

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

MARIANA LEMOS DUARTE

Identificação e validação funcional de novos alvos das PKCs
em célula tronco embrionária

Versão corrigida da Tese conforme Resolução CoPGr 5890
O original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP

São Paulo

Data do Depósito na SPG:
28/05/2013

MARIANA LEMOS DUARTE

Identificação e validação funcional de novos alvos das PKCs
em célula tronco embrionária

Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do Título de
Doutor em Ciências (Bioquímica)

Orientadora: Profa. Dra. Deborah Schechtman

São Paulo

2013

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

D812i Duarte, Mariana Lemos
Identificação e validação funcional de novos alvos das PKCs em
célula tronco embrionária / Mariana Lemos Duarte. -- São
Paulo, 2013.
188p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de
São Paulo. Departamento de Bioquímica.
Orientador: Schechtman, Deborah

1. Química biológica 2. Células-tronco : Medicina 3. Citoesqueleto :
Biologia celular 4. Metabolismo : Bioquímica I. T. II. Schechtman,
Deborah, orientador.

574.192 CDD

À minha Família

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra Deborah Schechtman, por ter me recebido em seu laboratório, pelo seu apoio e imensa dedicação. Principalmente, por me fazer acreditar que com o trabalho intenso tudo pode ser possível.

Ao Dr Walter Colli e à Dra Maria Julia, por terem nos acolhido no laboratório 1020, por nossas conversas e por me mostrar uma nova perspectiva sobre a ciência. Em especial à Dra Julia, por me orientar nos momentos mais difíceis e principalmente pela sua sabedoria, carinho, compaixão e afeto.

Ao Dr Ivan Schumacher, por sempre escutar minhas idéias mirabolantes, pela sua paciência e entusiasmo. Por nossas conversas de elevar o espírito, por me ensinar a gostar de São Paulo e principalmente por sua amizade.

À minha família, meus pais Célia e Victor, meu pilar e inspiração. A minhas irmãs, Livia e Thais por dar sentido e alegria a minha vida.

Ao Raphael Dias Teixeira, minha força, paixão e paz. Por estar ao meu lado nas noites mais frias e nos mais belos domingos de sol.

Ao meu irmão Florêncio Freitas, por ter me adotado em São Paulo, por nossos cafés, conversas de liquidificador, carnavais, caminhadas. Por ser o padrinho dos meus filhos.

À Dra Denise Aparecida Berti, minha Dedeção, e a Eliciane Mattos Cevolani, minha companheirinha. Meu doutorado teria sido em preto e branco sem a amizade, apoio, incentivo, conversas, estefanias e a companhia de vocês.

A todos do laboratório do bloco 10 inferior, sala 1020, que durante esse quatro anos foi a minha casa e grande parte do meu mundo. Ao Dr Ricardo Giordano, Chrislaine, Milton, Renato, Leila, Fenny, Jussara, André, Antero, Maria Luiza, Laura, Tanise, Rubens.

A Celinha, pelo seu carinho, risadas e puxões de orelha. Em especial por todos os seus abraços de mãe e bolos de cenora;

Ao Robertinho, por seu bom humor, suas músicas do Roberto Carlos, por suas palavras bonitas que durante esses quatro anos fizeram meus dias mais felizes. Thank very the halls.

Ao Mestre Carlos Henrique Gomes, Carlitos, por sua amizade, por gostar da minha comida, por nossas conversas e principalmente por suas risadas (elas me fazem sentir bem).

Ao Matheus Bonato, Darlene Pena, Nicole Milaré, pelas discussões de idéias e colaboração.

Ao Helio Miranda Costa-Junior, por ter me ensinado os primeiros passos do mundo proteômico.

Ao meu primeiro IC, Bruno Campovila, Brunovisk, por me ajudar nos primeiros momentos da minha tese, por nossas risadas e jalecos "roubados" do biotério.

À Dra Alícia Kowaltowski pela sua colaboração, por sempre estar aberta a tirar minhas dúvidas e por todas as nossas discussões de idéias.

