encontrados e exercem funções no meio extracelular (ABRAHAM *et al.*, 1986; JAYE *et al.*, 1986). O mecanismo exato que governa a liberação do FGF 1 e FGF 2 para o meio extracelular é ainda desconhecido. No entanto, a liberação do FGF 1 é estimulada em resposta ao stress e é relacionada a proteínas *heat shock* (JACKSON *et al.*, 1992), enquanto o FGF 2 parece ser liberado para o meio extracelular via exocitose sendo este mecanismo dependente de ATP (MIYAKAWA e IMAMURA, 2003). Outros membros da família do FGF (FGF 9, FGF 16 e FGF 20) estão presentes na via secretória clássica, mas

interessantemente apresentam uma sequência sinal bipartida não clivada, ao contrário do observado para os peptídeos sinais clássicos (HAMON *et al.*, 1997).

A secreção da interleucina 1 β (Il-1 β) pode ocorrer por múltiplos mecanismos (NICKEL e SEEDORF, 2008). Todos os mecanismos secretórios não convencionais envolvendo a ligação de compartimentos à membrana têm sido sugeridos a participar da liberação da Il-1 β (NICKEL, 2005). Primeiramente, foi evidenciado que formas maduras de Il-1 β são geradas dentro dos lisossomos, e que o ATP extracelular, concomitantemente com um aumento na concentração de Ca²⁺ citoplasmático, causa a fusão dos lisossomos secretórios com a membrana, o que resultaria na secreção da Il-1 β (RUBARTELLI *et al.*, 1990; ANDREI *et al.*, 1999; ANDREI *et al.*, 2004). Estudos adicionais mostram que a Il-1 β é liberada decorrente da ativação do receptor P2X₇, dependente de ATP, o que ocasiona o derramamento das vesículas através da fusão com a membrana plasmática (MACKENZIE *et al.*, 2001). No entanto, também há estudos contraditórios, que dizem que a secreção de Il-1 β não é dependente de ATP, (VERHOEF *et al.*, 2003). Outro estudo ainda mostra que nem a secreção lisossomal e nem o derramamento na membrana plasmática representam o principal caminho na secreção da Il-1 β , e que há evidências de que quando os receptores P2X₇ são estimulados, a Il-1 β é secretada como um componente luminal dos exossomos (QU *et al.*, 2007).

Galectina 1 e galectina 3 também são secretadas por uma via alternativa, sendo que inicialmente estas proteínas aparecem acumuladas em subdomínios próximos à membrana plasmática seguida da translocação propriamente dita que envolve a vesiculação (formação de exossomos) destas proteínas e liberação ao meio extracelular (SATO *et al.*, 1993; PIMENTA *et al.*, 1994; MEHUL e HUGHES, 1997; HUGHES, 1999).

A expressão de galectina 3 recombinante, contendo uma região N-terminal acetilada pela tirosina quinase p56lck, é secretada mais eficientemente, sugerindo dessa forma, que a associação com a membrana é um passo limitante na secreção da galectina 3. Por outro lado, não se sabe o que favorece o acúmulo de galectina 1 e 3

em subdomínios próximos à membrana nem o que de fato estimula a formação dos exossomos (HUGHES, 1999).

Outro exemplo importante de liberação de proteínas pela via alternativa envolve a expressão da proteína B de superfície celular acetilada de *Leishmania* (HASPB), a qual está associada com a face externa da membrana plasmática em estágios infecciosos do ciclo de vida do parasita (FLINN *et al.*, 1994; PIMENTA *et al.*, 1994). Essa proteína é sintetizada em polirribossomos livres no citoplasma, tornando-se miristoilada e palmitoilada na região N-terminal, o que favorece a ancoragem da HASPB à membrana (FLINN *et al.*, 1994). No entanto, não se conhece como a HASPB é translocada pela membrana nem como é regulada a ancoragem das suas cadeias na membrana. A expressão heteróloga da HASPB em células de mamíferos sugere a existência de uma maquinaria celular capaz de translocar esta proteína pela membrana da célula (FLINN *et al.*, 1994). Não foi identificada nenhuma outra proteína endógena de mamíferos que use este sistema de transporte.

1.7 Secreção não convencional da EP24.15

A EP24.15 é uma proteína desprovida de região hidrofóbica que permita sua inserção em membranas biológicas, bem como de um peptídeo sinal para entrada na via secretória convencional (PIEROTTI *et al.*, 1991).

A distribuição subcelular da EP24.15 no sistema nervoso central de ratos foi analisada por imunohistoquímica para microscopia eletrônica de transmissão. Essa enzima se associa a membranas de elementos neurosecretórios, incluindo as cisternas do complexo de Golgi, vesículas sinápticas e endossomos (FONTENELE-NETO *et al.*, 2001), corroborando estudos anteriores que sugerem que a EP24.15 encontra-se associada às membranas sinápticas em cérebro de ratos (ACKER *et al.*, 1987; FONTENELE-NETO *et al.*, 2001). Foi também demonstrado que a EP24.15 pode ser transportada anterogradamente através do fluxo axonal no nervo ciático de ratos

(YAMAMOTO *et al.*, 2003). Portanto, esse conjunto de dados sugere que, em neurônios, a EP24.15 atinge regiões, como terminais axônicos, especializadas em secreção, trafegando pelo lado externo da via secretória convencional.

Experimentos utilizando imunohistoquímica para microscopia confocal demonstraram que a EP24.15 associa-se a elementos da via secretória convencional, pois ela co-localiza com syntaxina-6, um marcador da região trans-Golgi, e também com o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) presente em vesículas secretórias do tipo “dense core” (GARRIDO *et al.*, 1999). Através de imunohistoquímica para microscopia de luz, foi demonstrado que no tecido nervoso a imunorreatividade para a EP24.15 estava presente em todas as áreas analisadas, localizando-se predominantemente no núcleo de neurônios (MASSARELLI *et al.*, 1999). Nas porções rostrais do sistema nervoso central, a imunorreatividade da EP24.15 apresentou-se mais intensa em áreas como o córtex cerebral e cerebelar, amígdala, órgão subfornical, núcleo paraventricular do tálamo, áreas préptica, supraóptica, supraquiasmática, periventricular e dorsomedial do hipotálamo, núcleo arqueado e no complexo mamilar. No mesencéfalo, ponte, bulbo e medula espinal, a imunorreatividade foi ubiquamente distribuída. Entretanto, em algumas áreas, como na substância cinzenta periaquedutal, área tegmental ventral, colículo, complexo geniculado, núcleo dorsal da rafe, núcleo pontino e núcleo motor do vago, a imunorreatividade pareceu ser mais intensa (MASSARELLI *et al.*, 1999).

Muitas das regiões acima (MASSARELLI *et al.*, 1999) co-localizam com áreas de imunorreatividade intensa a esses substratos (FALLON e LESLIE, 1986; ZAHM *et al.*, 2001; RONDINI *et al.*, 2004). Por outro lado, existem também algumas regiões imunorreativas a esses substratos que não apresentam imunorreatividade à EP24.15 ou vice versa, esse fato sugere que o papel desta enzima no metabolismo de neuropeptídeos pode ser maior do que o estabelecido até o momento (HEALY e ORLOWSKI, 1992).

O mecanismo exato pelo qual a EP24.15 atravessa a membrana plasmática permanece obscuro e possivelmente envolve processos de endereçamento da enzima,

seguido do transporte através de estruturas localizadas na membrana plasmática, como é o caso dos poros de fusão (PETERS *et al.*, 2001; FERRO *et al.*, 2004). Um dos cenários quanto às prováveis etapas do processo de secreção da EP24.15 envolvem: (1) síntese em polirribossomos livres; (2) complexação a proteínas e transporte a regiões específicas próximas à membrana plasmática; (3) endereçamento à face P da membrana plasmática quando do influxo de cálcio; e (4) translocação pela bicamada fosfolipídica. É possível que nesse último estágio do processo, à semelhança do que ocorre para proteínas *heat shock*, que cooperam com translocases durante o transporte de proteínas para a mitocôndria (GORDON *et al.*, 2000), a enzima seja parcialmente desenhovelada.

Foi demonstrado anteriormente que o tratamento de células PC12 de ratos com o composto 8br-cAMP, um análogo não hidrolisável do cAMP (AMP cíclico), causava uma redução na atividade intracelular da EP24.15 sem alterar seus níveis protéicos, sugerindo que a fosforilação pela proteína quinase A (PKA) pudesse regular sua atividade enzimática (FERRO *et al.*, 1995). Posteriormente, foi demonstrada a fosforilação *in vitro* e *in vivo* da EP24.15 pela PKA, e a conseqüente alteração de parâmetros cinéticos que justificavam a redução na sua atividade enzimática mencionada acima (TULLAI *et al.*, 2000). O resíduo Ser⁶⁴⁴ da EP24.15 foi identificado como o alvo de sua fosforilação pela PKA, e de forma bastante interessante é encontrado dentro de um possível motivo (⁶⁴²RTSILRP⁶⁴⁹) de ligação para as proteínas 14-3-3. Outro aspecto interessante, considerando as proteínas 14-3-3, é a habilidade de em células cromafins permeabilizadas, estimularem a exocitose dependente de cálcio e ativação da proteína quinase C (MORGAN e BURGOYNE, 1992a; b). Experimentos para identificação de possíveis interações proteína-proteína envolvendo a EP24.15 utilizando o sistema do duplo híbrido, identificaram diversas proteínas passíveis de interagir com a EP24.15 e estimular sua secreção, como foi o caso para a proteína arcabouço 14-3-3ε (CARRENO *et al.*, 2005). De acordo com esses resultados, foi sugerido que a 14-3-3 se liga preferencialmente na EP24.15 fosforilada. A fosforilação da EP24.15 *in vitro* pela PKA, no resíduo serina⁶⁴⁴ aumentou consideravelmente sua interação com a 14-3-3ε, assim como o tratamento

com forskolin, um ativador de PKA bem estabelecido (AWAD *et al.*, 1983). Esta interação aumentou sensivelmente (aproximadamente 1,5 vezes) o efeito estimulatório do A23187 sobre a secreção da EP24.15 (CARRENO *et al.*, 2005).

Desta forma, foi demonstrado que a proteína 14-3-3 exerce papel importante na secreção não convencional da EP24.15. É possível que o aumento na co-localização entre EP24.15 e 14-3-3ε facilite a secreção da EP24.15 por posicioná-la mais próxima à membrana plasmática e, possivelmente, melhor dentro da maquinaria responsável pela secreção não convencional de proteínas (CARRENO *et al.*, 2005). Além disso, a interação com a 14-3-3ε pode ser importante para localizar a enzima espacialmente dentro das células, por exemplo, em microambientes onde a sinalização celular encontra-se ativa. Este pode ser um conceito importante na elaboração de um novo mecanismo de regulação do metabolismo citosólico, portanto, não compartimentalizado, de peptídeos.

A exocitose de vesículas é de fato precedida pela formação de poros de fusão, cuja abertura é regulada pela interação Ca^{2+} -CaM, Rab-GTPases e H^+ /ATPases (PETERS *et al.*, 2001). Cada abertura de um poro de fusão ocorre rapidamente por alteração conformacional dependente de Ca^{2+} , e têm sido descrito que a calmodulina é uma proteína chave desse processo (WANG *et al.*, 2003). A expansão desses poros de fusão requer também uma assimetria específica dos fosfolípidos de membrana (FOREMAN e MONGAR, 1973), que é fundamental para a fusão dos grânulos de secreção à membrana plasmática (KATO *et al.*, 2002).

Interessante, dados da literatura mostram que a ativação da lipíde escramblase por cátions bivalentes como Mn^{2+} altera a assimetria dos fosfolípidos de membrana (FOREMAN e MONGAR, 1973) e inibe completamente a secreção convencional em células de mastócitos RBL-2H3 (KATO *et al.*, 2002). O tratamento das células HEK293 com Mn^{2+} (a partir de 5 μM) bloqueia completamente, e de forma reversível, a secreção estimulada da EP24.15. Embora o mecanismo responsável por essa inibição ainda seja inconclusivo, esses dados sugerem que a assimetria dos fosfolípidos de

membrana possa ser fundamental para a secreção da EP24.15 (CARRENO *et al.*, 2005).

No entanto, o mecanismo pelo qual a EP24.15 atravessa a membrana plasmática em direção ao meio extracelular permanece obscuro. Pretendemos identificar quais proteínas participam desse processo secretório não convencional, bem como caracterizar farmacologicamente seu mecanismo de regulação. Assim, estamos propondo neste projeto de pesquisa, a caracterização da calmodulina I, outra proteína identificada no sistema de duplo híbrido capaz de interagir com a EP24.15 e participar de seu processo secretório, uma vez que a CaM tem sido descrita como componente essencial no processo de exocitose.

2 OBJETIVOS

Esse trabalho tem como objetivo estudar o mecanismo de secreção não convencional da EP24.15, da seguinte forma:

- 1) Utilizando fatias de cérebro de ratos (*slices*) avaliar possíveis semelhanças com o processo secretório caracterizado em cultura de células para a EP24.15.
- 2) Verificar a interação existente entre a EP24.15 e a calmodulina I, através de ensaios de interação física *in vitro* e ressonância plasmônica de superfície, bem como a existência de co-localização em células.
- 3) Utilizando células em cultura, investigar o papel da calmodulina I na secreção da EP24.15. Para esses estudos serão utilizados agentes farmacológicos moduladores do processo secretório, como forskolin e o ionóforo de cálcio A23187, e os inibidores de PKA (KT5720) e de calmodulina (calmidazolium).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Para os estudos realizados nesse trabalho foram utilizados ratos Wistar machos pesando entre 200 e 250 g, adquiridos do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Os animais foram acondicionados no biotério do departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas I da Universidade de São Paulo. O ambiente foi mantido em temperatura controlada de 25 °C, com ciclos claro e escuro fixos de 12 horas.

Toda a experimentação animal seguiu as regulamentações de ética em experimentação animal de nosso instituto, de acordo com o protocolo registrado sob nº 10, na folha 28, do livro 2, para uso de animais em experimentação.

3.2 Análise da secreção da EP24.15 em diferentes regiões cerebrais através de *slices*

Os *slices* (fatias de cérebro de 350 μm^3) foram obtidos após o sacrifício dos animais por decapitação. Os cérebros foram mantidos em gelo e dissecados (cerebelos ou cérebro inteiro sem córtex e cerebelo) (SWANSON, 1992) em placa sobre o gelo banhados em tampão aCSF (fluido céfalo-espinhal artificial – 126 mM de NaCl, 3,5 mM de KCl, 1,2 mM de NaH_2PO_4 , 1,3 mM de MgCl_2 , 2 mM de CaCl_2 , 11 mM de glicose e 25 mM de NaHCO_3 , pH 7,4, pré-equilibrado durante 1 h em mistura carbogênica - 5% O_2 e 95% CO_2). Para melhor abertura dos canais de N-metil-D-aspartato (NMDA), também fizemos experimentos com o tampão aCFS sem o Mg^{2+} e com acréscimo de glicina (1 μM). Após dissecação, as áreas cerebrais foram pesadas e

cortadas em *slices* de 350 μm^3 em aparelho McIlwain Tissue *Chopper* (The Mickel Laboratory Engineering).

Após lavagem em tampão aCSF, os *slices* permaneceram a 37 °C durante 15 min no mesmo tampão, sob agitação e injeção de mistura carbogênica, para recuperação dos tecidos. Após este período, os *slices* foram lavados (para retirada das enzimas que foram secretadas nesse período), e foi preparada uma solução de 50 mg/mL. Dessa solução foram pipetados 900 μL em tubos contendo 100 μL das drogas diluídas: glutamato (50 μM), ou ionóforo de cálcio A23187 (10 μM) e forskolin (10 μM) diluídos em tampão aCFS, ou 100 μL de tampão aCFS. Três tubos foram feitos para cada tempo.

Os *slices* foram incubados na presença ou ausência de agentes farmacológicos a 37 °C, e em tempos determinados o meio foi coletado e colocado em gelo para a medida da secreção da EP24.15. O tecido também foi mantido em gelo para dosagem da atividade intracelular da EP24.15. Através do método do reagente MTT, antes e após incubação com as drogas, a viabilidade do tecido foi verificada.

A dosagem da EP24.15 secretada ou intracelular foi realizada através do ensaio de atividade enzimática, conforme descrito a seguir. Um resumo desse ensaio descrito pode ser visto na figura 4.

Figura 4 - Resumo esquemático da análise da secreção da EP24.15 por slices de cérebros de ratos. Após sacrifício dos ratos por decapitação, e seus cérebros dissecados, pesados e cortados em *slices* de 350 µm³ em aparelho *Chopper*. Em seguida os *slices* foram re-equilibrados em tampão aCFS com carbogênio e incubados com 100 µL de drogas (estimulado) ou o mesmo volume de tampão aCFS (controle) a 37 °C, sob constante agitação. Nos tempos determinados, tampão e tecido foram separados e mantidos a 4 °C. O ensaio de atividade enzimática realizado com o tampão e com o tecido, resultam, respectivamente, na quantidade de EP24.15 secretada e presente no interior das células (intracelular).

3.2.1 Determinação da atividade enzimática da EP24.15 para tecido

A determinação da atividade enzimática da EP24.15 a partir de *slices* foi realizada como previamente descrito (SHRIMPSON *et al.*, 1997). Para as dosagens da EP24.15 secretada, 50 µl do meio foi incubado na presença de 50 µl de TBS (solução salina total de 150 mM, contendo 25mM de Tris-HCl; 0,125 mM de NaCl, pH 7,4) acrescido de BSA (1 mg/mL), β-mercaptoetanol (1 µM) e 10 µM do substrato QFS (Abz-GGFLRRV-NH₂-EDDnp; 10 µM). Os inibidores JA2 (1µM) e Pro-Ile (5 mM) também foram ensaiados para discriminar atividades enzimáticas não referentes à

EP24.15 (insensível ao Pro-Ile) ou EP24.16 (sensível ao Pro-Ile e JA2). Como controle positivo a atividade de 50 ng da enzima ativa foi ensaiada em paralelo como controle da quebra do substrato e dos inibidores.

Para dosagem da atividade intracelular, o tecido foi lisado por sonicação e após centrifugação realizamos dosagem protéica do sobrenadante através do método de bradford (BRADFORD, 1976), utilizando BSA como curva padrão. Em cada poço de uma placa de 96 poços branca opaca, foram colocados 25 µg de proteína (50 µL), e a dosagem foi feita da mesma maneira que para a EP24.15 secretada. Para melhor comparação dos dados, analisamos a porcentagem de EP24.15 secretada em cada amostra (ajuste entre EP24.15 secretada e a contida intracelularmente).

Todas as amostras foram ensaiadas em triplicatas, com JA2, Pro-Ile, ou sem qualquer inibidor. Os resultados foram ajustados pela quantidade de proteína, e expressos em unidades arbitrárias de fluorescência (UAF)/min/µg de *slices*.

3.2.2 Controle de morte celular pelo método do MTT

Para controle da viabilidade celular dos tecidos utilizados, realizamos ensaios de MTT. O MTT (3-(4,5-dimethizzol-yl)-2-5-diphenyl tetrazoliumbromide) é um reagente de cor amarela e solúvel em água. É capaz de penetrar nas células pela membrana e, em contato com o superóxido produzido pela atividade mitocondrial, é oxidado à MTT-formezan (sal de cor roxa e insolúvel em água). Dessa forma, as células vivas adquirem coloração arroxeadada (VAN DE LOOSDRECHT *et al.*, 1991).

A partir da mesma solução de 50 mg/mL de *slices* ensaiada com as drogas, 360 µL foi incubado ou não com glutamato, e ao tempo final de incubação, 40 µL de MTT (concentração final de 1,2 mM) foi acrescido, homogeneizado e incubado por 5 min em temperatura ambiente. O tecido foi sedimentado por rápida centrifugação e re-suspenso com 300 µL de uma solução água-etanol (1:3). Após 10 min de incubação

em temperatura ambiente, a solução foi submetida a sonicação por 5 s, e a quantidade de proteína foi dosada através do método de Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando BSA (albumina bovina sérica) como curva padrão. Ao restante da solução, após rápida centrifugação, 250 µL do sobrenadante foi adicionado a 250 µL de água, e lido em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 570 nm. A porcentagem de células vivas foi feita através da comparação da leitura do espectrofotômetro com a quantidade de proteínas.

3.2.3 Controle do glutamato por dosagem de sódio-potássio ATPase

A dosagem da ativação da bomba de sódio-potássio ATPase foi realizada como controle da ação do glutamato. Para esses ensaios, após a decapitação dos animais, o cerebelo foi retirado e dissecado (SWANSON, 1992) em PBS gelado, e a seguir homogeneizado em tampão contendo (320 mM de sacarose, 20 mM de HEPES e 1 mM de EDTA, pH 7,4, com inibidor de proteases (PMSF, 1mM). Após centrifugação a 15000 x g por 30 s a 4 °C, o sobrenadante foi recolhido e centrifugado novamente a 12000 x g por 20 min, a 4 °C. O *pellet* foi re-suspenso no mesmo tampão de homogeneização acima, e utilizado para determinar a concentração de proteína pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) utilizando BSA como curva padrão.

Para a dosagem da atividade total da Na^+/K^+ ATPase, foram utilizados 200 µL de tampão histidina 2x concentrado (120 mM de NaCl, 20 mM de KCl, 3 mM de MgCl, 3 mM de ATP e 20 mM de histidina, pH 7,2), 120 µL de água milliQ, 40 µL de ATP 30mM e 40 µL de amostra. Para a dosagem da atividade insensível a oubaína (Mg^{2+} -ATPase) foram utilizados 200 µL de tampão histidina 2x concentrado, 120 µL de oubaína (10 mM), 40 µL de ATP (30mM) e 40 µL de amostra.

Para essas dosagens, uma curva padrão foi feita, onde cada ponto continha:

- branco: 200 μ L de tampão histidina e 200 μ L de água milliQ,
- 0.05 μ mol de Pi: 200 μ L de tampão histidina, 195 μ L de água milliQ e 5 μ L de solução padrão de KH_2PO_4 (10 mM),
- 0.10 μ mol de Pi: 200 μ L de tampão histidina, 190 μ L de água e 10 μ L de solução padrão de KH_2PO_4 ,
- 0.15 μ mol de Pi: 200 μ L de tampão histidina, 185 μ L de água e 15 μ L de solução padrão de KH_2PO_4 ,
- 0.20 μ mol de Pi: 200 μ L de tampão histidina, 180 μ L de água e 20 μ L de solução padrão de KH_2PO_4 .