À Dra Ana Zeri e Dr Paulo Sergio, do Laboratório Nacional da Luz Síncroton, pela colaboração e contribuição ao desenvolvimento do projeto.

À Camile, Adriana, Wilton e a Kaliandra, por ajudar no desenvolvimento do projeto.

À minhas amigas, minha união mais estável e duradoura, Michelli Pillat e Juliana Osaki, por todo o carinho, respeito e confiança. Dividir nosso teto e parte da minha vida com vocês foi muito importante para mim.

Ao Dr Raphael Queiroz, Augusto, por sua amizade, conversas, discussão de idéias, incentivo, pelos cafés da manhã, japonês e churrascos de queijo.

Ao Forti Grupo, Giseli, Alex e Thompson, pela amizade, risadas, terapias em grupo e pelos nossos memoráveis churrascos.

À Dra Cecília Ikegami, minha Cecy, por sua amizade, carinho e afeto. Por nossas conversas e por me escutar com seu compreensivo olhar.

A JoãoSbrai, minha primeira casa. Em especial a minha maninha Tchela, Felps, Arnaldo, a minha querida amiga Carla e seus churrascos de amendoin.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo apoio financeiro para o desenvolvimento desta tese.

"O correr da vida embrulha tudo.
A vida é assim: esquenta e esfria,
aperta e daí afrouxa,
sossega e depois desinquieta.
O que ela quer da gente é coragem"

Guimarães Rosa

RESUMO

Duarte, M.L. **Identificação e validação funcional de novos alvos das PKCs em célula tronco embrionária**. 2013. 162p. Tese - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Algumas das estratégias utilizadas para entender a biologia de células tronco embrionária (CTE) são baseadas na identificação de cascatas de sinalização que induzem a diferenciação e auto-renovação das CTE através da interferência seletiva de processos específicos. A família das proteínas quinase C (PKC) é conhecida por participar dos processos de auto-renovação e diferenciação celular em CTE, entretanto, o papel específico das diferentes isoenzimas das PKCs ainda precisa ser elucidado. Desta forma investigamos o papel das PKCs atípicas (aPKCs) em CTE indiferenciadas utilizando um inibidor específico para estas serina/ treonina quinases, o peptídeo pseudosubstrato das aPKCs, e fosfoproteômica. A maioria das proteínas identificadas cuja fosforilação reduziu após o tratamento com o inibidor das aPKC, são proteínas envolvidas com o metabolismo principalmente com a via glicolítica. Além disso, a inibição das aPKCs levou a redução do consumo de glicose, secreção de lactato, acompanhada da redução da atividade da lactato desidrogenase, e aumento da fosforilação oxidativa, sendo analisada através do consumo de oxigênio após o tratamento com oligomicina e FCCP. Verificamos também que as aPKCs são capazes de fosforilar diretamente a piruvato quinase. A glicólise aeróbica parece ser fundamental para a manutenção da indiferenciação das CTE, e demonstramos que as aPKCs participam deste processo auxiliando na auto-renovação das CTE indiferenciadas. Também observamos que as aPKCs assim como a PKC β I modulam a fosforilação da α -tubulina, porém ao passo que as aPKCs interagem com a α -tubulina durante a interfase, a PKC β I interage com a mesma apenas durante a mitose. Estes resultados motivaram a segunda parte da tese, na qual o papel da fosforilação da α -tubulina pela PKC β I foi investigado. O resíduo de treonina 253, conservado em diversas espécies de vertebrados e localizado na interface de polimerização entre a α - e a β -tubulina foi identificado, como um

novo sítio de fosforilação da α -tubulina pela PKC β I. Este sítio não está em um consenso linear para a PKC, entretanto é um consenso formado estruturalmente, onde aminoácidos básicos distantes na sequência linear se tornam justapostos na estrutura terciária da proteína. Estudos de simulação por dinâmica molecular demonstraram que a interação entre a α e β -tubulina aumenta após esta fosforilação, uma vez que T253 fosforilada passa a interagir com K105, um resíduo conservado na β -tubulina. A fosforilação *in vitro* de α -tubulina aumenta a taxa de polimerização da tubulina e a inibição da PKC β I em células reduziu a taxa de repolimerização do microtubulo após o tratamento com nocodazol. Além disso, a importância da fosforilação deste sítio foi demonstrada pelo fato de que um mutante fosfomimético GFP- α -tubulina, T253E ser mais incorporado no fuso mitótico ao passo que T253A foi menos incorporado do que a proteína selvagem. Nossos dados suportam a hipótese que os consensos estruturais formados podem ser importantes sítios de reconhecimento pelas quinases e que a fosforilação de T253 da α -tubulina afeta a estabilidade do polímero. Em conclusão, utilizando métodos de fosfoproteômica e interferência seletiva de vias de sinalização, combinados a validações experimentais dos alvos identificados podemos propor a importância funcional das aPKCs e PKC β I em CTE indiferenciadas.

Palavras-chave: Célula tronco embrionária, metabolismo, tubulina, aPKCs, PKC β I, auto-renovação

ABSTRACT

Duarte, M.L. **Identification and functional validation of new targets of PKC in embryonic stem cell.** 2013. 162p. PhD Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Some of the strategies used to understand stem cell biology are based on the identification of signalling cascades that lead to differentiation and self-renewal of embryonic stem cells (ESC) by selective interference of specific signalling processes. The protein kinase C (PKC) family is known to participate in ESC self-renewal and differentiation, however, the specific role of the different PKC isoenzymes in these cells remains to be determined. Therefore, we investigated the role of atypical PKCs (aPKC) in undifferentiated ESC using a specific inhibitor for these serine/ threonine kinases, pseudo-substrate peptide of aPKCs, and phosphoproteomics. The majority of proteins whose phosphorylation decreased upon aPKC inhibition, are proteins involved in metabolism in particular with the glycolytic pathway. Besides that, inhibition of aPKCs led to a decrease in glucose uptake and lactate secretion, followed by a decrease in lactate dehydrogenase activity, and an increase in mitochondrial activity as measured by oxygen consumption after treatment with oligomycin and a chemical uncoupler. We also verified that aPKCs are able to directly phosphorylate pyruvate kinase. Aerobic glycolysis seems to be fundamental for the maintenance of undifferentiated ESC, and we demonstrated that aPKCs participate in these processes helping to maintain self-renewal of undifferentiated ESC. We also observed that aPKCs as PKC β I modulate the phosphorylation of α -tubulin, however, while aPKCs interact with α -tubulin during interphase PKC β I interacts with α -tubulin only during mitosis. These results lead to the second part of this thesis. We investigated the role of α -tubulin phosphorylation by PKC β I. Identifying threonine 253, a conserved residue in several vertebrate species, of localized at the polymerization interface between α - and β -tubulin, as a phosphorylation site of α -tubulin by PKC β I. This site is not in a linear consensus for PKC, however, it is in a structurally formed consensus, where basic aminoacids distant in the linear sequence are juxtaposed in the

three dimensional protein structure. Simulation studies by molecular dynamics show that the interaction between α and β -tubulin increases upon this phosphorylation, once, phosphorylated T253 interacts with com K105, a conserved residue in β -tubulin. The *in vitro* phosphorylation of α -tubulin increased tubulin polymerization rate and inhibition of PKC β I in cells reduced repolymerization rate of microtubules upon treatment with nocodazole. Besides that, the importance of this phosphorylation site were demonstrated by the fact that a phosphomimetic mutant GFP- α -tubulina, T253E is more incorporated in mitotic fuses while T253A is less than wild type. Our data support the hypothesis that structural consensus may be important sites recognized and that T253 phosphorylation of α -tubulin affects the polymer stability. In conclusion, using phosphoproteomics methods and selective interference of signal transduction pathways combined with experimental validation studies of the identified targets we can propose roles for aPKCs and PKC β I in undifferentiated ESC.