Todos os pontos e amostras foram pré-incubados durante 5min a 37°C, quando a reação foi iniciada pela adição da amostra, permanecendo a 37 °C sob constante agitação, durante 20 min. Para parada da reação, adicionamos 600 μ L de *quenching solution* (10N de H_2SO_4 e 5% molibdato de amônio), e em seguida 10 μ L de solução de Fiske/Subbarow. Após 30 min, a leitura foi realizada em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 690 nm.

A atividade da Na^+/K^+ ATPase é dada pela subtração da atividade total e da atividade insensível a oubaina.

3.3 Construções dos plasmídeos contendo cDNA codificante para as proteínas EP24.15, CaM ou 14-3-3

3.3.1 Vetores

Os cDNAs para as proteínas foram inseridos nos vetores pGEX-4T-2 e pCMV/myc.

3.3.2 Subclonagem nos vetores *pGEX* e *pShooter*

Os vetores *pGEX* e *pShooter* contendo EP24.15 ou 14-3-3 foram obtidos do Laboratório de Comunicação Celular, segundo descrito anteriormente (RIOLI *et al.*, 1998; CARRENO *et al.*, 2005). Para a CaM, procedeu-se com os seguintes passos:

3.3.2.1 Extração de RNAs

A extração de RNAs totais foi realizada de cérebros de ratos. O tecido foi homogeneizado em solução de Trizol (Invitrogen) na proporção de 1 ml/100 mg tecido, e incubado por 10 min à temperatura ambiente, para permitir a completa dissociação de complexos nucleoprotéicos. Em seguida, adicionou-se clorofórmio para promover a extração dos RNAs. Após centrifugação por 15 min a 12.000 x g, 4 °C, a fração correspondente aos RNAs (superior) foi coletada e precipitada com álcool isopropílico, incubada por 10 min à temperatura ambiente e novamente centrifugada, nas mesmas condições. Ao final da centrifugação, os precipitados de RNA foram lavados com etanol 95 % e solubilizados em H₂O DEPC (água destilada tratada com dietil-pirocabonato 0,01 %, autoclavada).

Os RNAs foram quantificados por meio de medida de absorbância em espectrofotômetro, em um comprimento de onda de 260nm (A_{260}) e a pureza analisada por meio da relação A_{260}/A_{280} .

A seguir, os RNAs foram tratados com DNase I (Invitrogen), seguindo o protocolo do fabricante, e as amostras foram mantidas a – 80°C até o momento do uso.

3.3.2.2 Reações de RT

Para obtenção dos cDNAs codificando as sequências de CaM, foram realizadas reações de transcrição reversa (RT) utilizando-se 3 µg de RNA total, na presença de uma mistura de oligonucleotídeos curtos, de sequências randômicas, denominados “hexâmeros” e/ou oligo dT. Os experimentos foram realizados segundo protocolo do *kit SuperScript First Strand Synthesis* (Invitrogen).

A proteína ribossomal L19 (RPL19) foi usada como controle para verificação da integridade dos RNAs purificados, sendo os oligonucleotídeos utilizados para amplificação da mesma: *sense*, 5' ²⁴⁸AGGCACATGGGCATAGGTAA²⁶⁷ 3' e *anti-sense*, 5' ⁴⁴⁶CCATGAGAATCCGCTTGTTT⁴²⁷ 3'.

3.3.2.3 PCR

As reações de PCR foram realizadas com o produto da reação de RT, utilizando a enzima Taq Polimerase (Biolase). No caso das sequências para sub-clonagem no vetor pGEX-4T-2, os oligonucleotídeos possuíam sítios de restrição para as enzimas BamH I e Not I (Fermentas) e no caso das sequências para sub-clonagem no vetor pShooter, possuíam sítios para as enzimas Xho I e Not I (Fermentas). As sequências dos oligonucleotídeos utilizados, onde as porções sublinhadas correspondem às sequências das enzimas de restrição são:

- Para o vetor pGEX

Sense (BamH I) - 5' CAGGATCCATGGCTGATCAGCTGACTGAAG 3'

Anti-sense (Not I) - 5' CAGCGGCCGCATTTTGCAGTCATCATCTG 3'

- Para o vetor pShooter

sense (Xho I) - 5' CACTCGAGATGGCTGATCAGCTGACTGAAG 3'

antisense (Not I) - 5' CAGCGGCCGCATTTTGCAGTCATCATCTG 3'

3.3.2.4 Purificação de DNA

Todos os produtos de PCR foram purificados diretamente da reação ou a partir de gel de agarose 1 %, seguindo-se o protocolo do *kit Concert Rapid PCR Purification System* (Amersham-Pharmacia).

3.3.2.5 Reações de digestão e ligação

Os cDNAs preparados para sub-clonagem no vetor pGEX foram digeridos com as enzimas BamH I / Not I, enquanto o cDNA de CaM para sub-clonagem no vetor pShooter foi digerido com as enzimas Xho I e Not I. Todas as reações foram realizadas utilizando-se tampão universal contendo BSA e incubadas durante 2 h a 37 °C.

As reações de ligação entre os vetores e o fragmento de CaM foram realizadas na proporção 1 (vetor): 6 (inserto), utilizando-se a enzima T4 DNA ligase (Invitrogen) durante 1 h em temperatura ambiente.

3.3.3 Sequenciamento nos vetores pGEX e pShooter

Para confirmação da sub-clonagem da CaM nos plasmídeos p-Shooter ou pGEX realizamos sequenciamentos de DNA. Para isso, procedeu-se os seguintes passos: eletroporação de bactérias e plaqueamento em ágar, PCR de colônia, reação de sequenciamento, precipitação do sequenciamento e leitura em aparelho Megabace e análise dos sequenciamentos, descritos a seguir.

3.3.3.1 Eletroporação de bactérias e plaqueamento em Agar

Os cDNAs sub-clonados no plasmídeo pShooter ou pGEX foram eletroporados em bactérias XL1-Blue. Foram usados 1,5 µL de plasmídeo para 80 µL de bactérias eletrocompetentes. A mistura foi submetida a uma voltagem de 1500 V por 25 ms. Em seguida, as bactérias foram re-suspensas em 1 mL de meio LB e incubadas sob agitação (250 rpm) por 1 h a 37 °C. Ao final do período, as bactérias foram plaqueadas em meio LB-ágar contendo ampicilina durante 16 horas.

3.3.3.2 PCR de colônia

Colônias isoladas foram escolhidas aleatoriamente, para realização dos PCRs de colônia. Cada colônia de bactéria foi coletada com uma ponteira estéril, gentilmente encostada sobre uma placa contendo LB-ágar-ampicilina (placa espelho) e, em seguida, inoculada no poço correspondente de uma microplaca de PCR com 96 poços, contendo em cada um, os seguintes reagentes:

- 0,025 µL de *primer sense* 100 µM
- 0,025 µL de *primer anti-sense* 100 µM
- 1,5 µL de tampão NH₄ 10x
- 0,2 µL de dNTP mix
- 0,1 µL de Taq DNA polimerase (50U/µL – Bioline)
- água suficiente para 15 µL (volume final de reação)

O mix, acrescido de 1 colônia de bactéria sofreu os seguintes ciclos:

95 °C – 4 min.
 95 °C – 30 s
 60 °C – 30 s
 72 °C – 1 min e 15 s

} 40 ciclos

72 °C – 7 min.
 4 °C – ∞

3.3.3.3 Reação de sequenciamento

A reação de sequenciamento foi realizada utilizando:

- 200 – 500 ng de DNA (resultante do PCR de colônia)
- 1 µL de *primer sense* ou *anti-sense*
- 4 µL de ET terminator (Amersham Biosciences)
- H₂O suficiente para 11 µL de reação

Ciclos:

95 °C – 3 min.
 95 °C – 20 s
 56 °C – 20 s
 60 °C – 4 min

} 30 ciclos

4 °C – ∞

3.3.3.4 Precipitação do sequenciamento e leitura em aparelho Megabace

À reação de sequenciamento, foi adicionado 1 µL de acetato de amônia e, após agitação, 2,5 vezes o volume de etanol 100% foi adicionado, e incubado por 15 min a 21 °C. A placa foi centrifugada a 3100 x g, por 30 min em temperatura ambiente. Após descartar cuidadosamente o sobrenadante, 200 µL de etanol 70% foi adicionado à

placa, e esta foi centrifugada por 10 min em temperatura ambiente, a 2000 x g. O sobrenadante foi descartado e a placa foi seca durante 15 min em temperatura ambiente e 10 µL de tampão de amostra (Amersham Biosciences) foi adicionado à placa. Após rápido vórtex e spin, a placa foi colocada no sequenciador automático de DNA MEGABACE (Amersham Biosciences).

3.3.3.5 Análise dos sequenciamentos

Para se identificar a presença do cDNA correto e na sua fase correta de leitura em fusão com o epítipo c-myc, as sequências geradas foram analisadas e confrontadas com banco de dados, através do servidor do *National Center of Biotechnology Information* (NCBI) via Internet: www.ncbi.nlm.nih.gov, usando o programa Blast.

3.4 Expressão de proteínas recombinantes em sistema procarionte e posterior purificação por cromatografia de afinidade

3.4.1 Bactérias

As bactérias utilizadas nesses estudos foram *E. coli* da linhagem XL1-Blue (Stratagene – Inc., La Jolla, CA, EUA) cujo genótipo é *recA1 end A1 gyr A96thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI^qZΔM15 Tn 10 (Tet^r)]*.

3.4.2 Expressão de proteínas

A expressão de proteínas foi realizada para os ensaios de interação física, bem como controle dos demais experimentos, como atividade enzimática e imunocitoquímica. As proteínas CaM, EP24.15, GST e CaM em fusão ao GST (CaM-

GST) foram expressas em *E. coli* em fusão com glutathiona-S-transferase (GST), usando o vetor de expressão pGEX-4T2 (Amersham Biosciences). A purificação das proteínas foi feita inicialmente por cromatografia de afinidade usando a coluna glutathiona-Sepharose (Amersham Biosciences).

Colônias de *E.coli* XL1-blue transformadas com o vetor pGEX4T-2 contendo o cDNA da CaM ou EP24.15, clonadas de cérebro ou testículo de rato, respectivamente, foram crescidas em meio LB-ágar contendo ampicilina (50 µg/mL). Uma colônia isolada foi escolhida aleatoriamente, e transferida com auxílio de uma ponteira plástica para um tubo cônico de 50 mL, contendo 10 mL de meio LB e ampicilina (50 mg/mL). Após crescimento a 37 °C sob agitação constante (300 rpm) durante 8 horas, essa cultura foi transferida para 250 mL de meio LB e ampicilina (50 mg/mL). As culturas foram crescidas a 37 °C sob agitação constante (300 rpm) durante 16 horas, quando foram transferidas para 4 litros de meio LB. Novamente o crescimento das bactérias foi feito sob agitação constante a 37 °C até atingir um valor de absorbância entre 0,6 e 0,7 em comprimento de onda de 600 nm. Nesse momento, a temperatura do agitador orbital foi reduzida para 30 °C, e adicionado 1 mM de IPTG (isopropil-β-Ditiogalactopiranosídeo) como indutor da expressão da proteína. Após 4 horas, o processo foi interrompido e as culturas foram submetidas à centrifugação (5000 x g durante 20 min) para sedimentação das bactérias e descarte do sobrenadante.

3.4.3 Purificação de proteínas

A purificação das proteínas foi realizada após sua expressão em bactérias *E. coli*. Os *pellets* provenientes da centrifugação das bactérias após a indução de expressão com IPTG foram re-suspensos em 150 mL de tampão PBS-K (tampão PBS acrescido de 1,8 mM KH₂PO₄) contendo 1% de Triton X-100, pH 7,4, incubados durante 20 min na presença de lisozima (10 mg/mL) em temperatura ambiente, e então submetidos a 3 ciclos de sonicação de 1 minuto à 60 hz em gelo, com intervalos de 1 minuto entre eles. O homogenato obtido foi centrifugado a 5000 x g por 30 min a 4° C,

sendo o sobrenadante removido cuidadosamente e incubado com a resina glutathione-Sepharose (Amersham Biosciences), previamente equilibrada em tampão PBS-K 0,15 M pH 7,4, durante 30 min em temperatura ambiente, sob rotação horizontal. A resina foi removida do sobrenadante por centrifugação a 500 x g, por 5 min, e transferida para uma coluna de cromatografia. Na coluna, a resina foi lavada com 30 mL de PBS-K contendo 1% de Triton X-100, 30 mL de tampão *Wash* (50 mM tris pH 7,4 contendo 50 mM NaCl), seguido de tampão *Wash* acrescido de cálcio (50 mM tris pH 7,4, contendo 50 mM NaCl e 2,5 mM de CaCl_2). A seguir adicionou-se 100 unidades de trombina por mL de resina, e procedeu-se à incubação por 18 horas a 21 °C com agitação rotativa. As proteínas recombinantes livres (CaM ou EP24.15) foram eluídas da coluna em tampão *Wash*, contendo 150 mM NaCl (pH 7,4). As proteínas GST ou CaM-GST, foram eluídas com glicina (0,2 M, pH 2,2), sem prévia incubação com a enzima trombina.

Para concentração das proteínas utilizamos filtração em membranas com exclusão de peso molecular (*Amicon[®] Ultra* 30,000 e 10,000 NMWL – Millipore, Carrigtwohill, CC – Ireland - para CaM e CaM-GST, de 50 NMWL para EP24.15 e de 10,000 NMWL para GST), trocando-se o tampão por TBS, pH 7,4.

As proteínas obtidas foram quantificadas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), usando BSA como curva padrão. A pureza das proteínas foi analisada após eletroforese de 10 µg de cada proteína em gel de poliacrilamida 12%, corado pelo Comassie brilliant blue. Após confirmação de pureza maior que 95%, as proteínas foram aliquotadas e armazenadas a -80 °C.

3.5 Interação física (“*binding*”) *in vitro*

Os ensaios de interação física (*binding*) *in vitro* foram realizados com o intuito de buscar evidências que suportem a sugestão de que a CaM interage fisicamente com a EP24.15. Para isso, o primeiro passo foi o de expressão e purificação das proteínas

recombinantes EP24.15, CaM, CaM-GST e GST, conforme descrito acima. A seguir, foram realizados os ensaios de *binding in vitro*. Para isso, a proteína CaM em fusão com GST foi imobilizada em uma coluna de glutathiona-Sepharose. Como controle, imobilizamos apenas a proteína GST.

Inicialmente, 5 µg da CaM-GST, ou GST foram imobilizadas na resina glutathiona-sepharose e posteriormente incubadas com 5 mM de EGTA durante 30 min. As amostras foram então lavadas por centrifugação (830 x g por 5 min) e incubadas em tampão contendo 150 mM de NaCl, 10 mM de Tris pH 8,0, 0,3% de Triton X-100, 0,1% de BSA e 1 mM de β-mercaptoetanol, com concentrações de cálcio: 0 µM, 0,12 µM, 1,2 µM, 12 µM, 120 µM e 1200 µM.

As amostras foram incubadas com EP24.15 (10 µg) durante 18 h, a 4°C e lavadas 5 vezes no tampão descrito acima, com as mesmas concentrações de cálcio. À última centrifugação foi adicionado tampão de amostra de SDS-PAGE à resina e essa foi fervida por 5 min para desligamento e desnaturação das proteínas. Para determinação da existência da interação física realizamos western blots após SDS-PAGE a 8% e transferência para membranas de nitrocelulose, utilizando um anticorpo anti-EP24.15 (1:3000). Um resumo esquemático da interação esperada entre as proteínas nesse experimento é mostrado na figura 6. O procedimento do western blot é detalhado no item abaixo.

Figura 6 - Resumo esquemático dos experimentos de interação protéica (“binding”) *in vitro*. À resina glutationa-sepharose liga-se 5 µg da proteína GST em fusão com CaM (A) ou, como controle, apenas GST (B). A essa coluna, passa-se 10 µg da proteína EP24.15 recombinante selvagem. Para visualização da ligação da EP24.15 à CaM ou ao GST, após lavagens, procede-se com SDS-PAGE a 8% e transferência para membranas de nitrocelulose, utilizando o anticorpo primário específico, anti-EP24.15 feito em coelhos (1:3000) seguido por anticorpo secundário anti-IgG de coelhos (1:3000; Amersham Biosciences). A visualização foi realizada pelo substrato luminescente ECL (Pierce) em filme de raio-x.

3.5.1 Western blot

Para realização do western blot, após SDS-PAGE a 8%, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose a 30V, durante 18 h, a 4°C. Após verificação da transferência com o corante Ponceau, foi feito bloqueio durante 2 horas em temperatura ambiente com 5% de leite desnatado e 1% de BSA diluído em TTBS (TBS acrescido de 0,1% de Tween 20), seguido por incubação de 2 horas do anticorpo primário anti-EP24.15 (1:3000) feito em coelho, diluído em TTBS contendo

5% de leite desnatado. Após ciclos de 3 lavagens de 10 min cada, foi incubado o anticorpo secundário anti- IgG de coelho (1:3000; Amersham Biosciences) conjugado à peroxidase diluído em TTBS foi incubado durante 1 hora. Após ciclos de 4 lavagens de 10 min. cada, a visualização das bandas foi realizada através de revelação em filme de raio-x com o substrato quimioluminescente ECL (Pierce, WI, EUA) seguindo instruções do fabricante.

Os resultados apresentados são representativos de três experimentos realizados de forma independente. A análise densitométrica das bandas foi realizada no programa Image J (<http://rsbweb.nih.gov>).

3.6 Interação física CaM-EP24.15 por ressonância plasmônica de superfície (RPS)

A técnica de ressonância plasmônica de superfície (RPS) foi outra técnica utilizada para verificar a interação entre as proteínas EP24.15 e CaM.

O uso desta metodologia é relativamente recente para análises de interação dos tipos proteína-proteína, proteína-extrato ou proteína-pequenas moléculas. RPS permite o monitoramento direto, em tempo real, de alta qualidade e, de sensível detecção (TAKEDA *et al.*, 2006).

A RPS é uma técnica óptica que se baseia na excitação de uma superfície plasmônica através de um feixe de luz concentrado e mede mudanças no índice de refração que ocorrem na interface da camada sensor-fluido. O *sensor chip* é constituído de uma fina camada de ouro (aproximadamente 50 nm) sobre uma superfície de vidro. Nessas condições, uma onda se propaga na camada aquosa e pode interagir em particulares comprimentos de onda e ângulo incidente com elétrons mobilizados na superfície de ouro. Uma onda plasmônica dos elétrons excitados é produzida na camada de ouro e pode ser detectada como um feixe de luz refletido

(WILSON, 2002). Quando uma solução com outra molécula que se quer analisar (analito) passa sobre o *sensor chip* e interage com a proteína imobilizada previamente a esse, forma-se um complexo. A resposta dessa interação resulta no acúmulo gradativo de massa na superfície do *sensor chip*, que causa a mudança do índice de refração do meio, resultando na mudança do ângulo. Esse ângulo é medido em unidades de ressonância (RU). Na sequência, é aplicado no chip um fluxo de tampão, quando podemos visualizar a dissociação dessas proteínas, seguido pela passagem de uma solução regenerante da superfície. A técnica pode ser mais bem entendida através do resumo esquemático da figura 7.

Figura 7 - Resumo esquemático: ressonância plasmônica de superfície (SRP). No Painel A, o equipamento e o *sensor chip* detectam interação do analito (esferas) em solução em fluxo constante com a proteína imobilizada (losangos). O ângulo azul define a posição da intensidade reduzida do feixe de luz. Os pontos de tempo T1 e T2 mostram, no sensorgrama esquemático (painel B) corresponde aos dois ângulos vermelhos, os quais se deslocam com a interação do analito de acordo com o tempo. Como a concentração de ligação do analito aumenta (seta), a resposta em RU responde à saturação aproximada. O complexo se dissocia com a reintrodução do tampão. Como mostrado, a resposta à injeção da solução cai para a linha de base se seu índice de refração é mais baixo que o do tampão (WILSON, 2002).

Para realização desses experimentos, utilizamos o aparelho BIAcore T100 (GE Healthcare). Inicialmente, a proteína CaM foi imobilizada em um *sensor chip* CM5. Esse *sensor chip* é dividido em 4 células e contém cadeias de dextran carboxi-metilado covalentemente ligadas à superfície de ouro. A proteína se liga a essa superfície

através de ligações amina nas nanopartículas de ouro estabilizadas com 2,4,6-trimercapto-1,3,5-triazina presentes nesse *sensor chip* (PATTNAIK, 2005).

A imobilização da CaM foi realizada de acordo com o recomendado pelo fabricante. A superfície foi inicialmente ativada a 25 °C, com de injeção da mistura (1:1, v/v) de 10 mM de NHS (N-hidroxysuccinimide) e 400 mM de EDC (N-ethyl-N'(3-diethylaminopropyl)-carbodiimide). A proteína foi então imobilizada usando-se 24 µM da proteína CaM pura em tampão acetato pH 3,5. A lavagem da superfície foi realizada com tampão HBS-EP (10 mM Hepes, pH 7.4, 150 mM NaCl, 3.4 mM ácido ethylenediaminetetraacético e 0.005% do surfactante P20), a um fluxo constante de 10 µL/min. Em seguida os sítios ativos restantes foram bloqueados com etanolamina 1M em HCl. A etapa resultou na imobilização covalente de 1.000 unidades relativas de ressonância (RU) de CaM. O mesmo procedimento foi realizado em outra célula do *sensor chip*, sem a presença da proteína, para que pudesse ser usado como “célula branca”.

Para verificar a interação da EP24.15 com a CaM, submetemos o *sensor chip* previamente imobilizado como descrito acima a um fluxo constante de 30 µL/min durante 180 s da proteína EP24.15 nas concentrações 0,1 µM, 0,25 µM, 0,5 µM, 1 µM e 5 µM diluída no tampão HBS-EP acrescido de 5 mM de CaCl₂, em corridas separadas, para verificar a associação dessas proteínas. Após esse período, o *sensor chip* foi submetido a um fluxo constante de µL/min durante 600 s de HBS-EP acrescido de CaCl₂, para verificarmos a dissociação dessas proteínas. Após cada corrida, a superfície foi regenerada com glicina pH 2,5 a um fluxo constante de 30µL/min durante 30 s. O mesmo experimento foi realizado em tampão HBS-EP acrescido de 5mM EGTA.

Os experimentos foram realizados 3 vezes de forma independente. Os dados são exibidos em forma de sensorgrama, em RU, após subtração dos valores obtidos da célula imobilizada com CaM da célula branca. O software utilizado possibilita a análise da constante de dissociação (K_d) dessas proteínas.

3.7 Cultura de células

A linhagem de célula 293 de rim embrionário humano (HEK293) (GRAHAM *et al.*, 1977) foi escolhida por apresentar uma via secretória bem desenvolvida (GRIFFIN *et al.*, 1992). Além disso, o rim é um órgão com alta expressão da EP24.15, o que sugere um papel importante para a enzima neste tecido.

Essas células foram utilizadas nos ensaios de imunocitoquímica e secreção estimulada da EP24.15, foram cultivadas em DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Médium; Invitrogen, CA, EUA) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) (Invitrogen) previamente inativado a 56 °C durante 30 min, e 100.000 u/L de penicilina e 0,1 g/L de estreptomicina (Invitrogen). Essas células foram mantidas em placas redondas de 100 ou 35 mm de diâmetro, em atmosfera umidificada constituída de 5% de CO₂ e 95% de ar, a 37 °C.

3.8 Secreção estimulada da EP24.15 sob diferentes concentrações de A23187

Testamos diversas doses de A23187 para verificar a dose ideal na qual a enzima seria secretada. Para isso, células HEK293 mantidas em estufa a 37 °C e 5% de CO₂ e cultivadas em meio DMEM acrescido de antibiótico e 10% de soro fetal bovino (SFB) foram submetidas ao ensaio de secreção enzimática.

De forma resumida, $1,7 \times 10^6$ células foram sedimentadas em placas de 35 mm. Após 18 horas, as células foram lavadas 2 vezes com DMEM sem soro e sem antibiótico, acrescido de 0,1% de BSA, e deixadas nesse meio por 1 hora na estufa. Paralelamente, placas idênticas contendo o mesmo meio permaneceram na estufa, para que esse estivesse equilibrado nas mesmas condições. Em seguida, o meio foi substituído pelo meio que estava nas placas sem células, acrescido de A23187 nas concentrações de 0, 0,01 µM, 0,1 µM, 1 µM, 5 µM, 10 µM e 20 µM durante 40 min. Após esse período, o meio foi retirado, centrifugado a 15.000 x g por 1 min, a 4 °C e

mantido em gelo até o momento da dosagem enzimática (EP24.15 secretada), conforme descrito abaixo.

As células aderidas às placas foram retiradas, contadas em câmara de Neubauer e lisadas por congelamento e descongelamento. Após centrifugação a 830 x g por 10 min, o sobrenadante foi re-suspenso em 250 µL de DMEM sem soro e sem antibiótico acrescido de 0,1% de BSA e mantido em gelo para dosagem enzimática da EP24.15 intracelular.

Todos os grupos foram realizados em triplicatas, em três experimentos independentes.

3.8.1 Determinação da atividade enzimática para EP24.15

A determinação da atividade enzimática celular da EP24.15 foi realizada fluorimetricamente, em triplicatas, utilizando-se o substrato QFS (Abz- GGFLRRV-NH₂-EDDnp), como previamente descrito (SHRIMPSON *et al.*, 1997). Resumidamente, 80 µL do meio de incubação (EP24.15 secretada) ou do homogenato celular (EP24.15 intracelular) foi incubado na presença de 20 µL de TBS acrescido de BSA (1mg/ml), β-mercaptoetanol (0,1M), e 1 mM do substrato QFS. A fluorescência foi monitorada em espectrofluorímetro para placa de 96 poços branca opaca (Corning), a comprimentos de onda de 319 nm (excitação) e 418 nm (emissão). Células HEK293 não possuem EP24.16 (VINCENT *et al.*, 1995; CARRENO *et al.*, 2005), e por essa razão fizemos uso apenas do inibidor específico e JA2 (N-[1-(R, S)-carboxy-3-phenylpropyl]-Ala-Aib-Tyr-p-aminobenzoate, 1 µM) (DAUCH *et al.*, 1991; FERRO *et al.*, 1999; SMITH, LEW *et al.*, 2000). Como controle positivo a atividade de 50 ng da enzima ativa também foi medida. Os resultados, dados em unidades arbitrárias de fluorescência (UAF)/min foram corrigidos para o número de células. Os dados finais são expressos como a porcentagem da EP24.15 secretada em relação à quantidade total de EP24.15 intracelular.

3.9 Quantificação do Ca^{2+} intracelular

A quantificação do Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) foi realizada com o intuito de elucidar a quantidade de Ca^{2+} necessária para secreção da EP24.15. As medidas de variação de cálcio intracelular em células HEK293 foram realizadas com o uso do microscópio confocal LSM 510 (Zeiss, Jena, Alemanha). Um milhão de células foram plaqueadas em placas de 35 mm (Corning), e após 24 h as medidas foram realizadas. Inicialmente, as células foram tratadas com 5 μM do fluoróforo sensível ao cálcio Fluo-3AM (Fluo-3 acetoxymethyl ester) (Invitrogen) durante 60 min a 37 °C, diluído em DMEM sem soro e sem antibióticos. Quando esse reagente entra na célula, ele é clivado por uma esterase, torna-se polar e não sai da célula. Quando excitado, esse reagente permite a visualização da entrada de Ca^{2+} . Após acréscimo de 0,1 % de ácido purônico para tornar as células permeáveis e permitir a entrada do Fluo-3AM, as mesmas foram lavadas 3 vezes com DMEM sem soro e sem antibióticos a 37 °C. As células foram levadas ao microscópio, onde foi usada excitação de 488 nm. A emissão foi detectada entre 515 e 530 nm, usando um filtro *rainbow*.

As células foram tratadas inicialmente com KCl, que foi utilizado como primeiro controle, pois causa a despolarização da membrana plasmática, com pequena entrada de Ca^{2+} . Após re-estabilização das células, utilizamos o ionóforo de cálcio A23187 nas concentrações de 0,01 μM , 0,1 μM , 1 μM , 5 μM e 10 μM e esperamos que as células estabilizassem novamente. No final de cada experimento, 10 μM de A23187 seguido de 50 mM EGTA foram adicionados para estabelecer os valores de fluorescência para as doses máxima ($F_{\text{máx}}$) e mínima (F_{min}).

Calculamos as mudanças na $[\text{Ca}^{2+}]_i$ utilizando a seguinte fórmula: $[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d(F - F_{\text{min}})/(F_{\text{max}} - F)$, assumindo 450 nM como K_d do Fluo-3AM, conforme descrito anteriormente (RIESKE *et al.*, 2007).

3.10 Isolamento do DNA plasmidial para transfecção (Maxiprep)

O isolamento do cDNA plasmidial para transfecção das células HEK293 foi realizado para o plasmídeo p-Shooter vazio ou com o cDNA codificante para CaM, 14-3-3 e/ou EP24.15.

Após análise dos clones recombinantes as colônias positivas *in frame* com o epítipo c-myc, cujas réplicas encontravam-se em placa espelho, foram inoculadas em 500 mL de meio LB com ampicilina e crescidas sob agitação (300 rpm) durante 18 h.

O DNA plasmidial utilizado nas transfecções foi extraído usando sistema comercial Wizard® *Plus* Maxiprep System (Promega, Madison, WI, USA), seguindo instruções do fabricante.

3.11 Transfecções

As transfecções foram realizadas utilizando-se o reagente HEKfectin® (Bio-Rad) seguindo as instruções do fabricante. As células foram transfectadas com o plasmídeo p-Shooter modificado (sem sinal para entrada no retículo endoplasmático) com o cDNA codificante para CaM, EP24.15 e/ou 14-3-3ε, bem como com o plasmídeo sem qualquer inserto para controle dos experimentos (células mock).

Resumidamente, em cada poço de uma placa de 6 poços (Corning) contendo a confluência de 70 a 90% de células HEK293, uma alíquota de 8 µL do HEKfectin foi diluída em 125 µL de meio de cultura DMEM, sem soro e sem antibiótico, enquanto 1 µg de DNA de cada plasmídeo foi diluído em 125 µL de meio de cultura DMEM, sem soro e sem antibiótico. Todas as células foram transfectadas com o total de 3 µg de DNA plasmidial. Dessa forma, quando necessário, a quantidade de DNA foi completada com o plasmídeo sem inserto. As soluções de DNA e HEKfectin foram homogeneizadas e incubadas em temperatura ambiente por 20 min, quando 750 µL do

mesmo meio foi acrescentado à solução, e colocado sobre as células. Após 6 horas acrescentamos 2 mL de DMEM contendo antibiótico e SFB, durante 18 horas. Após esse período as células foram re-plaqueadas em DMEM contendo antibiótico e SFB.

3.11.1 Controle da eficiência de transfecção

Para controle da eficiência de transfecção com o lipossoma linhagem específico HEKfectin, transfectamos células HEK293 com o plasmídeo pEGFP-N1 (Clontech, Palo Alto, EUA).

Após 48 horas da transfecção as células foram lavadas em PB 0,1 M (77,5 mM de fosfato de sódio dibásico e 22,5 mM de fosfato de sódio monobásico) e fixadas com paraformaldeído a 4% diluído em PB 0,1 M durante 15 min. Após 2 ciclos de lavagens com PB 0,1 M, os núcleos celulares foram marcados com o componente Hoechst 33342 (1:700), do kit *Image-iTTM LIVE Plasma Membrane and Nuclear Labeling Kit* (Molecular Probes, CA, EUA) diluído em PB 0,1M durante 10 minutos. Após montagem em lâmina, as células foram analisadas em microscópio de fluorescência.

3.11.2 Controle da superexpressão das proteínas estudadas

O controle da superexpressão das proteínas estudadas foi realizado através de western blot, utilizando os anticorpos específicos anti-EP24.15 ou anti-CaM.

3.11.2.1 Preparo dos extratos celulares

Os extratos celulares totais foram preparados após 48 horas da transfecção. Resumidamente, as células foram lavadas 2 vezes e retiradas da placa com PBS a 4 °C e centrifugadas a 830 x g a 4°C durante 10 min. O sobrenadante foi descartado e as

células foram lisadas por sonicação (3 ciclos de 5 segundos a 4 Hz) em TBS acrescido de coquetel de inibidores de proteases (Sigma). Após centrifugação a 830 x g a 4 °C durante 10 min, a dosagem do sobrenadante foi realizada usando-se o método de Bradford (BRADFORD, 1976) utilizando BSA como curva padrão. O volume das amostras foi corrigido e as mesmas foram fervidas em tampão de amostra de SDS-PAGE durante 5 min e aplicadas no gel de poliacrilamida conforme descrito nos itens 3.11.2.2 e 3.11.2.3 abaixo.

3.11.2.2 Superexpressão da EP24.15

Para verificação da superexpressão da EP24.15, utilizamos 10 µg de celular total das células que foram transfectadas com o plasmídeo codificante para essa enzima e 100 µg das células que foram transfectadas sem o plasmídeo codificante para essa enzima.

Os Western blots foram realizados conforme descrito no item 3.5.1 acima.

3.11.2.3 Superexpressão da CaM

Para verificação da superexpressão da CaM, utilizamos 100 µg de extrato celular total para todos os tipos de transfecção. As proteínas foram separadas de acordo com suas massas, em SDS-PAGE a 15%, e transferidas para uma membrana de nitrocelulose, durante 18 h a 4 °C.

Após verificação da transferência com *Pounceau red*, as membranas foram descoradas e incubadas durante 1 h em tampão de fixação (0,2% de glutaraldeído (v/v) diluído 25 mM KH₂PO₄ e 25 mM K₂HPO₄ – *KP buffer*), seguido de 3 ciclos de 5 min de lavagens em *KP buffer*. Procedemos então à re-exposição dos sítios ativos das proteínas em solução de 1 M de lisina diluída em 0,1 M de NaHCO₃, seguido de 3

lavagens de 5 min em *KP buffer*. Seguimos com o bloqueio da membrana em PBS contendo 5% de BSA, pH 7,4 durante 4 h, a 21 °C. Após lavagem de 10 min em PBS contendo 0,05% (v/v) de Tween 20, pH 7,4 (TPBS), incubamos o anticorpo primário anti-CaM feito em camundongo (1:1000 – Sigma, MO, EUA) durante 18 h a 4 °C diluído em PBS contendo 1% de BSA. As membranas foram submetidas à 3 lavagens de 10 min em TPBS e o anticorpo secundário anti-camundongo biotinilado (1:1000 – Vector Labs, CA, EUA) diluído em TPBS foi incubado durante 1 h a 21 °C. As membranas foram lavadas 4 vezes de 10 min em TPBS. O sinal da reação foi revelado com a incubação das membranas com o kit ABC – *Avidin and Biotinylated horseradish peroxidase macromolecular Complex* (Vector Labs) diluído em PBS contendo de 0,1% BSA durante 40 min em temperatura ambiente, seguido de 4 ciclos lavagens de 10 min em TPBS. A visualização foi realizada com o uso do substrato quimioluminescente ECL (Pierce) em filme de raio-x (Pierce).

3.12 Análise da secreção da EP24.15 em cultura de células submetidas a diversos tratamentos

A secreção da EP24.15 basal e estimulada foram determinadas em células HEK293 transfectadas e incubadas em DMEM sem soro e sem antibióticos contendo 0,1% de BSA. Após 48 horas da transfecção procedemos com o experimento de secreção enzimática da EP24.15, conforme descrito no item 3.8 (secreção estimulada da EP24.15 sob diferentes concentrações de A23187).

A secreção estimulada da EP24.15 foi induzida durante 40 min com o ionóforo de cálcio A23187 (10 μ M), tanto na presença como na ausência do ativador de PKA forskolin (10 μ M), que foi adicionado às células 20 minutos antes da adição de A23187. O inibidor de PKA, KT5720 (0,5 μ M), e/ou o inibidor de CaM, calmidazolium (3 μ M), também foram adicionados 20 min antes da adição de A23187.

A secreção estimulada da EP24.15 foi também induzida durante 10 minutos com A23187, tanto na presença como na ausência de forskolin. Esses experimentos foram realizados para verificar se os dados obtidos eram decorrentes de uma secreção linear da EP24.15.

Todos os grupos controle e tratado foram feitos em triplicatas, em pelo menos três experimentos independentes.

3.12.1 Viabilidade celular

Testes de viabilidade foram realizados para validação dos experimentos de secreção. O intuito desses testes foi o de se certificar que a EP24.15 encontrada no meio era secretada, e não resultado de morte celular causada pelas drogas utilizadas. Para isso, utilizamos dois métodos: viabilidade celular por exclusão de azul de Trypan e MTT.

3.12.1.1 Viabilidade celular por exclusão de azul de Trypan

O azul de Trypan é capaz de penetrar em células mortas, deixando-as na cor azul, o que possibilita a diferenciação entre células vivas e mortas. Com o acréscimo de 10% de azul de Trypan ao meio de cultura, células vivas e células mortas foram contadas antes e após a incubação com o A23187 e forskolin. Após contagem, proporções foram realizadas para estabelecimento da viabilidade celular após o tratamento das células com as drogas. Experimentos foram realizados, comparando-se os grupos tratados aos grupos não tratados, para cada tipo de transfecção.

3.12.1.2 MTT

Para realização do teste de viabilidade celular utilizando o método do MTT, o experimento de secreção foi realizado conforme descrito acima. Após a incubação ou não da droga, o meio foi substituído por DMEM sem soro e sem antibiótico acrescido de 10% do reagente MTT (5mg/mL) e incubado a 37 °C por 1 hora. Em seguida, o meio foi substituído por uma solução álcool isopropílico/HCl 0,04N e agitado vigorosamente. O sobrenadante foi retirado e a absorbância lida em comprimento de onda de 570 nm. Três experimentos foram realizados, com n = 3 para cada tipo de transfecção e tratamento. Para cada tipo de transfecção a leitura das células tratadas foi comparada à leitura das células não tratadas.

3.13 Análise imunocitoquímica da co-localização EP24.15-CaM em células HEK293 através de microscopia confocal de varredura a laser

As imunocitoquímicas com dupla marcação foram realizadas para visualização da co-localização entre as proteínas CaM e EP24.15 em células HEK293. As células transfectadas conforme descrito, com os plasmídeos codificantes para CaM e EP24.15, CaM, EP24.15 e 14-3-3, ou mock, foram plaqueadas ($0,6 \times 10^5$) em lamínulas com poli-L-lisina (Sigma). Após 24 horas, as células foram ou não tratadas com Forskolin (10 µM, durante 20 min), ou com o ionóforo de cálcio A23187 (1 µM ou 10 µM, durante 3 minutos), e a imunocitoquímica foi realizada. As células foram lavadas 1 vez com tampão fosfato de sódio (PB) 0,1 M e fixadas em paraformaldeído 4% durante 15 min. Após 2 lavagens, procedeu-se ao bloqueio dos sítios antigênicos inespecíficos, incubando-se as células por 30 min a 21 °C em PB 0,1M acrescido de 10% de soro normal de cabra, 5% de BSA e 0,1% de Triton X-100. Em seguida as células foram incubadas com os anticorpos anti-EP24.15 (1:4000) feito em coelhos e anti-CaM (1:100; Sigma) feito em camundongos, diluídos em PB contendo 3% de soro normal de cabra e 0,1% de Triton X-100 durante 2 horas a 21 °C. Após 3 ciclos de lavagens

em PB 0,1 M, procedeu-se à incubação dos anticorpos secundários Cy3 anti-IgG de coelhos (1:700; Sigma) e Alexa 488 anti-IgG de camundongos (1:700; Molecular Probes) por 1 hora em temperatura ambiente, diluídos em PB 0,1 M acrescido de 0,1% de Triton X-100. Após 3 ciclos de lavagens, as lamínulas foram montadas em ProLong[®] Gold antifad reagent (Invitrogen) e submetidas à análise por microscopia confocal de varredura a laser (argônio; CLSM 410). O fluoróforo CY3 foi excitado num comprimento de onda de 568 nm e o Alexa a 488 nm. As secções ópticas de 0,8 nm obtidas foram capturadas e processadas no software Carl Zeiss LSM. As lâminas foram montadas no programa *Adobe Photoshop CS2*, sem qualquer alteração computacional.

O controle foi realizado omitindo-se os anticorpos primários. Também foi realizado pré-adsorção para o anticorpos anti-EP24.15 com 200 µg da proteína recombinante/mL e para o anticorpo anti-CaM com 500 µg da proteína recombinante/mL. As imagens foram capturadas em microscópio de fluorescência, e não sofreram alteração computacional.

3.14 Análises Estatísticas

A análise estatística foi realizada através do teste de análise de variância (ANOVA) seguido do pós-teste de Tukey. Os resultados foram expressos em média ± SEM. O nível de significância mínimo adotado foi $p < 0,05$.

3.15 Modelagem dos sítios de interação entre CaM e EP24.15.

Essas análises foram gentilmente realizadas pelo Prof. Dr. Marc J. Glucksman (Rosalind Franklin University of Medicine and Science, Chicago, USA) com o intuito de avaliar onde topologicamente a CaM poderia interagir com a EP24.15.

Resumidamente, foi utilizado um algoritmo com caráter de previsão para os locais de predição dos sítios-alvo da CaM (YAP *et al.*, 2000). Utilizando a base de dados de proteínas demonstradas a interagir com a CaM, o algoritmo permitiu a formação de uma hélice hidrofóbica. A escala de valores utilizada foi a de 0 (não ligação da CaM) a 9 (alta probabilidade de ligação da CaM). Os resultados foram demonstrados na estrutura cristalográfica da EP24.15 contida no *Protein Databank of the Research Collaboratory for Structural Bioinformatics* (PDB ID # 1s4b). A imagem foi construída e renderizada com o programa Pymol (Delano Scientific, Palo Alto, CA, USA).

4 RESULTADOS

4.1 Análise da secreção da EP24.15 em diferentes regiões cerebrais através de *slices*

Para analisar como ocorre a secreção da EP24.15 em diferentes regiões cerebrais através de *slices*, inicialmente testamos o agente glutamato. Para isso, realizamos um controle positivo para provar a funcionalidade dessa droga. Esse controle positivo foi a dosagem da ativação da bomba de $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$. A figura 8 mostra que o glutamato foi capaz de estimular tanto a $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ (painel A) como a $\text{Mg}^{2+}\text{ATPase}$ (painel B).

Apesar da secreção da EP24.15 aumentar com o decorrer do tempo, o glutamato não foi capaz de induzir-la em *slices* (fatias) de cerebelo de ratos após 30, 45 ou 60 minutos de tratamento (Figura 9A). Os ensaios de MTT, realizados para verificar a viabilidade celular, sugerem que não houve morte celular superior a 85% nesses experimentos acima (Figura 9B).

Na tentativa de estimular a secreção da EP24.15, aumentamos o influxo de cálcio para o interior do tecido, retirando o magnésio do tampão e acrescentando glicina (1 μM), com o intuito de facilitar a abertura dos canais de N-metil-D-aspartato (NMDA). Mesmo assim, a secreção da EP24.15 não foi significativamente aumentada nos grupos que receberam glutamato em tampão sem Mg^{2+} e acrescido de glicina, durante 5, 15 ou 30 minutos (Figura 10A). Os ensaios de MTT não demonstraram morte celular superior a 85% nesses experimentos também (Figura 10B).

O glutamato também não foi capaz de aumentar a secreção da enzima em *slices* de cérebro total, excluindo córtex e cerebelo (Figura 11A). No entanto, devido à demora da retirada desse tecido e, talvez por uma maior sensibilidade nesses experimentos, os ensaios de MTT mostraram uma morte celular acentuada, de aproximadamente 40% (Figura 11B).