Keywords: Embrionic stem cell, metabolism, tubulin, aPKCs, PKC β I, self-renewal

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS

Figura 1: Modelo simplificado de algumas vias de transdução de sinais responsáveis pela manutenção da auto-renovação das CTE murina..	26
Figura 2: A diferença no perfil bioenergético entre as CTE e células somáticas.....	32
Figura 3: Esquema dos domínios funcionais das diferentes isoenzimas das PKCs..	35
Figura 4: Diagrama das diferentes conformações das PKCs.....	38
Figura 5: Mecanismos de inibição seletiva das PKCs.....	41
Figura 6: Detecção dos alvos das aPKCs em CTE E14TG2A, indiferenciada, utilizando corante fosfo-específico.	73
Figura 7: Classificação funcional das proteínas cuja fosforilação diminuiu após o tratamento com o inibidor das aPKCs.	78
Figura 8: A inibição das aPKCs reduz a fosforilação de algumas enzimas envolvidas na biossíntese de intermediários da via glicolítica.....	81
Figura 9: Validação da Piruvato Quinase-2 (PKM2) como um dos alvos das aPKCs em CTE indiferenciada.	83
Figura 10: Piruvato Quinase é um substrato direto das aPKCs.	85
Figura 11: GAPDH, ENO e LDH sofrem redução da fosforilação após inibição das aPKCs em CTE indiferenciadas.	86
Figura 12: ENO e LDH não são substratos direto das aPKCs.	87
Figura 13: A inibição das aPKCs reduz a atividade da Lactato Desidrogenase em CTE E14TG2A indiferenciada.	88
Figura 14: A inibição das aPKCs reduz o consumo de glicose e produção de lactato	90
Figura 15: Análise da taxa metabólica da CTE TG2A indiferenciada tratada com o peptídeo inibidor das aPKCs, pelo Bioprofile®.....	92
Figura 16: Análise da taxa metabólica da CTE TG2A indiferenciada tratada com o peptídeo inibidor das aPKCs, por RNM-H.....	93
Figura 17: O consumo de oxigênio após o tratamento das em CTE indiferenciada com o peptídeo aPKC- ψ S.	95
Figura 18: Interação entre os substratos (diretos ou indiretos) da aPKCs detectados por fosfoproteômica.....	97
Figura 19: RhoGDI apresentou a sua fosforilação reduzida após a inibição das aPKCs	98

Figura 20: α -tubulina sofre redução da fosforilação após inibição das aPKCs em CTE indiferenciada.	99
Figura 21: α -tubulina se co-localiza com as aPKCs e PKC β I em diferentes estágios do ciclo celular.....	101
Figura 22: α -tubulina também se co-localiza com as PKC β I durante a mitose em tipos celulares.	102
Figura 23: α -tubulina é substrato direto da PKC β I.	104
Figura 24: Identificação do sítio de fosforilação de α -tubulina pela PKC β I utilizando espectrometria de massas.....	105
Figura 25: Localização da T253 na estrutura terciária de α -tubulina.....	107
Figura 26: T253 de α -tubulina está localizada na interface de interação entre α - e β -tubulina.....	109
Figura 27: K105 de β -tubulina é conservado em várias espécies..	110
Figura 28: A fosforilação de T253E é capaz de aumentar a entalpia de ligação do polímero.....	111
1	
Figura 29: A fosforilação de α -tubulina aumenta a sua taxa de polimerização <i>in vitro</i>	112
Figura 30: α -tubulina repolimeriza mais lentamente após inibição da PKC β I.	114
Figura 31: Fosforilação de α -tubulina induz estabilização do polímero.....	119
Figura 32: Mutações sítio dirigidas de T253 da α -tubulina alteram a incorporação de α -tubulina no fuso mitótico.	119
Figura 33: Modelo indicando o envolvimento das aPKCs na modulação das principais proteínas metabólicas identificadas no fosfoproteoma.....	139
Tabela 1: Sequência dos oligonucleotídeos utilizados para a realização das mutações sítio dirigidas em α -tubulina.....	64
Tabela 2: Identificação das proteínas cuja fosforilação foi reduzida após o tratamento com o peptídeo aPKC- ψ S.....	75
Tabela 3: Identificação das proteínas metabólicas que sofreram redução da fosforilação após o tratamento com o peptídeo aPKC- ψ S.....	80
Tabela 4: Identificação das proteínas estruturais que sofreram redução da fosforilação após o tratamento com o peptídeo aPKC- ψ S.....	97