A seguir, procuramos induzir a secreção da EP24.15 com o agente farmacológico A23187 (7,5 μ M), na presença do ativador de PKA forskolin (10 μ M). Observamos a secreção aumentada da EP24.15 ao longo do tempo, mas quando comparamos ao grupo controle, essas drogas foram capazes de induzir a secreção da EP24.15 apenas no tempo de 45 min (Figura 12A). Essa secreção estimulada não parece ser decorrente do extravasamento inespecífico do conteúdo intracelular, visto que os ensaios de MTT demonstraram que os grupos ensaiados possuíam mais de 85% de células viáveis. (Figura 12B).

Figura 8 - Controle da atividade do glutamato em *slices* de cérebros de ratos. Dosagem da Na⁺K⁺ATPase de forma indireta a partir de *slices* de cerebelo de rato. Os gráficos mostram que o glutamato foi capaz de ativar a bomba de Na⁺K⁺ATPase (A) e Mg²⁺ATPase (B). *: p<0,01 em relação ao controle.

Figura 9 - Secreção de EP24.15 em *slices* de cerebelos de ratos em tampão aCFS. Os *slices* de cerebelo de rato foram mantidos a 37 °C sob constante agitação em tampão aCFS e tratados separadamente com glutamato (50 μ M) ou o mesmo volume de tampão (controle), durante 0, 30, 45 ou 60 min. Após esses tempos o sobrenadante foi retirado e o tecido foi lisado por sonicação e mantidos em gelo até o momento dosagem da EP24.15 através do substrato fluorescente QFS. **Painel A:** A porcentagem da EP24.15 secretada foi calculada, relacionando-se o total de EP24.15 à EP24.15 secretada. Podemos observar que, a secreção da EP24.15 foi aumentada com o decorrer do tempo nos grupos controle e tratado. *: $p < 0,05$ em relação ao tempo inicial. **Painel B:** Após 60 min de incubação, não houve uma morte celular acima de 85%. Resultado representativo de 3 experimentos independentes.

Figura 10 - Secreção de EP24.15 em *slices* de cerebelos de ratos em tampão aCFS acrescido de glicina e sem Mg^{2+} . Os *slices* de cerebelo de rato foram mantidos a 37 °C sob constante agitação em tampão aCFS sem Mg^{2+} , acrescido de 1 μM de glicina e tratados separadamente com glutamato (50 μM) ou o mesmo volume de tampão (controle) durante 0, 5, 15 ou 30 min. Após esses tempos o sobrenadante foi retirado e o tecido foi lisado por sonicação e mantidos em gelo até o momento dosagem da EP24.15 através do substrato fluorescente QFS. **Painel A:** A porcentagem da EP24.15 secretada foi calculada, relacionando-se o total de EP24.15 (ajuste entre EP24.15 secretada e a contida intracelularmente) à EP24.15 secretada. Podemos observar que, a secreção da EP24.15 foi aumentada com o decorrer do tempo nos grupos controle e tratado. *: $p < 0,05$ em relação ao tempo inicial. **Painel B:** Após 30 min de incubação, não houve uma morte celular acima de 85%. Resultado representativo de 3 experimentos independentes.

Figura 11 - Secreção de EP24.15 em *slices* de cérebros de ratos com retirada de córtex e cerebelos, em tampão aCFS acrescido de glicina e sem Mg^{2+} . Os *slices* de cerebelo de rato foram mantidos a 37 °C em tampão sob constante agitação aCFS sem Mg^{2+} , acrescido de 1 μM de glicina e tratados separadamente com glutamato (50 μM) ou o mesmo volume de tampão (controle) durante 0, 5, 15 ou 30 min. Após esses tempos o sobrenadante foi retirado e o tecido foi lisado por sonicação e mantidos em gelo até o momento dosagem da EP24.15 através do substrato fluorescente QFS. **Painel A:** A porcentagem da EP24.15 secretada foi calculada, relacionando-se o total de EP24.15 (ajuste entre EP24.15 secretada e a contida intracelularmente) à EP24.15 secretada. Podemos observar que, a secreção da EP24.15 foi aumentada com o decorrer do tempo nos grupos controle e tratado. *: $p < 0,05$ em relação ao tempo inicial. **Painel B:** Após 30 min de incubação, houve uma morte celular acima de 85%. *: $p < 0,05$ em relação ao tempo inicial. Resultado representativo de 3 experimentos independentes.

Figura 12 - Secreção estimulada com A23187 e forskolin de EP24.15 em *slices* de cerebelos de ratos em tampão aCFS. Os *slices* de cerebelo de rato foram mantidos a 37 °C sob constante agitação em tampão aCFS e tratados separadamente com o ionóforo de cálcio A23187 (10 μ M) e forskolin (10 μ M), o mesmo volume de tampão aCFS (controle) durante 0, 15, 30 ou 45 min. Após esses tempos o sobrenadante foi retirado e o tecido foi lisado por sonicação e mantidos em gelo até o momento dosagem da EP24.15 através do substrato fluorescente QFS. **Painel A:** A porcentagem da EP24.15 secretada foi calculada, relacionando-se o total de EP24.15 (ajuste entre EP24.15 secretada e a contida intracelularmente) à EP24.15 secretada. Podemos observar que, a secreção da EP24.15 foi aumentada com o decorrer do tempo nos grupos controle e tratado. No entanto, as drogas estimularam a secreção de EP24.15 apenas com 45 min de incubação. *: $p < 0,05$ em relação ao tempo inicial; +: $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. **Painel B:** Após 30 min de incubação, não houve uma morte celular acima de 85%. Resultado representativo de 3 experimentos independentes.

4.2 Análise dos sequenciamentos

Através de reações de sequenciamento, com o kit comercial ET terminator (Amersham-Bioscience) e corrida no sequenciador automático de DNA (MEGABACE - Amersham-Bioscience), pudemos observar o cDNA codificante para CaM sub-clonado corretamente nos plasmídeos pGEX-4T-2 e p-Shooter. Como exemplo dos resultados obtidos, as figuras 13 e 14 mostram resultados dos sequenciamentos da CaM nos vetores pGEX e pShooter, respectivamente.

```
GTGTTTCGACCATCCTCCAAAANCAGATCTGGATTCGCGATGGATCCATGGACTG
ATCAGCTGACTGAAGAACAGATTGACATGAATTCAAGGAAGCATTCTCCCT
ATTTGATAAAGATGGGGACGGCACCATCACAACAAAGAGAGCTGGGGACTG
TCATGCGGTCACTGGGTCCANAACCCAACAGAGGCTGAACTGCAGGATATGAT
CAACGAGGTGGATGCCGACGGGAATGGCACCATTGACTTCCCAGAGTTCTT
GACTATGATGGCTAGAAAAATGAAAGACACAGATAGCGAAGAAGAAATCCG
TGAGGCATTCCGAGTCTTTGACAAGGATGGCAATGGCTACATCAGTGCGGCA
GAACTGCGCCACGTCATGACAAACCTCGGGGAAAAGCTAACAGATGAAGAA
GTAGACGAAATGATCAGAGAAGCAGATATTGATGGAGACGGACAGGTCAAC
TATGAAGAATTCGTACAGATGATGACTGCAAAATGCGGCCGCAATCGTGACTG
ACTGACGATCTGCCTCGACGCGTT
```

Figura 13 - Sequenciamento *sense* do plasmídeo p-GEX-4T-2 sub-clonado com cDNA codificante para CaM. Com esse sequenciamento, vemos que o cDNA codificante para CaM está sub-clonado corretamente no plasmídeo p-GEX-4T-2. Negrito: CaM, sublinhado: primeira metionina, itálico e realce: BamH I. Itálico e sublinhado: Not I.

```
AGACACAGCNCGTCTTCTCGCTTGCGGCTATTCAGATCCTCTTCTGAGATGAGTTT
TTGTTCTGCGGCGCATTTTGCAGTCATCATCTGTACGAATTCTTCATAGTTGAC
CTGTCCGTCTCCATCAATATCTGCTTCTCTGATCATTTTCGTCTACTTCTTCAT
CTGTTAGCTTTTCCCCGAGGTTTGTTCATGACGTGGCGCAGTTCTGCCGCACT
GATGTAGCCCTTGCCATCCTTGTCAAAGACTCGGAATGCCTCACGGATTTCT
TCTTCGCTATCTGTGTCTTTTCATTTTCTAGCCATCATAGTCAAGAACTCTGG
GAAGTCAATGGTGCCATTCCCGTCGGGATCCACCTCGTTGATCATATCCTGC
AGTTCAGCCTCTGTTGGGTTCTGACCCAGTGACCGCATGACAGTCCCCAGCT
CCTTTGTTGTGATGGTGCCGTCCCCATCTTTATCAAATAGGGAGAAAGCTTC
CTTGAATTCAGCAATCTGTTCTTCAGTCAGCTGATCAGCCATCTCGAGGTCGA
CCTGCAGTTGGACCTGGGAGTGCGCGCCTGTGGAGAGAA
```

Figura 14 - Sequenciamento *anti-sense* do plasmídeo p-Shooter sub-clonado com cDNA codificante para CaM. Com esse sequenciamento, vemos que o cDNA codificante para CaM está sub-clonado corretamente no plasmídeo p-Shooter. Negrito: CaM, itálico e realce: NotI. Itálico e sublinhado: XhoI Sublinhado: c-myc.

4.3 Purificação de proteínas

A purificação das proteínas CaM, GST, CaM-GST (CaM em fusão com GST) e EP24.15 foi um passo de suma importância para os experimentos de interação física. Essas proteínas foram expressas em sistema procarionte (*E. coli*, XL1-blue) e purificadas por cromatografia de afinidade usando coluna de glutathiona-sepharose (GE Healthcare). O SDS-PAGE a 12%, onde se pode observar a presença de uma única banda de proteína, sugerindo homogeneidade do material produzido e purificado (Figura 15).

Figura 15 - Purificação de proteínas. SDS-PAGE a 12% ilustrando a homogeneidade aparente das proteínas GST (A - 28 kDa), CaM (B - 16 kDa), CaM-GST (C - 44 kDa) e EP24.15 (D - 79 kDa) expressas em sistema procariótico (*E. coli*) através de vetor plasmidial pGEX-4T-2. A purificação foi realizada através de cromatografia de afinidade em coluna glutathiona-sepharose (10 µg). Massa molecular relativa expressa em kDa.

4.4 Ensaio de interação física (*binding*) *in vitro*

A técnica de interação (*binding*) *in vitro* foi o primeiro método utilizado para verificar a existência da interação física entre EP24.15 e CaM. A figura 16A mostra que não houve interação da EP24.15 com o controle GST (linha 2). Também não houve interação da EP24.15 com a CaM quando essa estava na conformação apocalmodulina - sem a presença de Ca^{2+} - (linha 3). No entanto, a EP24.15 foi capaz de se ligar à CaM imobilizada na resina quando essa estava em tampão com diferentes concentrações de Ca^{2+} : 0,12 μM (linha 4), 1,2 μM (linha 5), 12 μM (linha 6), 120 μM (linha 7) ou 1200 μM (linha 8). Esses resultados sugerem que a interação CaM-EP24.15 ocorre apenas na presença de Ca^{2+} .

Como controle positivo para os Western blots, 0,1 μg da EP24.15 recombinante foi adicionada ao gel (linha 1). A análise densitométrica das bandas (Figura 16B) demonstrou que, todas as concentrações de Ca^{2+} utilizadas (linhas 4-8) provocaram um aumento significativo da interação da EP24.15 com a CaM imobilizada na resina quando comparadas com a amostra sem Ca^{2+} (linha 3). Podemos observar que as concentrações de 12 μM (linha 6), 120 μM (linha 7) e 1200 μM (linha 8) provocaram uma maior interação entre essas proteínas, quando comparadas às concentrações de 0,12 μM (linha 4) ou 1,2 μM (linha 5).

Figura 16 - Interação física entre EP24.15 e CaM (*binding in vitro*). No painel A, a linha 1 mostra o controle positivo do western blot (0,1 µg da proteína recombinante EP24.15). Experimentos de interação (*binding*) *in vitro* foram realizados usando GST (5 µg; linha 2) ou CaM em fusão com GST (5 µg; linhas 3-8) imobilizados em uma matriz de glutationa-sepharose e incubadas com 5 mM de EGTA durante 30 min. As amostras foram então lavadas e incubadas em tampão contendo 150 mM de NaCl, 10 mM de Tris pH 8,0, 0,3% de Triton X-100, 0,1% de BSA e 1 mM de β-mercaptoetanol, com concentrações de cálcio: 0 µM (linha 3), 0,12 µM (linha 4), 1,2 µM (linha 5), 12 µM (linha 6), 120 µM (linha 7) e 1200 µM (linha 8). As amostras foram então incubadas com EP24.15 (10 µg) durante 18 h, a 4°C e lavadas 5 vezes no tampão descrito acima, quando foram eluidas da matriz de glutationa-Sepharose por fervura em tampão de amostra. Seguimos com SDS-PAGE a 8%, seguido de transferência à membrana de nitrocelulose, e os Western blots foram realizados usando o anticorpo anti-EP24.15 (1:3000) e as bandas visualizadas com um substrato quimioluminescente. A interação da EP24.15 com a CaM pode ser observada apenas quando houve presença de cálcio nas concentrações 0,12 µM (linha 4), 1,2 µM (linha 5), 12 µM (linha 6), 120 µM (linha 7) e 1200 µM (linha 8). No painel B, a análise densitométrica das bandas demonstrou que todas as concentrações de cálcio utilizadas (linhas 4–8) foram estatisticamente significantes em relação ao GST (linha 2) ou à amostra sem cálcio (linha 3). As concentrações de 12, 120 ou 1200 µM permitiram uma maior interação entre EP24.15 e CaM quando comparadas às concentrações de 0,12 ou 1,2 µM. Os resultados são representativos de 3 experimentos independentes com $p < 0,0001$.

4.5 Interação física entre CaM e EP24.15 medida através de ressonância plasmônica de superfície (RPS)

Inicialmente, a CaM foi imobilizada no *sensor chip* CM5, e podemos visualizar as etapas desse processo (pré-concentração, ativação da superfície, imobilização da proteína e complementação do *sensor chip* com etanolamina), com imobilização final de 1000 RU da proteína (Figura 17).

Após a imobilização da CaM, procedemos à verificação da interação entre EP24.15 e CaM por RPS. A EP24.15 ligou-se à CaM em todas as concentrações testadas (0,1 μM , 0,25 μM , 0,5 μM , 1 μM e 5 μM) quando a CaM encontrava-se na presença de Ca^{2+} (Figura 18A). Podemos ver também que mesmo na concentração mais baixa de EP24.15, a dissociação dessas proteínas é muito lenta, sugerindo alta afinidade de associação para essas proteínas. Esse dado é comprovado através da constante de dissociação (K_d) obtida pelo software do equipamento, de 0,5 μM .

O mesmo não aconteceu quando a CaM encontrava-se em tampão com EGTA, onde a EP24.15 não foi capaz de se ligar, em nenhuma concentração, à apocalmodulina (Figura 18B).

Dessa forma, após os experimentos de interação física podemos sugerir que a CaM e a EP24.15 interagem *in vitro* apenas na presença de Ca^{2+} . Essa interação tem boa afinidade, visto que o K_d foi de apenas 0,5 μM ($5 \times 10^{-7} \text{ M}$). Também podemos sugerir que a EP24.15 não é capaz de ligar-se à CaM quando essa encontra-se no estado apocalmodulina (sem ligação aos íons Ca^{2+}).

Figura 17 - Sensorgrama do processo de imobilização da CaM no *sensor chip* CM5. Para imobilizar a proteína CaM, o *sensor chip* CM5 passou pelos processos de pré-concentração da CaM (A), lavagem da superfície com NaOH 50 mM (B), mistura dos reagentes EDC e NHS (C), ativação da superfície com EDC/NHS (D), lavagem da superfície com tampão HBS-EP (E), injeção da proteína CaM em solução acetato pH 3,5 (F) e preenchimento do restante da superfície *sensor chip* com etanolamina (G). Ao final do processo, conseguimos imobilizar 1000 RU de CaM no *sensor chip* CM5.

Figura 18 - Sensorgrama de interação entre EP24.15 e CaM através de ressonância plasmônica de superfície. A CaM foi imobilizada no. Um fluxo constante foi aplicado com diferentes concentrações de EP24.15 (0,1 μ M, 0,25 μ M, 0,5 μ M, 1 μ M e 5 μ M) diluída em tampão HBS-EP a 24 °C, acrescido de 5 mM CaCl_2 (painel A) ou 5 mM EGTA (painel B). Na presença de Ca^{2+} , houve interação entre essas proteínas, com uma constante de dissociação (K_d) de 0,5 μ M. Na ausência de Ca^{2+} , não houve interação entre essas proteínas. Esses experimentos foram realizados 3 vezes de forma independente, produzindo resultados semelhantes.

4.6 Análise da secreção estimulada da EP24.15

A secreção da EP24.15 foi analisada diante de estímulos com diferentes concentrações de A23187, para que pudéssemos decidir a melhor dose a ser utilizada nos ensaios de imunocitoquímica e secreção estimulada da EP24.15.

Não identificamos secreção da enzima quando as células HEK293 foram estimuladas com 0,01 μM , 0,1 μM , 1 μM ou 5 μM de ionóforo de cálcio A23187. As concentrações de 10 μM e 20 μM de A23187 causam um aumento significativo da secreção dessa enzima quando comparados às células que não foram estimuladas. No entanto, não houve variação de secreção entre as células estimuladas com 10 ou 20 μM A23187 (Figura 19). Por outro lado, a secreção constitutiva (não estimulada) da EP24.15 foi muito baixa, sugerindo que essas células necessitam de um estímulo para secretarem EP24.15.

Figura 19 - Análise da secreção da EP24.15 estimulada com diferentes concentrações de A23187.

Células HEK293 foram mantidas em DMEM sem soro acrescido de BSA durante 1 hora, e então estimuladas com diferentes concentrações de A23187. Após 40 min de estímulo, quantificamos a EP24.15 através de dosagem de atividade enzimática com o substrato fluorescente QFS e o inibidor específico JA2. Conseguimos observar aumento da secreção da enzima com as concentrações de 10 e 20 μM de A23187, mas sem variação entre essas. Nível de significância - *: $p < 0,001$. Resultado representativo de 3 experimentos independentes.

4.7 Quantificação do Ca^{2+} intracelular

Para mensurar o aumento de cálcio intracelular citosólico ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) em células HEK293, após o tratamento com diferentes doses de A23187, fizemos uso da técnica de microscopia confocal. Através do reagente fluo,3-AM, fluoróforo sensível a Ca^{2+} , podemos visualizar a entrada do Ca^{2+} em tempo real. A figura 20A, mostra as células antes do estímulo, e após tratamento com as diferentes concentrações de A23187. No mesmo painel, podemos observar as mesmas células estimuladas com a maior concentração de A23187 para obtenção da fluorescência máxima (F_{max}). O tratamento com EGTA, responsável por quelar todo o Ca^{2+} existente, nos permitiu obter os valores de menor fluorescência (F_{min}).

Com a utilização da equação $[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d (F - F_{\text{min}}) / (F_{\text{max}} - F)$, pudemos calcular a concentração do cálcio que encontrava-se no citosol das células HEK293 estimuladas com as concentrações de A23187 (Figura 20B), dado o K_d de 450 nM para o fluoróforo fluo,3-AM. Apesar das limitações dessa técnica (as altas $[\text{Ca}^{2+}]_i$ podem ser subestimadas), As concentrações de 0,01 μM , 0,1 μM , 1 μM , 5 μM e 10 μM de A23187 ensaiadas em células HEK293 provocaram um aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de aproximadamente 90 nM, 180 nM, 1100 nM, 2750 nM e 4500 nM, respectivamente. A análise estatística revelou que a concentração de 10 μM aumentou significativamente o influxo de cálcio, quando comparado às demais concentrações (Figura 20B).

Figura 20 - Quantificação do cálcio intracelular citosólico em células HEK293 tratadas com A23187. Painel A. Imagens de microscopia confocal representativas de células HEK293 tratadas com A23187 (0,01 – 10 μM) e coradas com o fluoróforo sensível a Ca^{2+} fluo 3-AM. As imagens mostram células não estimuladas e células estimuladas com as concentrações indicadas de A23187. Adicionalmente, A23187 (10 μM) e EGTA (50 mM) foram adicionados para determinação da intensidade de fluorescência máxima (F_{max}) e mínima (F_{min}), respectivamente. **Painel B.** A equação $[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d (F - F_{\text{min}}) / (F_{\text{max}} - F)$ foi usada para determinar a $[\text{Ca}^{2+}]_i$, dado o K_d de 450 ηM para o fluoróforo fluo,3-AM. Observamos um aumento $[\text{Ca}^{2+}]_i$ decorrente do aumento da concentração de A23187. Apesar das limitações da técnica, 10 μM de A23187 foi capaz de causar um aumento significativo do $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (4500 ηM), comparado às concentrações de 0,01 a 5 μM de A23187 (*: $p < 0,05$).

4.8 Controle da eficiência de transfecção

Os controles da eficiência de transfecção, nesse caso realizadas com o lipossoma linhagem específico para células HEK293, HEKFectin[®], é uma etapa importante para os experimentos que ocorrem com células transfectadas.

Através de microscopia de fluorescência de células HEK293 transfectadas com o plasmídeo pEGFP-N1 pudemos comprovar a eficiência das transfecções (Figura 21). Podemos observar que as células transfectadas com esse plasmídeo apresentam-se extensamente verdes (painel A), enquanto as não transfectadas não apresentam qualquer marcação verde. Os núcleos (painéis A' e B' para células transfectadas e não transfectadas, respectivamente) foram visualizados através da marcação com Hoechst 33342, do Kit *Image-iTTM LIVE Plasma Membrane and Nuclear Labeling Kit* (Molecular Probes). Essas imagens sugerem que a eficiência de transfecção do lipossoma linhagem específico HEKFectin[®] é maior que 95%.

Figura 21 - Eficiência de transfecção com o uso do lipossoma HEKFectin[®]. As células HEK293 foram transfectadas com o plasmídeo pEGFP vazio. As células transfectadas com esse plasmídeo apresentam intensa marcação verde (painel A), enquanto as células não transfectadas não apresentaram nenhuma marcação (painel B). Para visualização das células, o núcleo foi marcado com Hoechst 33342, do Kit *Image-iTTM LIVE Plasma Membrane and Nuclear Labeling Kit* (Molecular Probes, CA, EUA), e é visto nos painéis A' e B' para células transfectadas e não transfectadas, respectivamente. Podemos considerar a eficiência de transfecção de aproximadamente 100%.

4.9 Controle da superexpressão das proteínas estudadas

A superexpressão das proteínas estudadas, outro passo importante para avaliar os dados obtidos, foi comprovada através de western blot com o uso de anticorpos específicos anti-EP24.15 ou anti-CaM. A figura 22 ilustra a superexpressão da EP24.15 em células HEK293 transitoriamente transfectadas com plasmídeos codificantes para CaM (linha B), EP24.15 (linha C), CaM e EP24.15 (linha D), CaM e 14-3-3 (linha E), CaM e 14-3-3 e EP24.15 (linha F) ou mock (linha G). Como controle da especificidade do anticorpo, utilizamos 0,1 µg da proteína EP24.15 recombinante (linha A). As demais bandas demonstradas são provenientes de 100 µg do extrato celular total das células que foram transfectadas com plasmídeos não codificantes para EP24.15 (linhas B, E e G), e 10 µg de extrato celular total das células que foram transfectadas com plasmídeos codificantes para EP24.15 (linhas C, D e F).

Figura 22 - Superexpressão da EP24.15 em células transfectadas transitoriamente. Células HEK293 foram transfectadas transitoriamente com plasmídeos codificantes para CaM (linha B), EP24.15 (linha C), CaM e EP24.15 (linha D), CaM e 14-3-3 (linha E), CaM e 14-3-3 e EP24.15 (linha F) e plasmídeo vazio – mock (linha G) . Após 48 horas da transfecção, o extrato de celular total foi realizado e as proteínas (100 µg das células que foram transfectadas com plasmídeos não codificantes para EP24.15 e 10 µg de extrato celular total das células que foram transfectadas com plasmídeo codificante para EP24.15) foram separadas por SDS-PAGE a 8% e transferidas para membrana de nitrocelulose. Os Western blots foram realizados utilizando o anticorpo específico anti-EP24.15 (1:3000) feito em coelho, seguido pelo anticorpo secundário anti-IgG de coelho, conjugado a HRP. As bandas foram visualizadas por quimioluminescência. Como controle da especificidade do anticorpo, utilizamos 0,1 µg de EP24.15 recombinante (linha A).

A figura 23 mostra a superexpressão da CaM em células HEK293 transitoriamente transfectadas com plasmídeos codificantes para CaM (linha B), EP24.15 (linha C), CaM e EP24.15 (linha D), CaM e 14-3-3 (linha E), CaM e 14-3-3 e EP24.15 (linha F) ou mock (linha G). Como controle da especificidade do anticorpo, utilizamos 1 µg da proteína CaM recombinante (linha A). As bandas demonstradas são derivadas de 100 µg de extrato de proteína total das células transfectadas.

Figura 23 - Superexpressão da CaM em células transfectadas transitoriamente. Células HEK293 foram transfectadas transitoriamente com plasmídeos codificantes para CaM (linha B), EP24.15 (linha C), CaM e EP24.15 (linha D), CaM e 14-3-3 (linha E), CaM e 14-3-3 e EP24.15 (linha F) e plasmídeo vazio – mock (linha G). Após 48 horas da transfecção, o extrato celular total foi realizado e as proteínas (100 µg) foram separadas por SDS-PAGE a 15% e transferidas para membrana de nitrocelulose. O imunoblotting foi realizado utilizando o anticorpo específico anti-CaM.15 feito em camundongo (1:1000) seguido pelo anticorpo secundário biotilado anti-IgG de camundongo. A reação foi revelada com o uso do kit ABC (*Avidin and Biotinylated horseradish peroxidase mocomolecular Complex*). As bandas foram visualizadas por quimioluminescência. Como controle da especificidade do anticorpo, utilizamos 1 µg de CaM recombinante (linha A).

4.10 Análise da secreção da EP24.15 em células HEK293 transfectadas e submetidas a diversos tratamentos

A análise da secreção da EP24.15 em células HEK293 transfectadas e submetidas a diversos tratamentos foi realizada para corroborar a hipótese de que a CaM, assim como a 14-3-3ε (CARREÑO *et al.*, 2005) desempenha papel importante na secreção da enzima. Analisamos a secreção estimulada da EP24.15 em células superexpressando as proteínas CaM, EP24.15, CaM e EP24.15, CaM e 14-3-3ε, além

de CaM, EP24.15 e 14-3-3 ϵ , e essas foram comparadas às células transfectadas com o plasmídeo controle (mock).

Não obtivemos secreção da EP24.15 em nenhum dos grupos celulares quando as células foram tratadas com A23187 ou A23187 e forskolin durante 10 min. Esse dado sugere que não há estocagem dessa enzima, e a secreção ocorre no decorrer do estímulo apresentado.

Após estimularmos essas células com A23187 durante 40 min, a secreção da EP24.15 foi significativamente maior nas células superexpressando CaM, EP24.15, CaM e EP24.15, CaM e 14-3-3 ϵ , e CaM, 14-3-3 ϵ e EP24.15, quando comparadas às células mock. A superexpressão apenas de CaM, aumenta a secreção estimulada da EP24.15 em células HEK293 (Figura 24). O co-tratamento dessas células com A23187 e o ativador de PKA, forskolin, produz um efeito sinérgico na secreção dessa enzima. Como esperado, a superexpressão de EP24.15 foi suficiente para causar um aumento proporcional em sua secreção sobre estímulo com A23187, o qual também foi potencializado pelo forskolin. No entanto, a superexpressão de CaM e EP24.15 nessas células não produziu aumento na secreção da EP24.15 além daquele já causado por qualquer dessas proteínas, sugerindo que a secreção estimulada da EP24.15 possa ser limitada por proteínas adicionais. Como mencionado anteriormente, a proteína 14-3-3 ϵ foi previamente demonstrada facilitar a secreção da EP24.15 (CARRENO *et al.*, 2005). Dessa forma, a secreção da EP24.15 estimulada por A23187 é aumentada em células HEK293 superexpressando CaM, 14-3-3 ϵ e EP24.15, e novamente potencializada pela adição de forskolin. O efeito sinérgico do forskolin e do A23187 foi completamente bloqueado pelo agente KT5720, inibidor específico de PKA, enquanto o efeito estimulatório do A23187 foi apenas parcialmente inibido por esses compostos (Figura 24).

O uso de calmidazolium (CMZ), inibidor específico de CaM, bloqueou parcialmente a secreção estimulada da EP24.15 por A23187 (Figura 25). Interessantemente, o tratamento com ambos KT5720 e CMZ praticamente anulou a secreção estimulada dessa enzima. Tomados em conjunto, esses dados sugerem que a

CaM é uma das proteínas envolvidas na regulação da secreção estimulada da EP24.15, que por sua vez depende da ativação de PKA.

Figura 24 - Secreção estimulada da EP24.15. A secreção estimulada da EP24.15 foi avaliada em células HEK293 transfectadas com plasmídeos codificantes para: i) mock (plasmídeo vazio – células controle), ii) CaM, iii) EP24.15, iv) CaM e EP24.15; v) CaM e 14-3-3ε ou vi) CaM, 14-3-3ε e EP24.15. Após 48 da transfecção, as células foram equilibradas por 1 h em meio DMEM sem soro contendo 0,1% de BSA em estufa. Esse meio foi então substituído por meio equilibrado nas mesmas condições, contendo 10 μ M de A23187. Como indicado, as células foram pré-incubadas com 10 μ M de forskolin e/ou 0,5 μ M de KT5720 por 20 min. Esses compostos estiveram presentes também durante o estímulo com A23187. O meio foi então coletado, e foi feita a dosagem da atividade da EP24.15 usando o substrato QFS. A secreção da EP24.15 é aqui expressa como porcentagem da enzima secretado, baseado em sua atividade total mensurada no correspondente homogenato celular. Um aumento significativo na secreção da EP24.15 pode ser observado em todas as condições experimentais, comparado às células mock (#, $p < 0,05$). As células superexpressando CaM, 14-3-3ε e EP24.15, quando estimuladas com A23187, secretaram mais enzima quando comparadas aos demais grupos celulares (+, $p < 0,05$). Observamos que o agente forskolin aumentou significativamente a secreção dessa enzima (*, $p < 0,001$). Os dados são expressos em média $\pm$ SD de três experimentos independentes. Os dados foram analisados por ANOVA seguido do teste de Tukey.

Figura 25 - CaM e a secreção estimulada da EP24.15. A secreção estimulada da EP24.15 foi avaliada em células HEK293 transfectadas com plasmídeos codificantes para: i) mock (plasmídeo vazio – células controle), ii) CaM, iii) EP24.15, iv) CaM e EP24.15; v) CaM e 14-3-3ε ou vi) CaM, 14-3-3ε e EP24.15. Após 48 h da transfecção, as células foram equilibradas por 1 h em meio DMEM sem soro contendo 0,1% de BSA em estufa. Esse meio foi então substituído pelo mesmo meio que também foi equilibrado nas mesmas condições, contendo 10 μM de A23187. Como indicado, as células foram pré-incubadas com 3 μM de calmidazolium (CMZ) e/ou 0,5 μM de KT5720 por 20 min. Esses compostos estiveram presentes também durante o estímulo com A23187. O meio foi então coletado, e foi feita a dosagem da atividade da EP24.15, usando o substrato QFS. A secreção da EP24.15 é aqui expressa como porcentagem da enzima secretado, baseado em sua atividade total mensurada no correspondente homogenato celular. Um aumento significativo na secreção da EP24.15 pode ser observado em todas as condições experimentais, comparado às células mock (#, $p < 0,05$). As células superexpressando CaM, 14-3-3ε e EP24.15 quando estimuladas com A23187, secretaram mais enzima quando comparadas aos demais grupos celulares (+, $p < 0,05$). O inibidor de CaM, CMZ, sozinho ou juntamente com o inibidor de PKA, KT5720, diminuiu a secreção da EP24.15, mesmo com o estímulo de A23187 (*, $p < 0,001$). Os dados são expressos em média $\pm$ SD de três experimentos independentes. Os dados foram analisados por ANOVA seguido do teste de Tukey.

Nenhum dos procedimentos anteriores causou significativa morte celular, visto que, através das técnicas de exclusão de azul de Trypan e MTT, as células tratadas com qualquer combinação dessas drogas tiveram viabilidade superior a 98%. Essa viabilidade celular sugere que a secreção da EP24.15 não é decorrente do extravasamento inespecífico do citoplasma, ocasionado por morte celular generalizada após tratamento com as drogas ensaiadas.

4.11 Análise imunocitoquímica da co-localização EP24.15-CaM em células HEK293 através de microscopia confocal de varredura a laser

As análises da co-localização entre as proteínas EP24.15 e CaM em células HEK293 foi realizada através de reações imunocitoquímicas para dupla marcação. Os ensaios foram realizados em células HEK293 mock (Figuras 26 e 27 A, B, G, H, M e N) ou superexpressando EP24.15 e CaM (Figuras 26 e 27 C, D, I, J, O e P) ou CaM, 14-3-3 ϵ e EP24.15 (Figuras 26 e 27, E, F, K, L, Q e R). Podemos observar a EP24.15 marcada em vermelho (Figuras 26 e 27 A – F), e a CaM marcada em verde (Figuras 26 e 27 G – L). Podemos analisar a co-localização dessas proteínas após sobreposição das imagens, resultando em pontos amarelos que indicam locais celulares onde ambas proteínas encontram-se (Figuras 26 e 27 M – R).

Inicialmente, realizamos ensaios imunocitoquímicos em células HEK293 previamente transfectadas, sem tratamento. Verificamos discreta co-localização nas células mock (Figura 26M), ou nas células que superexpressam CaM e EP24.15 (Figura 26O), que se torna mais pronunciada quando as células superexpressam também a proteína 14-3-3 ϵ (Figura 26Q). O tratamento com forskolin, ativador da proteína quinase A (PKA), provocou aumento na co-localização entre EP24.15 e CaM em células mock (Figura 26N) ou superexpressando CaM e EP-24-15 (Figura 26P). A co-localização entre essas proteínas torna-se mais evidente ainda nas células que superexpressam CaM, 14-3-3 ϵ e EP24.15 (Figura 26R).

Interessante, a co-localização intracelular das proteínas EP24.15 e CaM aumenta consideravelmente quando há entrada de cálcio nas células, ocasionado pelo tratamento com 1 μ M de A23187, concentração incapaz de induzir a secreção da EP24.15 (Figuras 23 e 24). Nessa condição, as células mock apresentam diversos pontos de co-localização entre essas proteínas (Figura 27M), que aparecem aumentados quando as células superexpressam as proteínas CaM e EP24.15 (Figura 27O) ou CaM, 14-3-3 ϵ e EP24.15 (Figura 27Q). Um grande aumento da co-localização dessas proteínas foi causado quando as células foram tratadas com 10 μ M de A23187 durante 3 min (Figura 27N), tempo insuficiente para causar a secreção da EP24.15, em células mock. Novamente as células que superexpressam CaM e EP24.15 apresentaram extensa co-localização dessas proteínas (Figura 27P), o que é largamente aumentado quando as células também superexpressavam a proteína 14-3-3 ϵ (Figura 27R). Dessa forma, a co-localização das proteínas EP24.15 e CaM parece ser controlada pelo aumento de cálcio intracelular, mesmo em concentrações e condições que não são suficientes para induzir a secreção da enzima.

Figura 26 - Co-localização da EP24.15 e CaM em células HEK293. Células HEK293 foram transitoriamente transfectadas com o vetor pCMV modificado. As células nos painéis A, B, G e H foram transfectadas com o vetor vazio (mock). As células nos painéis C, D, I e J foram co-transfectadas com os plasmídeos expressando EP24.15 e CaM. As células nos painéis E, F, K e L foram co-transfectadas com os plasmídeos expressando EP24.15, CaM e 14-3-3. As células nos painéis B, D, F, H, J e L foram tratadas com 10 μ M de forskolin. As células foram analisadas por microscopia confocal. Podemos ver a localização da EP24.15 em vermelho (painéis A–F) e da CaM em verde (painéis G–L). Os painéis M–R representam a sobreposição das imagens entre os painéis A e G (painel M), B e H (painel N), C e I (painel O), D e J (painel P), E e K (painel Q) ou F e L (painel R). Podemos observar que o tratamento com forskolin causou um aumento na co-localização entre as proteínas EP24.15 e CaM (painéis N, P e R), a qual é mais evidente nas células que superexpressam EP24.15, CaM e 14-3-3 (painel R). As setas indicam a região da imagem em destaque (canto inferior esquerdo). Os dados são representativos de 3 experimentos independentes.

Figura 27 - Aumento de cálcio intracelular causa aumento da co-localização entre EP24.15 e CaM. Células HEK293 foram transitoriamente transfectadas com o vetor pCMV modificado. As células nos painéis A, B, G e H foram transfectadas com o vetor vazio (mock). As células nos painéis C, D, I e J foram co-transfectadas com os plasmídeos expressando EP24.15 e CaM. As células nos painéis E, F, K e L foram co-transfectadas com os plasmídeos expressando EP24.15, CaM e 14-3-3. As células foram tratadas com 1 μ M de A23187 (painéis A, C, E, G, I e K) ou 10 μ M de A23187 (B, D, F, H, J e L). As células foram analisadas por microscopia confocal. Podemos ver a localização da EP24.15 em vermelho (painéis A–F) e da CaM em verde (painéis G–L). Os painéis M–R representam a sobreposição das imagens entre os painéis A e G (painel M), B e H (painel N), C e I (painel O), D e J (painel P), E e K (painel Q) ou F e L (painel R). Podemos observar que o tratamento com forskolin causou um aumento na co-localização entre as proteínas EP24.15 e CaM (painéis N, P e R), a qual é mais evidente nas células que superexpressam EP24.15, CaM e 14-3-3 (painel R). As setas indicam a região da imagem em destaque (canto inferior esquerdo). Os dados são representativos de 3 experimentos independentes.

Como controle das reações, nenhuma marcação pôde ser visualizada nas células que tiveram omissão dos anticorpos primários (Figura 28A e 28B) ou adsorção de EP24.15 ou CaM (Figura 28C).

Figura 28 - Microscopia de fluorescência: controle da imunocitoquímica de células HEK293 para CaM e EP24.15. A: supressão do anticorpo primário anti-EP24.15; B: supressão do anticorpo primário anti-CaM; C: pré-adsorção – 200 µg/mL de proteína recombinante EP24.15 (vermelho) e 500 µg/mL de CaM (verde). Azul: núcleo marcado com Hoechst 33342, do Kit Image-iT™ LIVE Plasma Membrane and Nuclear Labeling Kit.

4.12 Modelagem dos sítios de interação da CaM na EP24.15

Adicionalmente, realizamos experimentos em conjunto com o Prof. Dr. Marc J. Glucksman (Rosalind Franklin University of Medicine and Science, Chicago Medical School) para modelagem dos sítios de interação entre CaM e EP24.15.

Para isso, a sequência da EP24.15 foi objeto para a base de dados do algoritmo da CaM, e apenas a mais alta propensão de interação com a CaM foi considerada. Como podemos ver na figura 29, há 2 regiões separadas de alta propensão de ligação com a CaM, os aminoácidos 141-152 e 261-271, separados por aproximadamente 110 resíduos (Figura 29A). Quando essas duas regiões distintas são observadas na estrutura cristalográfica da EP24.15, compreendem alfa-hélices na superfície da enzima completamente distantes do sítio ativo da enzima (Figura 29B). Observamos que o

zinco, descrito como centro do sítio catalítico, é um pouco distante da região de ligação da CaM (aproximadamente 26 Å do centro dos aminoácidos 261-271 e 30 Å do centro dos aminoácidos 141-152; figura 29B), o que pode favorecer uma interação sem prejuízo para a hidrólise de substratos.

Figura 29 - Descrição da propensão de sítios de ligação da CaM na estrutura da EP24.15. Painel A. Análise do sítio de ligação do banco de dados da CaM usando a EP24.15 como sequência alvo (aminoácidos com maior propensão em vermelho). **Painel B.** Modelo estrutural das sequências de ligação da CaM baseada nas coordenadas da EP24.15 (PDB ID 1S4B). As regiões em vermelho representam as porções de 2 hélices adjacentes da EP24.15 que foram encontradas para ligação da CaM (no painel A). A esfera laranja representa o íon zinco do sítio catalítico da EP24.15. A renderização da imagem foi realizada no programa Pymol (Delano Scientific).

5 DISCUSSÃO

A endopeptidase EC 3.4.24.15 (EP24.15) é uma enzima presente especialmente no cérebro, testículos e rins de todos os mamíferos (CHU e ORLOWSKI, 1985). A EP24.15 desempenha importantes funções intracelulares, como atuação na apresentação de antígenos (PORTARO *et al.*, 1999; SILVA *et al.*, 1999; KIM *et al.*, 2003; YORK *et al.*, 2003) e formação e degradação de peptídeos biologicamente ativos (CUNHA *et al.*, 2008; BERTI *et al.*, 2009). Essa enzima também desempenha importantes papéis no meio extracelular, como a degradação de neuropeptídeos (SUGIURA *et al.*, 1992; MCKIE *et al.*, 1993; VINCENT *et al.*, 1997; CHAPPELL *et al.*, 2000; SHRIMPTON *et al.*, 2002; SANDEN *et al.*, 2008; WU *et al.*, 2009).

Nesse estudo analisamos como a secreção da EP24.15 ocorre fisiologicamente, em *slices* (fatias) de cérebros de ratos, bem como por células em cultura. Com base no conjunto de dados desses experimentos, observamos que a secreção dessa enzima ocorre tanto de forma constitutiva como regulada. A via de secreção constitutiva opera continuamente, não necessitando de sinal externo, e ocorre em todas as células, especialmente naquelas não especializadas em secreção (WIELAND *et al.*, 1987; EMR *et al.*, 2008). A secreção da EP24.15 em *slices* de cérebros de ratos ocorre continuamente, sem necessidade de qualquer estímulo. Nesse caso, a EP24.15 poderia se difundir pelas sinapses através da “transmissão por volume”. Nesse último mecanismo de comunicação celular extra-sináptica tridimensional, os íons e moléculas se difundem a pequenas ou grandes distâncias através do fluido cérebro-espinal. A difusão das moléculas depende do volume da substância, tamanho das fendas extracelulares, presença de membranas, processos neuronais e variação das moléculas da matriz extracelular (AGNATI *et al.*, 1995; SYKOVA, 2004). Dessa forma, a EP24.15 poderia estar presente nas sinapses, amplamente distribuída no cérebro. Sendo assim, de forma similar ao que acontece à acetilcolina, que começa a ser degradada pela acetilcolinesterase no mesmo instante que é liberada na fenda sináptica (FAGERLUND e ERIKSSON, 2009), os neuropeptídeos substratos da EP24.15

poderiam ser degradados por essa enzima de forma a manter uma ação rápida em seus receptores. Assim, substrato e enzima estariam co-localizados, condição importante quando consideramos a relevância biológica do fenômeno.

Para avaliar se a entrada de cálcio em *slices* de cérebros de ratos poderia estimular a secreção da EP24.15, utilizamos inicialmente o glutamato. O glutamato é o neurotransmissor excitatório mais abundante no sistema nervoso central de vertebrados, e é ativamente captado e armazenado em vesículas sinápticas. É um neurotransmissor de ação rápida, formado a partir do α -oxoglutarato, intermediário do ciclo de Krebs, que opera em canais NMDA (N-metil-D-aspartato), de AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato), e cainato. Esses receptores estão diretamente acoplados a canais catiônicos (GUO *et al.*, 2009). Quando o canal ligado ao receptor NMDA se abre, há um grande influxo de Ca^{2+} (RIVEROS e ORREGO, 1986; SPRENGEL e SEEBURG, 1993), necessário para secreção da EP24.15 (FERRO *et al.*, 1999; PETERS *et al.*, 2001).

Em nossos estudos, realizados em cerebelo de ratos, a administração de glutamato em doses fisiológicas (50 μM) não aumenta a secreção da EP24.15 além da secreção constitutiva. No entanto, a concentração de EP24.15 é menor no cerebelo que em outras áreas (MASSARELLI *et al.*, 1999). Além disso, a localização dos receptores NMDA também pode ter influenciado esse resultado. Os receptores NMDA de glutamato são divididos em subunidades, sendo comuns no córtex, gânglios da base e vias sensoriais. De modo geral, os receptores R1 são encontrados em maior quantidade no córtex cerebelar, hipocampo e mesencéfalo (TAKAI *et al.*, 2003), sendo três a dez vezes mais concentrados no córtex cerebral que no cerebelo ou ponte de ratos (BROSE *et al.*, 1993). Os receptores R2A, R2B e R2C são encontrados em maior quantidade no hipocampo e córtex temporal. No cerebelo, nenhum receptor R2B, e pouca quantidade dos outros foi encontrada (TAKAI *et al.*, 2003). Apesar disso, os experimentos de *slices* foram inicialmente realizados em cerebelo devido à rapidez em seu processamento, importante para a viabilidade tecidual.

Os experimentos de *slices* realizados com o cérebro inteiro, com retirada apenas do córtex e cerebelo apresentaram intensa morte celular, que pode ser atribuída especialmente à demora de dissecação e processamento do tecido. É sabido que o glutamato pode provocar morte celular (DESSI *et al.*, 1993; ANKARCRONA *et al.*, 1995), e que cada tecido possui sensibilidades diferentes a essas drogas (GUO *et al.*, 2009). No entanto a diminuição da viabilidade tecidual encontrada não foi decorrente da administração do glutamato, pois a mesma viabilidade foi encontrada no grupo controle. Quando uma célula morre por necrose, sua membrana plasmática se rompe, liberando todo o seu conteúdo no meio (ALBERTS *et al.*, 2008). Apesar dessa intensa morte celular, não observamos um aumento proporcional da EP24.15 no sobrenadante (secreção). Esses resultados nos são consistentes com estudos anteriores que sugerem que a EP24.15 não está solúvel no citosol, e sim complexada a outras proteínas e/ou ao citoesqueleto (GARRIDO *et al.*, 1999; MASSARELLI *et al.*, 1999; FONTENELENETO *et al.*, 2001; YAMAMOTO *et al.*, 2003).

Ainda para verificar o efeito de entrada de cálcio provocada pela administração do glutamato na secreção estimulada da EP24.15, realizamos novos experimentos, modificando o tampão aCFS. Adicionamos glicina e retiramos o Mg^{2+} desse tampão, visando a abertura máxima dos canais NMDA. Essa modificação foi realizada porque, para a abertura desses canais é necessário haver baixa concentração de glicina e/ou D-serina (SCHELL, 2004). Em contrapartida, esses canais são bloqueados por Mg^{2+} (GONZALES, 1992; LEE e FAIN, 1992). Sem a abertura desse canal, não haveria influxo de Ca^{2+} e, consequentemente, a secreção de EP24.15 não aconteceria. Mesmo com essas modificações, o glutamato foi incapaz de estimular a secreção da EP24.15 em *slices* de cerebelo de ratos, pois observamos apenas a secreção constitutiva dessa enzima. A literatura descreve que o uso entre 50 μM e 100 μM de glutamato ocasiona um influxo de Ca^{2+} de 300 a 400 ηM em células de neurônios piramidais de hipocampo (GLAUM *et al.*, 1990; RANDALL e THAYER, 1992), estriato (MURPHY *et al.*, 1987) ou córtex (WAHL *et al.*, 1989). Observamos nesse estudo que, em células HEK293, é necessário que haja um influxo de Ca^{2+} de 2500 ηM para que a EP24.15

seja secretada. Dessa forma, o influxo de Ca^{2+} provocado pelo glutamato em *slices* de cerebelos de ratos pode não ter sido suficiente para ocasionar a secreção da EP24.15.

Para corroborar essa hipótese, a administração do ionóforo de cálcio A23187 e o ativador de PKA forskolin foram administrados em *slices* de cerebelo de ratos. Em células HEK293, a concentração de A23187 utilizada (10 μM) foi capaz de estimular a secreção da EP24.15. Em *slices*, essas drogas foram capazes de induzir sua secreção após 45 min de estímulo. Apesar de não termos demonstrado em nossos estudos que a EP24.15 é fosforilada, é conhecido que o agente forskolin é responsável por ativar a formação do cAMP, que por sua vez ativa PKA (AWAD *et al.*, 1983). Dessa forma, a fosforilação da EP24.15 pode ocorrer através da ativação de PKA, que é responsável por fosforilar proteínas como a EP24.15 na posição S644 (CARRENO *et al.*, 2005). Portanto, esses dados estão de acordo com a descrição da literatura, onde foi demonstrado que a secreção da EP24.15 é dependente de sua fosforilação, já que a mutação no resíduo S644 causou a inibição da secreção, ao passo que sua fosforilação causou um aumento da secreção (TULLAI *et al.*, 2000; CARRENO *et al.*, 2005). Assim sendo, esses dados indicam que, além do alto influxo de Ca^{2+} , fisiologicamente, a EP24.15 necessita ser fosforilada para ser secretada.

Dessa forma, o presente grupo de resultados sugere que nas regiões estudadas de cérebros de ratos, a EP24.15 é secretada pela via constitutiva, na qual não há necessidade de estímulo de indução para a secreção (WIELAND *et al.*, 1987; EMR *et al.*, 2008). Por outro lado, o estímulo de entrada exacerbada de cálcio, juntamente com a ativação da PKA, que seria responsável pela fosforilação da EP24.15, é capaz de causar uma maior secreção dessa enzima.

O mecanismo pelo qual a EP24.15 atravessa a membrana plasmática permanece desconhecido. Sabe-se que a EP24.15 não contém um peptídeo sinal para regular sua entrada na via secretória clássica, e também não possui qualquer sequência hidrofóbica para ancorá-la diretamente ou fazê-la passar pela membrana plasmática (PIEROTTI *et al.*, 1990). Estudos anteriores revelaram que a secreção da EP24.15 utiliza a via do retículo endoplasmático rugoso - aparelho de Golgi, visto que o uso de brefeldin A

(bloqueador do tráfego do RER para o aparelho de Golgi) e nocodazole (disruptor de microtúbulos, os quais são responsáveis pela movimentação das vesículas do aparelho de Golgi para a membrana plasmática) inibiram sua secreção estimulada (FERRO *et al.*, 1999). Consistente com essa hipótese, a imunohistoquímica em microscopia eletrônica demonstrou que a EP24.15 é associada à face citosólica do retículo endoplasmático, aparelho de Golgi e membrana plasmática (FONTENELE-NETO *et al.*, 2001).

Existem hipóteses que sugerem que proteínas solúveis que não possuem sinal de entrada para a via secretória clássica são secretadas através da via secretória constitutiva. Essas proteínas atravessam a membrana plasmática através de micro domínios de membrana, conhecidos como *lipid rafts* (LARA-LEMUS *et al.*, 2006). *Lipid rafts* são regiões dinamicamente arranjadas da membrana plasmática, ricas em fosfolípídeos, esfingolípídeos e colesterol, conhecidas por facilitar interações proteína-proteína e proteína-lípide (LUCERO e ROBBINS, 2004; MISHRA e JOSHI, 2007). Estudos revelam que a EP24.15 está presente nos *lipid rafts* em cultura de células (JESKE *et al.*, 2003; 2004). Também é conhecido que essa enzima é secretada constitutivamente em células hipotalâmicas de camundongos através dos *lipid rafts* (JESKE *et al.*, 2004). Dessa forma, é possível que a EP24.15 trafegue até a membrana plasmática ancorada a outras proteínas, e então seja secretada constitutivamente através dos *lipid rafts* de membrana.

É conhecido que o peptídeo TAT do vírus HIV (YGRKKRRQRRR) é capaz de internalizar grandes moléculas a ele ligadas. Sabe-se que esse peptídeo é fortemente positivo e essa característica lhe confere a habilidade de atravessar a membrana plasmática (YANG *et al.*, 2002). Dessa forma, podemos elocubrar que algumas proteínas podem possuir *pockets* (regiões não sequenciais das proteínas onde resíduos de aminoácidos localizam-se muito próximos na estrutura terciária) carregados positivamente, que facilitem a travessia da proteína pela membrana plasmática, através de ligação à glicoaminoglicanos presentes nos *lipid rafts*. Quando analisamos a estrutura tridimensional da EP24.15, observamos que há regiões que são carregadas

positivamente. Apesar de serem pequenas, essas regiões talvez possam ser responsáveis pela travessia da EP24.15 pela membrana plasmática.

Intracelularmente, é conhecido que a EP24.15 interage com a proteína *scaffold* 14-3-3ε, que pode ser uma proteína na qual a EP24.15 trafega ancorada até a membrana plasmática. A regulação dessa interação é mediada por proteína quinase A (PKA), que é importante para a secreção estimulada da EP24.15 (CARRENO *et al.*, 2005). Um *screening* realizado em nosso laboratório, utilizando o sistema duplo-híbrido em leveduras sugeriu que a EP24.15 pode também interagir com a calmodulina I (CaM).

Nesse estudo, caracterizamos uma nova interação funcional entre as proteínas EP24.15 e CaM, a qual aumenta a secreção estimulada da EP24.15. Consequentemente, a interação com a CaM tem importante significado fisiológico, contribuindo para a liberação da EP24.15 no ambiente extracelular, onde essa enzima funciona no metabolismo de neuropeptídeos fisiologicamente relevantes (ORLOWSKI *et al.*, 1983; MOLINEAUX e AYALA, 1990; KEST *et al.*, 1991; PIEROTTI *et al.*, 1991; KEST *et al.*, 1992; CARDOZO e ORLOWSKI, 1993; LEW *et al.*, 1997; SMITH, SHRIMPTON *et al.*, 2000; JESKE *et al.*, 2006; ROBERTS *et al.*, 2007). O ensaio de interação física entre EP24.15 e CaM demonstrou que essas proteínas interagem apenas na presença de Ca^{2+} , sugerindo que essa interação pode ser dinamicamente regulada. Nós observamos essa interação em tempo real, através do uso da técnica de ressonância plasmônica de superfície, e estimamos o K_d dessa reação de 0,52 μM . Essa interação é caracterizada por uma rápida associação e uma baixa dissociação, a qual pode ser fisiologicamente relevante para a sinalização celular, já que sua associação envolve um aumento de cálcio intracelular. A co-localização entre EP24.15 e CaM também foi observada no citoplasma de células HEK293, particularmente em células que superexpressavam essas duas proteínas e a proteína 14-3-3ε. A co-localização entre EP24.15-CaM é menos evidente nas células que não superexpressavam essas proteínas, o que provavelmente está relacionado ao nível relativamente baixo de expressão dessas proteínas em células HEK293. No entanto, o valor de K_d estimado para a interação entre EP24.15 e CaM é consistente à hipótese

que essas moléculas interagem fisiologicamente. Além disso, a co-localização intracelular da EP24.15 e CaM é fortemente induzida pelo tratamento das células HEK293 com o ionóforo de cálcio A23187, e a um grau inferior com forskolin, sugerindo novamente a regulação e o significado funcional dessa associação.

Interessantemente, a sinalização dinâmica do cálcio em células HEK293 é, em parte, mediada pela habilidade desse íon em regular outros segundos mensageiros, como AMP cíclico (WILLOUGHBY e COOPER, 2006). Isso sugere que um aumento intracelular na concentração de cálcio ativarão outros segundos mensageiros, incluindo AMP cíclico (cAMP) (WILLOUGHBY e COOPER, 2006). Assim, um aumento nas concentrações intracelulares de cálcio irá também ativar adenilato ciclase, aumentando os níveis de cAMP e ativando PKA (WALSH *et al.*, 1968). A PKA está implicada em muitos processos celulares, incluindo exocitose (SEINO e SHIBASAKI, 2005), modulação de outras proteínas quinases, regulação da concentração intracelular de cálcio e regulação da transcrição (TASKEN e AANDAHL, 2004). Além disso, tem sido mostrado que a EP24.15 é fosforilada por PKA no resíduo Ser⁶⁴⁴, o qual também regula sua interação com a proteína arcabouço 14-3-3ε e facilita a secreção da EP24.15 (TULLAI *et al.*, 2000; CARRENO *et al.*, 2005). Também foi demonstrado que a CaM também interage com a 14-3-3ε na presença de cálcio (LUK *et al.*, 1999). Nossos experimentos mostraram a co-localização entre EP24.15 e CaM, e que a secreção da EP24.15 estimulada por A23187 é maior nas células HEK293 que superexpressam 14-3-3ε juntamente com EP24.15 e CaM. A superexpressão de CaM em células HEK293 resultou em um aumento significativo na secreção estimulada de EP24.15, mas não teve efeito na sua secreção constitutiva. A adição de forskolin provocou um efeito sinérgico na secreção de EP24.15 estimulada por A23187, o que foi totalmente bloqueado por KT5720, inibidor específico de PKA. O KT5720 também bloqueou o efeito estimulatório de A23187 na secreção da EP24.15. A inibição da CaM pelo seu inibidor específico, calmidazolium, diminuiu significativamente a secreção da EP24.15 estimulada por A23187. Além disso, a inibição simultânea de CaM e PKA praticamente anulou a secreção da EP24.15 estimulada pelo tratamento com A23187. Esses dados indicam que PKA e CaM atuam sinergicamente na promoção da secreção

estimulada de EP24.15 em células HEK293. Uma possível interpretação adicional para esses resultados é que a ativação direta e indireta de PKA (através de 14-3-3ε) pode promover a ligação de EP24.15 e CaM e regular positivamente a secreção não-convencional dessa enzima.

A CaM é uma proteína pequena com aproximadamente 148 aminoácidos (16,7 kDa), que existe em pelo menos duas configurações diferentes: apocalmodulina, a qual não há moléculas de Ca^{2+} ligadas, e cálcio-CaM, a qual pode se ligar a 4 íons Ca^{2+} (JURADO *et al.*, 1999). Quando ligada ao cálcio, a CaM sofre uma dramática mudança conformacional. A estrutura cristalográfica mostra que a CaM é bilobulada com uma alfa-hélice, o que torna a proteína flexível às diferentes ligações com Ca^{2+} , e pode aumentar potencialmente a afinidade com alvos protéicos (BARBATO *et al.*, 1992; VOGEL, 1994; YAMNIUK e VOGEL, 2004). Assim, a CaM pode obter uma conformação globular compacta, por alterar a dobra da hélice central para encaixar na hélice alvo. O algoritmo com caráter de previsão dos alvos de ligação da CaM é baseado somente nas propriedades individuais dos aminoácidos da sequência primária, e é acoplado com a propensão de hidrofobicidade da hélice (YAP *et al.*, 2000). Esse esquema cabe bem no contexto biológico das sequências descritas como as regiões de interação mais fortes entre CaM e EP24.15. Embora distinto em relação à sequência linear, existem duas regiões de interação separadas por mais de 100 aminoácidos. Estas regiões na estrutura atômica da definição da enzima residem ao lado da superfície e longe do sítio ativo da enzima, para fornecer uma plataforma relativamente modulatória para potencial regulação da EP24.15.

Além disso, a CaM é uma proteína expressa de forma ubíqua, que pode se ligar e regular inúmeros alvos protéicos e dessa forma afetar muitas funções celulares, incluindo a abertura de canais de K^+ voltagem dependente (ETXEBERRIA *et al.*, 2008), e reciclagem vesicular e exocitose quando em ligação com o Ca^{2+} (SAKABA e NEHER, 2001). Também é responsável pela clivagem ou não do ectodomínio da ACE 2 (responsável por quebrar a Ang II, um potente vasoconstritor em Ang1-7, peptídeo que tem efeito oposto) (LAMBERT *et al.*, 2008). A CaM media processos como inflamação, metabolismo, apoptose, contração muscular, movimentos intracelulares,

memória a curto e longo prazos, crescimento nervoso e respostas imune (COLOMER e MEANS, 2007). Ca^{2+} -CaM é um regulador positivo de exocitose em células neuroendócrinas (CHAMBERLAIN *et al.*, 1995; CHEN *et al.*, 1999), nas quais provoca abertura dos poros de fusão na membrana plasmática (COLOMBO *et al.*, 1997; PETERS *et al.*, 2001; BAYER *et al.*, 2003) e fusão dos grânulos secretórios (COOPERSTEIN e WATKINS, 1995).

Interessantemente, encontramos que mesmo em concentrações de Ca^{2+} livre intracelular abaixo das quais estimulam a secreção da EP24.15, essa enzima co-localiza com CaM em células HEK293. Essa co-localização pode ter significância fisiológica adicional, como a regulação espacial da EP24.15 intracelularmente. Além disso, a proteína 14-3-3 é uma proteína que se liga a uma grande variedade de proteínas envolvidas com a via de sinalização, incluindo quinases, fosfatases e receptores de membrana (COUVE *et al.*, 2001). É sabido que a ligação da CaM com a isoforma ϵ da 14-3-3 (LUK *et al.*, 1999) provoca diversos eventos nas células, dentre eles a regulação da localização sub-celular de complexos protéicos, sendo importantes para o processo de distribuição sub-celular das proteínas RGK, que são pequenas proteínas G que regulam a abertura do canal de cálcio voltagem dependente (BEGUIN *et al.*, 2005).

Uma possibilidade é que um pequeno aumento nas concentrações citoplasmáticas de cálcio podem contribuir para o recrutamento da EP24.15 próximo aos locais de transdução de sinais, e nesses locais regular o metabolismo de peptídeos. Estudos recentes identificaram um número de peptídeos intracelulares que são tanto substratos como produtos endógenos da EP24.15 (BERTI *et al.*, 2009). Além disso, a superexpressão de EP24.15 altera a transdução de sinal de angiotensina II e isoproterenol em células HEK293, sugerindo uma função fisiológica para os substratos e produtos da EP24.15 (CUNHA *et al.*, 2008). Esses dados sugerem que a atividade intracelular da EP24.15 pode ser um importante passo no controle das vias de transdução de sinal. Além disso, a interação com a CaM mediante grandes aumentos

na concentração intracelular de cálcio contribui para aumentar a secreção da EP24.15, a qual afetaria o metabolismo de peptídeos extracelulares e intracelulares.

Em conclusão, nossos resultados sugerem que a interação com a CaM pode desempenhar um importante papel na secreção estimulada da EP24.15. A interação entre EP24.15 e CaM mostrou ser regulada tanto pela concentração intracelular de cálcio como pela ativação de PKA, a qual é frequentemente observada durante a transdução de sinal. Dessa forma, nosso trabalho sugere que a CaM pode facilitar a secreção da EP24.15 por posicionar espacialmente essa enzima próxima à regiões específicas da membrana plasmática, e assim facilitar sua secreção quando há aumento das concentrações intracelulares de cálcio.

6 CONCLUSÃO

Esse trabalho apresenta como principais conclusões:

- 1) A EP24.15 é secretada constitutivamente por fatias de cérebro de ratos (*slices*).
- 2) A CaM interage fisicamente com a EP24.15.
- 3) CaM e EP24.15 co-localizam no citoplasma de células HEK293, sendo o cálcio livre intracelular importante nesse processo.
- 4) A secreção estimulada da EP24.15 é favorecida pela CaM em células HEK293. Essa secreção também é influenciada pela ação da PKA.

REFERÊNCIAS*

ABRAHAM, J. A.; MERGIA, A.; WHANG, J. L.; TUMOLO, A.; FRIEDMAN, J.; HJERRILD, K. A.; GOSPODAROWICZ, D.; FIDDES, J. C. Nucleotide sequence of a bovine clone encoding the angiogenic protein, basic fibroblast growth factor. **Science**, v.233, n.4763, p.545-8, 1986.

ACKER, G. R.; MOLINEAUX, C.; ORLOWSKI, M. Synaptosomal membrane-bound form of endopeptidase-24.15 generates Leu-enkephalin from dynorphin1-8, alpha- and beta-neoendorphin, and Met-enkephalin from Met-enkephalin-Arg6-Gly7-Leu8. **J. Neurochem.**, v.48, n.1, p.284-92, 1987.

AGNATI, L. F.; ZOLI, M.; STROMBERG, I.; FUXE, K. Intercellular communication in the brain: wiring versus volume transmission. **Neuroscience**, v.69, n.3, p.711-26, 1995.

AITKEN, A.; COLLINGE, D. B.; VAN HEUSDEN, B. P.; ISOBE, T.; ROSEBOOM, P. H.; ROSENFELD, G.; SOLL, J. 14-3-3 proteins: a highly conserved, widespread family of eukaryotic proteins. **Trends Biochem. Sci.**, v.17, n.12, p.498-501, 1992.

AITKEN, A.; HOWELL, S.; JONES, D.; MADRAZO, J.; PATEL, Y. 14-3-3 alpha and delta are the phosphorylated forms of raf-activating 14-3-3 beta and zeta. In vivo stoichiometric phosphorylation in brain at a Ser-Pro-Glu-Lys MOTIF. **J. Biol. Chem.**, v.270, n.11, p.5706-9, 1995.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular biology of the cell**. New York: Garland Science 2008.

ANDREI, C.; DAZZI, C.; LOTTI, L.; TORRISI, M. R.; CHIMINI, G.; RUBARTELLI, A. The secretory route of the leaderless protein interleukin 1beta involves exocytosis of endolysosome-related vesicles. **Mol. Biol. Cell.**, v.10, n.5, p.1463-75, 1999.

ANDREI, C.; MARGIOCCO, P.; POGGI, A.; LOTTI, L. V.; TORRISI, M. R.; RUBARTELLI, A. Phospholipases C and A2 control lysosome-mediated IL-1 beta secretion: Implications for inflammatory processes. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.101, n.26, p.9745-50, 2004.

ANKARCRONA, M.; DYPBUKT, J. M.; BONFOCO, E.; ZHIVOTOVSKY, B.; ORRENIUS, S.; LIPTON, S. A.; NICOTERA, P. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. **Neuron**, v.15, n.4, p.961-73, 1995.

ARNER, E. S.; HOLMGREN, A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. **Eur. J. Biochem.**, v.267, n.20, p.6102-9, 2000.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

AWAD, J. A.; JOHNSON, R. A.; JAKOBS, K. H.; SCHULTZ, G. Interactions of forskolin and adenylate cyclase. Effects on substrate kinetics and protection against inactivation by heat and N-ethylmaleimide. **J. Biol. Chem.**, v.258, n.5, p.2960-5, 1983.

BAHLER, M.; RHOADS, A. Calmodulin signaling via the IQ motif. **FEBS Lett.**, v.513, n.1, p.107-13, 2002.

BARBATO, G.; IKURA, M.; KAY, L. E.; PASTOR, R. W.; BAX, A. Backbone dynamics of calmodulin studied by ¹⁵N relaxation using inverse detected two-dimensional NMR spectroscopy: the central helix is flexible. **Biochemistry**, v.31, n.23, p.5269-78, 1992.

BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D.; WOESSNER, J. F. **Handbook of proteolytic enzymes**. San Diego: Academic Press, 1998.

BAXTER, H. C.; LIU, W. G.; FORSTER, J. L.; AITKEN, A.; FRASER, J. R. Immunolocalisation of 14-3-3 isoforms in normal and scrapie-infected murine brain. **Neuroscience**, v.109, n.1, p. 5-14, 2002.

BAYER, M. J.; REESE, C.; BUHLER, S.; PETERS, C.; MAYER, A. Vacuole membrane fusion: V0 functions after trans-SNARE pairing and is coupled to the Ca²⁺-releasing channel. **J. Cell. Biol.**, v.162, n.2, p.211-22, 2003.

BEGUIN, P.; MAHALAKSHMI, R. N.; NAGASHIMA, K.; CHER, D. H.; TAKAHASHI, A.; YAMADA, Y.; SEINO, Y.; HUNZIKER, W. 14-3-3 and calmodulin control subcellular distribution of Kir/Gem and its regulation of cell shape and calcium channel activity. **J. Cell. Sci.**, v.118, n.Pt 9, p.1923-34, 2005.

BERTHOLD, M.; BARTFAI, T. Modes of peptide binding in G protein-coupled receptors. **Neurochem. Res.**, v.22, n.8, p.1023-31, 1997.

BERTI, D. A.; MORANO, C.; RUSSO, L. C.; CASTRO, L. M.; CUNHA, F. M.; ZHANG, X.; SIRONI, J.; KLITZKE, C. F.; FERRO, E. S.; FRICKER, L. D. Analysis of intracellular substrates and products of thimet oligopeptidase in human embryonic kidney 293 cells. **J. Biol. Chem.**, v.284, n.21, p.14105-16, 2009.

BLOBEL, G.; DOBBERSTEIN, B. Transfer of proteins across membranes. II. Reconstitution of functional rough microsomes from heterologous components. **J. Cell Biol.**, v.67, n.3, p.852-62, 1975.

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, p.248-54, 1976.

BROSE, N.; GASIC, G. P.; VETTER, D. E.; SULLIVAN, J. M.; HEINEMANN, S. F. Protein chemical characterization and immunocytochemical localization of the NMDA receptor subunit NMDA R1. **J. Biol. Chem.**, v.268, n.30, p.22663-71, 1993.

BROWN, C. K.; MADAUSS, K.; LIAN, W.; BECK, M. R.; TOLBERT, W. D.; RODGERS, D. W. Structure of neurolysin reveals a deep channel that limits substrate access. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.98, n.6, p.3127-32, 2001.

BRUNET, A.; KANAI, F.; STEHN, J.; XU, J.; SARBASSOVA, D.; FRANGIONI, J. V.; DALAL, S. N.; DECAPRIO, J. A.; GREENBERG, M. E.; YAFFE, M. B. 14-3-3 transits to the nucleus and participates in dynamic nucleocytoplasmic transport. **J. Cell. Biol.**, v.156, n.5, p.817-28, 2002.

BURGESS, T. L.; KELLY, R. B. Constitutive and regulated secretion of proteins. **Annu. Rev. Cell. Biol.**, v.3, p.243-93, 1987.

CAMARGO, A. C. M.; GOMES, M. D.; REICHL, A. P.; FERRO, E. S.; JACCHIERI, S.; HIRATA, I. Y.; JULIANO, L. Structural features that make oligopeptides susceptible substrates for hydrolysis by recombinant thimet oligopeptidase. **Biochem. J.**, v.324, p.517-522, 1997.

CARDOZO, C.; ORLOWSKI, M. Evidence that enzymatic conversion of N-[1(R,S)-carboxy-3-phenylpropyl]-Ala-Ala-Phe-p-aminobenzoate, a specific inhibitor of endopeptidase 24.15, to N-[1(R,S)-carboxy-3-phenylpropyl]-Ala-Ala is necessary for inhibition of angiotensin converting enzyme. **Peptides**, v.14, n.6, p.1259-62, 1993.

CARRENO, F. R.; GONI, C. N.; CASTRO, L. M.; FERRO, E. S. 14-3-3 epsilon modulates the stimulated secretion of endopeptidase 24.15. **J. Neurochem.**, v.93, n.1, p.10-25, 2005.

CHAMBERLAIN, L. H.; ROTH, D.; MORGAN, A.; BURGOYNE, R. D. Distinct effects of alpha-SNAP, 14-3-3 proteins, and calmodulin on priming and triggering of regulated exocytosis. **J. Cell. Biol.**, v.130, n.5, p.1063-70, 1995.

CHAPPELL, M. C.; GOMEZ, M. N.; PIRRO, N. T.; FERRARIO, C. M. Release of angiotensin-(1-7) from the rat hindlimb: influence of angiotensin-converting enzyme inhibition. **Hypertension**, v.35, n.1 Pt 2, p.348-52, 2000.

CHEN, Y. A.; DUVVURI, V.; SCHULMAN, H.; SCHELLER, R. H. Calmodulin and protein kinase C increase Ca(2+)-stimulated secretion by modulating membrane-attached exocytic machinery. **J. Biol. Chem.**, v.274, n.37, p.26469-76, 1999.

CHU, T. G.; ORLOWSKI, M. Soluble metalloendopeptidase from rat brain: action on enkephalin-containing peptides and other bioactive peptides. **Endocrinology**, v.116, n.4, p.1418-25, 1985.

COLLINS, J. H.; POTTER, J. D.; HORN, M. J.; WILSHIRE, G.; JACKMAN, N. The amino acid sequence of rabbit skeletal muscle troponin C: gene replication and homology with calcium-binding proteins from carp and hake muscle. **FEBS Lett.**, v.36, n.3, p.268-72, 1973.

COLOMBO, M. I.; BERON, W.; STAHL, P. D. Calmodulin regulates endosome fusion. **J. Biol. Chem.**, v.272, n.12, p.7707-12, 1997.

COLOMER, J.; MEANS, A. R. Physiological roles of the Ca²⁺/CaM-dependent protein kinase cascade in health and disease. **Subcell. Biochem.**, v.45, p.169-214, 2007.

COOPER, D. N.; BARONDES, S. H. Evidence for export of a muscle lectin from cytosol to extracellular matrix and for a novel secretory mechanism. **J. Cell. Biol.**, v.110, n.5, p.1681-91, 1990.

COOPERSTEIN, S. J.; WATKINS, D. T. Ca(++)-calmodulin-dependent phosphorylation and dephosphorylation of rat parotid secretion granules. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.215, n.1, p.75-81, 1995.

COUVE, A.; KITTLER, J. T.; UREN, J. M.; CALVER, A. R.; PANGALOS, M. N.; WALSH, F. S.; MOSS, S. J. Association of GABA(B) receptors and members of the 14-3-3 family of signaling proteins. **Mol. Cell. Neurosci.**, v.17, n.2, p.317-28, 2001.

CUMMINS, P. M.; PABON, A.; MARGULIES, E. H.; GLUCKSMAN, M. J. Zinc coordination and substrate catalysis within the neuropeptide processing enzyme endopeptidase EC 3.4.24.15. Identification of active site histidine and glutamate residues. **J. Biol. Chem.**, v.274, n.23, p.16003-9, 1999.

CUNHA, F. M.; BERTI, D. A.; FERREIRA, Z. S.; KLITZKE, C. F.; MARKUS, R. P.; FERRO, E. S. Intracellular peptides as natural regulators of cell signaling. **J. Biol. Chem.**, v.283, n.36, p.24448-59, 2008.

DAUCH, P.; VINCENT, J. P.; CHECLER, F. Specific inhibition of endopeptidase 24.16 by dipeptides. **Eur. J. Biochem.**, v.202, n.2, p.269-76, 1991.

DESSI, F.; CHARRIAUT-MARLANGUE, C.; KHRESTCHATISKY, M.; BEN-ARI, Y. Glutamate-induced neuronal death is not a programmed cell death in cerebellar culture. **J. Neurochem.**, v.60, n.5, p.1953-5, 1993.

EMR, S.; GLICK, B.; HELENIUS, A.; MELLMAN, I.; PELHAM, H.; SCHIAVO, G.; WARREN, G.; ZERIAL, M. Intracellular Vesicular Traffic. In: ALBERTS, B. (Ed.). **Molecular biology of the cell**. New York: Garland Science, 2008.

ETXEVERRIA, A.; AIVAR, P.; RODRIGUEZ-ALFARO, J. A.; ALAIMO, A.; VILLACE, P.; GOMEZ-POSADA, J. C.; ARESO, P.; VILLARROEL, A. Calmodulin regulates the trafficking of KCNQ2 potassium channels. **FASEB J.**, v.22, n.4, p.1135-43, 2008.

FAGERLUND, M. J.; ERIKSSON, L. I. Current concepts in neuromuscular transmission. **Br. J. Anaesth.**, v.103, n.1, p.108-14, 2009.

FALLON, J. H.; LESLIE, F. M. Distribution of dynorphin and enkephalin peptides in the rat brain. **J. Comp. Neurol.**, v.249, n.3, p.293-336, 1986.

FERRO, E. S.; CARRENO, F. R.; GONI, C.; GARRIDO, P. A.; GUIMARAES, A. O.; CASTRO, L. M.; OLIVEIRA, V.; ARAUJO, M. C.; RIOLI, V.; GOMES, M. D.; FONTENELE-NETO, J. D.; HYSLOP, S. The intracellular distribution and secretion of endopeptidases 24.15 (EC 3.4.24.15) and 24.16 (EC 3.4.24.16). **Protein Pept. Lett.**, v.11, n.5, p.415-21, 2004.

FERRO, E. S.; TAMBOURGY, D. V.; ABREU, P. A.; CAMARGO, A. C.; RAW, I.; HO, P. L. Characterization of an endooligopeptidase A-like protein in PC12 cells: activity

modulation by cAMP but not by basic fibroblast growth factor. **J. Cell. Biochem.**, v.57, n.2, p.311-20, 1995.

FERRO, E. S.; TULLAI, J. W.; GLUCKSMAN, M. J.; ROBERTS, J. L. Secretion of metalloendopeptidase 24.15 (EC 3.4.24.15). **DNA Cell Biol.**, v.18, n.10, p.781-9, 1999.

FLINN, H. M.; RANGARAJAN, D.; SMITH, D. F. Expression of a hydrophilic surface protein in infective stages of *Leishmania major*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v.65, n.2, p.259-70, 1994.

FLORKIEWICZ, R. Z.; MAJACK, R. A.; BUECHLER, R. D.; FLORKIEWICZ, E. Quantitative export of FGF-2 occurs through an alternative, energy-dependent, non-ER/Golgi pathway. **J. Cell. Physiol.**, v.162, n.3, p.388-99, 1995.

FONTENELE-NETO, J. D.; MASSARELLI, E. E.; GURGEL GARRIDO, P. A.; BEAUDET, A.; FERRO, E. S. Comparative fine structural distribution of endopeptidase 24.15 (EC3.4.24.15) and 24.16 (EC3.4.24.16) in rat brain. **J. Comp. Neurol.**, v.438, n.4, p.399-410, 2001.

FOREMAN, J. C.; MONGAR, J. L. The action of lanthanum and manganese on anaphylactic histamine secretion. **Br. J. Pharmacol.**, v.48, n.3, p.527-37, 1973.

FU, H.; SUBRAMANIAN, R. R.; MASTERS, S. C. 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v.40, p.617-47, 2000.

GARRIDO, P. A.; VANDENBULCKE, F.; RAMJAUN, A. R.; VINCENT, B.; CHECLER, F.; FERRO, E.; BEAUDET, A. Confocal microscopy reveals thimet oligopeptidase (EC 3.4.24.15) and neurolysin (EC 3.4.24.16) in the classical secretory pathway. **DNA Cell Biol.**, v.18, n.4, p.323-31, 1999.

GLAUM, S. R.; SCHOLZ, W. K.; MILLER, R. J. Acute- and long-term glutamate-mediated regulation of $[Ca^{++}]_i$ in rat hippocampal pyramidal neurons in vitro. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.253, n.3, p.1293-302, 1990.

GOMES, M. D.; JULIANO, L.; FERRO, E. S.; MATSUEDA, R.; CAMARGO, A. C. Dynorphin-derived peptides reveal the presence of a critical cysteine for the activity of brain endo-oligopeptidase A. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.197, n.2, p.501-7, 1993.

GONZALES, R. A. Biochemical responses mediated by N-methyl-D-aspartate receptors in rat cortical slices are differentially sensitive to magnesium. **J. Neurochem.**, v.58, n.2, p.579-86, 1992.

GORDON, D. M.; DANCIS, A.; PAIN, D. Mechanisms of mitochondrial protein import. **Essays Biochem.**, v.36, p.61-73, 2000.

GRAHAM, F. L.; SMILEY, J.; RUSSELL, W. C.; NAIRN, R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. **J. Gen. Virol.**, v.36, n.1, p.59-74, 1977.

GRIFFIN, K. A.; BIDANI, A. K.; PICKEN, M.; ELLIS, V. R.; CHURCHILL, P. C. Prostaglandins do not mediate impaired autoregulation or increased renin secretion in remnant rat kidneys. **Am. J. Physiol.**, v.263, n.6 Pt 2, p.F1057-62, 1992.

GUO, Y.; WANG, H. L.; XIANG, X. H.; ZHAO, Y. The role of glutamate and its receptors in mesocorticolimbic dopaminergic regions in opioid addiction. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v.33, n.6, p.864-73, 2009.

HAMON, Y.; LUCIANI, M. F.; BECQ, F.; VERRIER, B.; RUBARTELLI, A.; CHIMINI, G. Interleukin-1beta secretion is impaired by inhibitors of the Atp binding cassette transporter, ABC1. **Blood**, v.90, n.8, p.2911-5, 1997.

HARRISON, S.; GEPPETTI, P. Substance p. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.**, v.33, n.6, p.555-76, 2001.

HEALY, D. P.; ORLOWSKI, M. Immunocytochemical localization of endopeptidase 24.15 in rat brain. **Brain Res.**, v.571, n.1, p.121-8, 1992.

HERZBERG, O.; JAMES, M. N. Structure of the calcium regulatory muscle protein troponin-C at 2.8 Å resolution. **Nature**, v.313, n.6004, p.653-9, 1985.

HUGHES, R. C. Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1473, n.1, p.172-85, 1999.

HUTTNER, W. B. Tyrosine sulfation and the secretory pathway. **Annu. Rev. Physiol.**, v.50, p.363-76, 1988.

JACKSON, A.; FRIEDMAN, S.; ZHAN, X.; ENGLEKA, K. A.; FOROUGH, R.; MACIAG, T. Heat shock induces the release of fibroblast growth factor 1 from NIH 3T3 cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.89, n.22, p.10691-5, 1992.

JAYE, M.; HOWK, R.; BURGESS, W.; RICCA, G. A.; CHIU, I. M.; RAVERA, M. W.; O'BRIEN, S. J.; MODI, W. S.; MACIAG, T.; DROHAN, W. N. Human endothelial cell growth factor: cloning, nucleotide sequence, and chromosome localization. **Science**, v.233, n.4763, p.541-5, 1986.

JESKE, N. A.; BERG, K. A.; COUSINS, J. C.; FERRO, E. S.; CLARKE, W. P.; GLUCKSMAN, M. J.; ROBERTS, J. L. Modulation of bradykinin signaling by EP24.15 and EP24.16 in cultured trigeminal ganglia. **J. Neurochem.**, v.97, n.1, p.13-21, 2006.

JESKE, N. A.; GLUCKSMAN, M. J.; ROBERTS, J. L. EP24.15 is associated with lipid rafts. **J. Neurosci Res**, v.74, n.3, p.468-73, 2003.

JESKE, N. A.; GLUCKSMAN, M. J.; ROBERTS, J. L. Metalloendopeptidase EC3.4.24.15 is constitutively released from the exofacial leaflet of lipid rafts in GT1-7 cells. **J. Neurochem.**, v.90, n.4, p.819-28, 2004.

JONES, D. H.; MARTIN, H.; MADRAZO, J.; ROBINSON, K. A.; NIELSEN, P.; ROSEBOOM, P. H.; PATEL, Y.; HOWELL, S. A.; AITKEN, A. Expression and structural analysis of 14-3-3 proteins. **J. Mol. Biol.**, v.245, n.4, p.375-84, 1995.

JURADO, L. A.; CHOCKALINGAM, P. S.; JARRETT, H. W. Apocalmodulin. **Physiol. Rev.**, v.79, n.3, p.661-82, 1999.

KATO, N.; NAKANISHI, M.; HIRASHIMA, N. Transbilayer asymmetry of phospholipids in the plasma membrane regulates exocytotic release in mast cells. **Biochemistry**, v.41, n.25, p.8068-74, 2002.

KEST, B.; ORLOWSKI, M.; BODNAR, R. J. Endopeptidase 24.15 inhibition and opioid antinociception. **Psychopharmacology**, v.106, n.3, p.408-16, 1992.

KEST, B.; ORLOWSKI, M.; MOLINEAUX, C. J.; BODNAR, R. J. Antinociceptive properties of inhibitors of endopeptidase 24.15. **Int. J. Neurosci.**, v.56, n.1-4, p.141-9, 1991.

KIM, S. I.; PABON, A.; SWANSON, T. A.; GLUCKSMAN, M. J. Regulation of cell-surface major histocompatibility complex class I expression by the endopeptidase EC3.4.24.15 (thimet oligopeptidase). **Biochem. J.**, v.375, n.Pt 1, p.111-20, 2003.

LAMBERT, D. W.; CLARKE, N. E.; HOOPER, N. M.; TURNER, A. J. Calmodulin interacts with angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2) and inhibits shedding of its ectodomain. **FEBS Lett.**, v.582, n.2, p.385-90, 2008.

LARA-LEMUS, R.; LIU, M.; TURNER, M. D.; SCHERER, P.; STENBECK, G.; IYENGAR, P.; ARVAN, P. Lumenal protein sorting to the constitutive secretory pathway of a regulated secretory cell. **J. Cell. Sci.**, v.119, n.Pt 9, p.1833-42, 2006.

LEE, H. M.; FAIN, J. N. Magnesium-dependent inhibition of agonist-stimulated phosphoinositide breakdown in rat cortical slices by excitatory amino acids. **J. Neurochem.**, v.59, n.3, p.953-62, 1992.

LEW, R. A.; COWLEY, M.; CLARKE, I. J.; SMITH, A. I. Peptidases that degrade gonadotropin-releasing hormone: influence on LH secretion in the ewe. **J. Neuroendocrinol.**, v.9, n.9, p.707-12, 1997.

LINDSTEDT, R.; APODACA, G.; BARONDES, S. H.; MOSTOV, K. E.; LEFFLER, H. Apical secretion of a cytosolic protein by Madin-Darby canine kidney cells. Evidence for polarized release of an endogenous lectin by a nonclassical secretory pathway. **J. Biol. Chem.**, v.268, n.16, p.11750-7, 1993.

LUCERO, H. A.; ROBBINS, P. W. Lipid rafts-protein association and the regulation of protein activity. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.426, n.2, p.208-24, 2004.

LUK, S. C.; NGAI, S. M.; TSUI, S. K.; FUNG, K. P.; LEE, C. Y.; WAYE, M. M. In vivo and in vitro association of 14-3-3 epsilon isoform with calmodulin: implication for signal transduction and cell proliferation. **J. Cell. Biochem.**, v.73, n.1, p.31-5, 1999.

MACKENZIE, A.; WILSON, H. L.; KISS-TOTH, E.; DOWER, S. K.; NORTH, R. A.; SURPRENANT, A. Rapid secretion of interleukin-1beta by microvesicle shedding. **Immunity**, v.15, n.5, p.825-35, 2001.

MACKINTOSH, C. Dynamic interactions between 14-3-3 proteins and phosphoproteins regulate diverse cellular processes. **Biochem. J.**, v.381, n.Pt 2, p.329-42, 2004.

MARTIN, H.; ROSTAS, J.; PATEL, Y.; AITKEN, A. Subcellular localisation of 14-3-3 isoforms in rat brain using specific antibodies. **J. Neurochem.**, v.63, n.6, p.2259-65, 1994.

MASSARELLI, E. E.; CASATTI, C. A.; KATO, A.; CAMARGO, A. C.; BAUER, J. A.; GLUCKSMAN, M. J.; ROBERTS, J. L.; HIROSE, S.; FERRO, E. S. Differential subcellular distribution of neurolysin (EC 3.4.24.16) and thimet oligopeptidase (EC 3.4.24.15) in the rat brain. **Brain Res.**, v.851, n.1-2, p.261-5, 1999.

MASTERS, S. C.; PEDERSON, K. J.; ZHANG, L.; BARBIERI, J. T.; FU, H. Interaction of 14-3-3 with a nonphosphorylated protein ligand, exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa*. **Biochemistry**, v.38, n.16, p.5216-21, 1999.

MCGRATH, J. P.; VARSHAVSKY, A. The yeast STE6 gene encodes a homologue of the mammalian multidrug resistance P-glycoprotein. **Nature**, v.340, n.6232, p.400-4, 1989.

MCKIE, N.; DANDO, P. M.; RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J. Thimet oligopeptidase: similarity to 'soluble angiotensin II-binding protein' and some corrections to the published amino acid sequence of the rat testis enzyme. **Biochem. J.**, v.295 (Pt 1), p.57-60, 1993.

MEHUL, B.; HUGHES, R. C. Plasma membrane targetting, vesicular budding and release of galectin 3 from the cytoplasm of mammalian cells during secretion. **J. Cell. Sci.**, v.110 p.1169-78, 1997. Pt. 10.

MIGNATTI, P.; RIFKIN, D. B. Release of basic fibroblast growth factor, an angiogenic factor devoid of secretory signal sequence: a trivial phenomenon or a novel secretion mechanism? **J. Cell. Biochem.**, v.47, n.3, p.201-7, 1991.

MILS, V.; BALDIN, V.; GOUBIN, F.; PINTA, I.; PAPIN, C.; WAYE, M.; EYCHENE, A.; DUCOMMUN, B. Specific interaction between 14-3-3 isoforms and the human CDC25B phosphatase. **Oncogene**, v.19, n.10, p.1257-65, 2000.

MISHRA, S.; JOSHI, P. G. Lipid raft heterogeneity: an enigma. **J. Neurochem.**, v.103 Suppl 1, p.135-42, 2007.

MIYAKAWA, K.; IMAMURA, T. Secretion of FGF-16 requires an uncleaved bipartite signal sequence. **J. Biol. Chem.**, v.278, n.37, p.35718-24, 2003.

MOLINEAUX, C. J.; AYALA, J. M. An inhibitor of endopeptidase-24.15 blocks the degradation of intraventricularly administered dynorphins. **J. Neurochem.**, v.55, n.2, p.611-8, 1990.

MOORE, B. W.; PEREZ, V. J. **Physiological and Biochemical Aspects of Nervous Integration**. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1967. 391 p.

MORGAN, A.; BURGOYNE, R. D. Exo1 and Exo2 proteins stimulate calcium-dependent exocytosis in permeabilized adrenal chromaffin cells. **Nature**, v.355, n.6363, p.833-6, 1992a.

MORGAN, A.; BURGOYNE, R. D. Interaction between protein kinase C and Exo1 (14-3-3 protein) and its relevance to exocytosis in permeabilized adrenal chromaffin cells. **Biochem. J.**, v.286, p.807-11, 1992b. Pt. 3.

MORRISON, D. 14-3-3: modulators of signaling proteins? **Science**, v.266, n.5182, p.56-7, 1994.

MUESCH, A.; HARTMANN, E.; ROHDE, K.; RUBARTELLI, A.; SITIA, R.; RAPOPORT, T. A. A novel pathway for secretory proteins? **Trends Biochem. Sci.**, v.15, n.3, p.86-8, 1990.

MURPHY, S. N.; THAYER, S. A.; MILLER, R. J. The effects of excitatory amino acids on intracellular calcium in single mouse striatal neurons in vitro. **J. Neurosci.**, v.7, n.12, p.4145-58, 1987.

NICKEL, W. The mystery of nonclassical protein secretion. A current view on cargo proteins and potential export routes. **Eur. J. Biochem.**, v.270, n.10, p.2109-19, 2003.

NICKEL, W. Unconventional secretory routes: direct protein export across the plasma membrane of mammalian cells. **Traffic**, v.6, n.8, p.607-14, 2005.

NICKEL, W.; SEEDORF, M. Unconventional mechanisms of protein transport to the cell surface of eukaryotic cells. **Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.**, v.24, p.287-308, 2008.

OLIVEIRA, V.; CAMPOS, M.; MELO, R. L.; FERRO, E. S.; CAMARGO, A. C.; JULIANO, M. A.; JULIANO, L. Substrate specificity characterization of recombinant metallo oligo-peptidases thimet oligopeptidase and neurolysin. **Biochemistry**, v.40, n.14, p.4417-25, 2001.

ORLOWSKI, M.; MICHAUD, C.; CHU, T. G. A soluble metalloendopeptidase from rat brain. Purification of the enzyme and determination of specificity with synthetic and natural peptides. **Eur. J. Biochem.**, v.135, n.1, p.81-8, 1983.

PATTNAIK, P. Surface plasmon resonance: applications in understanding receptor-ligand interaction. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v.126, n.2, p.79-92, 2005.

PETERS, C.; BAYER, M. J.; BUHLER, S.; ANDERSEN, J. S.; MANN, M.; MAYER, A. Trans-complex formation by proteolipid channels in the terminal phase of membrane fusion. **Nature**, v.409, n.6820, p.581-8, 2001.

PIEROTTI, A.; DONG, K. W.; GLUCKSMAN, M. J.; ORLOWSKI, M.; ROBERTS, J. L. Molecular cloning and primary structure of rat testes metalloendopeptidase EC 3.4.24.15. **Biochemistry**, v.29, n.45, p.10323-9, 1990.

PIEROTTI, A. R.; LASDUN, A.; AYALA, J. M.; ROBERTS, J. L.; MOLINEAUX, C. J. Endopeptidase-24.15 in rat hypothalamic/pituitary/gonadal axis. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v.76, n.1-3, p.95-103, 1991.

PIMENTA, P. F.; PINTO DA SILVA, P.; RANGARAJAN, D.; SMITH, D. F.; SACKS, D. L. Leishmania major: association of the differentially expressed gene B protein and the surface

lipophosphoglycan as revealed by membrane capping. **Exp. Parasitol.**, v.79, n.3, p.468-79, 1994.

PORTARO, F. C.; GOMES, M. D.; CABRERA, A.; FERNANDES, B. L.; SILVA, C. L.; FERRO, E. S.; JULIANO, L.; DE CAMARGO, A. C. Thimet oligopeptidase and the stability of MHC class I epitopes in macrophage cytosol. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.255, n.3, p.596-601, 1999.

PRUDOVSKY, I.; MANDINOVA, A.; SOLDI, R.; BAGALA, C.; GRAZIANI, I.; LANDRISCINA, M.; TARANTINI, F.; DUARTE, M.; BELLUM, S.; DOHERTY, H.; MACIAG, T. The non-classical export routes: FGF1 and IL-1alpha point the way. **J. Cell. Sci.**, v.116, n.Pt 24, p.4871-81, 2003.

QU, Y.; FRANCHI, L.; NUNEZ, G.; DUBYAK, G. R. Nonclassical IL-1 beta secretion stimulated by P2X7 receptors is dependent on inflammasome activation and correlated with exosome release in murine macrophages. **J. Immunol.**, v.179, n.3, p.1913-25, 2007.

RANDALL, R. D.; THAYER, S. A. Glutamate-induced calcium transient triggers delayed calcium overload and neurotoxicity in rat hippocampal neurons. **J. Neurosci.**, v.12, n.5, p.1882-95, 1992.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**. São Paulo: Elsevier, 2004. 920 p.

RAPOPORT, T. A. Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes. **Nature**, v.450, n.7170, p.663-9, 2007.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J. Evolutionary families of metallopeptidases. **Methods Enzymol.**, v.248, p.183-228, 1995.

RAY, K.; HINES, C. S.; COLL-RODRIGUEZ, J.; RODGERS, D. W. Crystal structure of human thimet oligopeptidase provides insight into substrate recognition, regulation, and localization. **J. Biol. Chem.**, v.279, n.19, p.20480-9, 2004.

RIESKE, P.; AZIZI, S. A.; AUGELLI, B.; GAUGHAN, J.; KRYNSKA, B. A population of human brain parenchymal cells express markers of glial, neuronal and early neural cells and differentiate into cells of neuronal and glial lineages. **Eur. J. Neurosci.**, v.25, n.1, p.31-7, 2007.

RIOLI, V.; KATO, A.; PORTARO, F. C.; CURY, G. K.; TE KAAT, K.; VINCENT, B.; CHECLER, F.; CAMARGO, A. C.; GLUCKSMAN, M. J.; ROBERTS, J. L.; HIROSE, S.; FERRO, E. S. Neuropeptide specificity and inhibition of recombinant isoforms of the endopeptidase 3.4.24.16 family: comparison with the related recombinant endopeptidase 3.4.24.15. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.250, n.1, p.5-11, 1998.

RIVEROS, N.; ORREGO, F. N-methylaspartate-activated calcium channels in rat brain cortex slices. Effect of calcium channel blockers and of inhibitory and depressant substances. **Neuroscience**, v.17, n.3, p.541-6, 1986.

ROBERTS, J. L.; MANI, S. K.; WOLLER, M. J.; GLUCKSMAN, M. J.; WU, T. J. LHRH-(1-5): a bioactive peptide regulating reproduction. **Trends Endocrinol. Metab.**, v.18, n.10, p.386-92, 2007.

RONDINI, T. A.; BADDINI, S. P.; SOUSA, L. F.; BITTENCOURT, J. C.; ELIAS, C. F. Hypothalamic cocaine- and amphetamine-regulated transcript neurons project to areas expressing gonadotropin releasing hormone immunoreactivity and to the anteroventral periventricular nucleus in male and female rats. **Neuroscience**, v.125, n.3, p.735-48, 2004.

ROTH, D.; BIRKENFELD, J.; BETZ, H. Dominant-negative alleles of 14-3-3 proteins cause defects in actin organization and vesicle targeting in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Lett.**, v.460, n.3, p.411-6, 1999.

RUBARTELLI, A.; BAJETTO, A.; ALLAVENA, G.; WOLLMAN, E.; SITIA, R. Secretion of thioredoxin by normal and neoplastic cells through a leaderless secretory pathway. **J. Biol. Chem.**, v.267, n.34, p.24161-4, 1992.

RUBARTELLI, A.; COZZOLINO, F.; TALIO, M.; SITIA, R. A novel secretory pathway for interleukin-1 beta, a protein lacking a signal sequence. **EMBO. J.**, v.9, n.5, p.1503-10, 1990.

SAKABA, T.; NEHER, E. Calmodulin mediates rapid recruitment of fast-releasing synaptic vesicles at a calyx-type synapse. **Neuron**, v.32, n.6, p.1119-31, 2001.

SAKAGUCHI, M. Eukaryotic protein secretion. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v.8, n.5, p.595-601, 1997.

SANDEN, C.; ENQUIST, J.; BENGTSON, S. H.; HERWALD, H.; LEEB-LUNDBERG, L. M. Kinin B2 receptor-mediated bradykinin internalization and metalloendopeptidase EP24.15-dependent intracellular bradykinin degradation. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.326, n.1, p.24-32, 2008.

SATO, S.; BURDETT, I.; HUGHES, R. C. Secretion of the baby hamster kidney 30-kDa galactose-binding lectin from polarized and nonpolarized cells: a pathway independent of the endoplasmic reticulum-Golgi complex. **Exp. Cell. Res.**, v.207, n.1, p.8-18, 1993.

SCHELL, M. J. The N-methyl D-aspartate receptor glycine site and D-serine metabolism: an evolutionary perspective. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, v.359, n.1446, p.943-64, 2004.

SEINO, S.; SHIBASAKI, T. PKA-dependent and PKA-independent pathways for cAMP-regulated exocytosis. **Physiol. Rev.**, v.85, n.4, p.1303-42, 2005.

SHIELDS, D. Signals for intracellular protein sorting: implications for peptide hormone precursor processing and secretion In: FRIECKER, L. D. (Ed.). **Peptide Biosynthesis and Processing**. Boca Raton: GRC, 1991. p. 282.

SHIVAKUMAR, B. R.; WANG, Z.; HAMMOND, T. G.; HARRIS, R. C. EP24.15 interacts with the angiotensin II type I receptor and bradykinin B2 receptor. **Cell Biochem. Funct.**, v.23, n.3, p.195-204, 2005.

SHRIMPSON, C. N.; GLUCKSMAN, M. J.; LEW, R. A.; TULLAI, J. W.; MARGULIES, E. H.; ROBERTS, J. L.; SMITH, A. I. Thiol activation of endopeptidase EC 3.4.24.15. A novel mechanism for the regulation of catalytic activity. **J. Biol. Chem.**, v.272, n.28, p.17395-9, 1997.

SHRIMPSON, C. N.; SMITH, A. I.; LEW, R. A. Soluble metalloendopeptidases and neuroendocrine signaling. **Endocr. Rev.**, v.23, n.5, p.647-64, 2002.

SIDERS, W. M.; MIZEL, S. B. Interleukin-1 beta secretion. A possible multistep process that is regulated in a cell type-specific manner. **J. Biol. Chem.**, v.270, n.27, p.16258-64, 1995.

SILVA, C. L.; PORTARO, F. C.; BONATO, V. L.; DE CAMARGO, A. C.; FERRO, E. S. Thimet oligopeptidase (EC 3.4.24.15), a novel protein on the route of MHC class I antigen presentation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.255, n.3, p.591-5, 1999.

SMITH, A. I.; LEW, R. A.; SHRIMPSON, C. N.; EVANS, R. G.; ABBENANTE, G. A novel stable inhibitor of endopeptidases EC 3.4.24.15 and 3.4.24.16 potentiates bradykinin-induced hypotension. **Hypertension**, v.35, n.2, p.626-30, 2000.

SMITH, A. I.; SHRIMPSON, C. N.; NORMAN, U. M.; CLARKE, I. J.; WOLFSON, A. J.; LEW, R. A. Neuropeptidases regulating gonadal function. **Biochem. Soc. Trans.**, v.28, n.4, p.430-4, 2000.

SPRENGEL, R.; SEEBURG, P. H. The unique properties of glutamate receptor channels. **FEBS Lett.**, v.325, n.1-2, p.90-4, 1993.

SUGIURA, N.; HAGIWARA, H.; HIROSE, S. Molecular cloning of porcine soluble angiotensin-binding protein. **J. Biol. Chem.**, v.267, n.25, p.18067-72, 1992.

SWANSON, L. W. **Brain Maps Structure. of the rat brain**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V., 1992. 240 p.

SYKOVA, E. Diffusion properties of the brain in health and disease. **Neurochem. Int.**, v.45, n.4, p.453-66, 2004.

TAKAI, H.; KATAYAMA, K.; UETSUKA, K.; NAKAYAMA, H.; DOI, K. Distribution of N-methyl-D-aspartate receptors (NMDARs) in the developing rat brain. **Exp. Mol. Pathol.**, v.75, n.1, p.89-94, 2003.

TAKEDA, H.; FUKUMOTO, A.; MIURA, A.; GOSHIMA, N.; NOMURA, N. High-throughput kinase assay based on surface plasmon resonance suitable for native protein substrates. **Anal. Biochem.**, v.357, n.2, p.262-71, 2006.

TASKEN, K.; AANDAHL, E. M. Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A. **Physiol. Rev.**, v.84, n.1, p.137-67, 2004.

TELFORD, S. E.; SMITH, A. I.; LEW, R. A.; PERICH, R. B.; MADDEN, A. C.; EVANS, R. G. Role of angiotensin converting enzyme in the vascular effects of an endopeptidase 24.15 inhibitor. **Br. J. Pharmacol.**, v.114, n.6, p.1185-92, 1995.

TISLJAR, U.; BARRETT, A. J. A distinct thimet peptidase from rat liver mitochondria. **FEBS Lett.**, v.264, n.1, p.84-6, 1990.

TOOZE, S. A.; FLATMARK, T.; TOOZE, J.; HUTTNER, W. B. Characterization of the immature secretory granule, an intermediate in granule biogenesis. **J. Cell. Biol.**, v.115, n.6, p.1491-503, 1991.

TULLAI, J. W.; CUMMINS, P. M.; PABON, A.; ROBERTS, J. L.; LOPINGCO, M. C.; SHRIMPTON, C. N.; SMITH, A. I.; MARTIGNETTI, J. A.; FERRO, E. S.; GLUCKSMAN, M. J. The neuropeptide processing enzyme EC 3.4.24.15 is modulated by protein kinase A phosphorylation. **J. Biol. Chem.**, v.275, n.47, p.36514-22, 2000.

VAN DE LOOSDRECHT, A. A.; NENNIE, E.; OSSENKOPPELE, G. J.; BEELEN, R. H.; LANGENHUIJSEN, M. M. 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.

VAN HEMERT, M. J.; STEENSMA, H. Y.; VAN HEUSDEN, G. P. 14-3-3 proteins: key regulators of cell division, signalling and apoptosis. **Bioessays**, v.23, n.10, p.936-46, 2001.

VERHOEF, P. A.; ESTACION, M.; SCHILLING, W.; DUBYAK, G. R. P2X7 receptor-dependent blebbing and the activation of Rho-effector kinases, caspases, and IL-1 beta release. **J. Immunol.**, v.170, n.11, p.5728-38, 2003.

VINCENT, B.; DIVE, V.; YIOTAKIS, A.; SMADJA, C.; MALDONADO, R.; VINCENT, J. P.; CHECLER, F. Phosphorus-containing peptides as mixed inhibitors of endopeptidase 3.4.24.15 and 3.4.24.16: effect on neurotensin degradation in vitro and in vivo. **Br. J. Pharmacol.**, v.115, n.6, p.1053-63, 1995.

VINCENT, B.; JIRACEK, J.; NOBLE, F.; LOOG, M.; ROQUES, B.; DIVE, V.; VINCENT, J. P.; CHECLER, F. Contribution of endopeptidase 3.4.24.15 to central neurotensin inactivation. **Eur. J. Pharmacol.**, v.334, n.1, p.49-53, 1997.

VOGEL, H. J. The Merck Frosst Award Lecture 1994. Calmodulin: a versatile calcium mediator protein. **Biochem. Cell. Biol.**, v.72, n.9-10, p.357-76, 1994.

WAHL, P.; SCHOUSBOE, A.; HONORE, T.; DREJER, J. Glutamate-induced increase in intracellular Ca²⁺ in cerebral cortex neurons is transient in immature cells but permanent in mature cells. **J. Neurochem.**, v.53, n.4, p.1316-9, 1989.

WALSH, D. A.; PERKINS, J. P.; KREBS, E. G. An adenosine 3',5'-monophosphate-dependant protein kinase from rabbit skeletal muscle. **J. Biol. Chem.**, v.243, n.13, p.3763-5, 1968.

WANG, B.; YANG, H.; LIU, Y. C.; JELINEK, T.; ZHANG, L.; RUOSLAHTI, E.; FU, H. Isolation of high-affinity peptide antagonists of 14-3-3 proteins by phage display. **Biochemistry**, v.38, n.38, p.12499-504, 1999.

WANG, C. T.; LU, J. C.; BAI, J.; CHANG, P. Y.; MARTIN, T. F.; CHAPMAN, E. R.; JACKSON, M. B. Different domains of synaptotagmin control the choice between kiss-and-run and full fusion. **Nature**, v.424, n.6951, p.943-7, 2003.

WIELAND, F. T.; GLEASON, M. L.; SERAFINI, T. A.; ROTHMAN, J. E. The rate of bulk flow from the endoplasmic reticulum to the cell surface. **Cell**, v.50, n.2, p.289-300, 1987.

WILLOUGHBY, D.; COOPER, D. M. Ca²⁺ stimulation of adenylyl cyclase generates dynamic oscillations in cyclic AMP. **J. Cell Sci.**, v.119, n.Pt 5, p.828-36, 2006.

WILSON, W. D. Tech.Sight. Analyzing biomolecular interactions. **Science**, v.295, n.5562, p.2103-5, 2002.

WU, T. J.; PAGANO, E.; MANI, S. K. A Biological Role for the Gonadotrophin-Releasing Hormone (GnRH) Metabolite, GnRH-(1-5) **J. Neuroendocrinol.**, v.21, p.293-298, 2009.

WU, T. J.; PIEROTTI, A. R.; JAKUBOWSKI, M.; SHEWARD, W. J.; GLUCKSMAN, M. J.; SMITH, A. I.; KING, J. C.; FINK, G.; ROBERTS, J. L. Endopeptidase EC 3.4.24.15 presence in the rat median eminence and hypophysial portal blood and its modulation of the luteinizing hormone surge. **J. Neuroendocrinol.**, v.9, n.11, p.813-22, 1997.

YAFFE, M. B. How do 14-3-3 proteins work?-- Gatekeeper phosphorylation and the molecular anvil hypothesis. **FEBS Lett.**, v.513, n.1, p.53-7, 2002.

YAFFE, M. B.; RITTINGER, K.; VOLINIA, S.; CARON, P. R.; AITKEN, A.; LEFFERS, H.; GAMBLIN, S. J.; SMERDON, S. J.; CANTLEY, L. C. The structural basis for 14-3-3:phosphopeptide binding specificity. **Cell**, v.91, n.7, p.961-71, 1997.

YAMAMOTO, M.; CHIKUMA, T.; YAMASHITA, A.; YAMAGUCHI, M.; HOJO, H.; OZEKI, Y.; AHMED, M.; KATO, T. Anterograde axonal transport of endopeptidase 24.15 in rat sciatic nerves. **Neurochem. Int.**, v.42, n.3, p.231-7, 2003.

YAMNIUK, A. P.; VOGEL, H. J. Calmodulin's flexibility allows for promiscuity in its interactions with target proteins and peptides. **Mol. Biotechnol.**, v.27, n.1, p.33-57, 2004.

YANG, Y.; MA, J.; SONG, Z.; WU, M. HIV-1 TAT-mediated protein transduction and subcellular localization using novel expression vectors. **FEBS Lett.**, v.532, n.1-2, p.36-44, 2002.

YAP, K. L.; KIM, J.; TRUONG, K.; SHERMAN, M.; YUAN, T.; IKURA, M. Calmodulin target database. **J. Struct. Funct. Genomics**, v.1, n.1, p.8-14, 2000.

YORK, I. A.; MO, A. X.; LEMERISE, K.; ZENG, W.; SHEN, Y.; ABRAHAM, C. R.; SARIC, T.; GOLDBERG, A. L.; ROCK, K. L. The cytosolic endopeptidase, thimet oligopeptidase, destroys antigenic peptides and limits the extent of MHC class I antigen presentation. **Immunity**, v.18, n.3, p.429-40, 2003.

ZAHM, D. S.; GROSU, S.; WILLIAMS, E. A.; QIN, S.; BEROD, A. Neurons of origin of the neurotensinergic plexus enmeshing the ventral tegmental area in rat: retrograde labeling and in situ hybridization combined. **Neuroscience**, v.104, n.3, p.841-51, 2001.

ZEHE, C.; ENGLING, A.; WEGEHINGEL, S.; SCHAFER, T.; NICKEL, W. Cell-surface heparan sulfate proteoglycans are essential components of the unconventional export machinery of FGF-2. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.103, n.42, p.15479-84, 2006.

ANEXOS

TRABALHOS PUBLICADOS