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2HG: 2-hidroxiglutarato

6PG: 6-fosfogluconato

AceK: isocitrato desidrogenase quinase/fosfatase

AKT: *RAC-alpha serine/threonine-protein kinase*

aPKC- ψ S: Peptídeo pseudossustrato das aPKCs

BMP4: *Bone Morphogenetic Protein 4*

c-Myc: *Myc proto-oncogene protein*

CTE: Células Tronco Embrionárias

DAG: Diacilglicerol

DHEA: Dehidroepiandrosterone

DTT: Ditionotreitól

ENO: Enolase

FAD: Flavina-Adenina Dinucleótido

FoxD3: *Forkhead box protein D3*

G6PD: Glicose 6-fosfato Desidrogenase

GAPDH: Gliceraldeído 3-fosfato Desidrogenase

GDP: Guanosina difosfato

GP130: *Glycoprotein 130*

GPD2: Glicerol 3-fosfato Desidrogenase

GSK3: *Glycogen synthase kinase 3*

GTP: Guanosina trifosfato

HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana do *inglês human immunodeficiency virus*

HSP: *Heat Shock Proteins*

IDH: Isocitrato Desidrogenase

IEF: Focalização Isoelétrica

IL-6: Interleucina 6

IP3: inositol-1.4.5-trifosfato

iPSC: células pluripotentes induzidas *do inglês induced Pluripotent Stem Cells*

JAK: Janus Kinase

Klf4: Krüppel-like transcription factor

LDH: Lactato Desidrogenase

LIF: *Leukemia Inhibitory Factor*

LIFR: *Leukemia Inhibitory Factor Receptor*

MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*)

MEK: *ERK activator kinase*

mtDNA: DNA mitocondrial

mTOR: *Mammalian target of rapamycin*

NAD: Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo

NADP: Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato

Nanog: *Homeobox transcription factor Nanog*

OCT: Fator de transcrição POU (*POU transcription factor*)

p300/CBP: [*CREB (cAMP-response-element-binding protein)-binding protein*]

PDB: *Protein Data Bank*

PDG:Fosfogluconato desidrogenase

PDK1: *3-phosphoinositide Dependent Protein Kinase-1*

PHGDH: 3-fosfoglicerato Desidrogenase

PI3K: *Phosphoinositide 3-kinase*

PIP2: *Phosphatidilinositol-4,5-bifosfato*

PIs: Fosfatidilinositol

PKC: Proteínas quinase C.

PKM: Piruvato Quinase

PLC: Fosfolipase C

PS: Fosfatidilserina

PSAT1: *Phosphoserine Transaminase*

PSP: Fosfoserina Fosfatase

PTM: Modificação pós-traducional *do inglês post translational modification*

Racks: Receptores de Proteína Kinase C Ativada *do inglês Receptor for activated C kinase*

REX-1: *Reduced expression protein 1*

RhoA: *Aplysia ras-related homolog 12*

ROS: Espécies Reativas de Oxigênio

SDS-PAGE: Eletroforese Poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio

SFS: Soro fetal bovino

SMAD1: *Transforming growth factor-beta signaling protein 1*

SOX: *SRY (sex determining region Y)-box 2*

STAT3: *Signal transducer and activator of transcription 3*

TALDO: Transaldolase

TAT: *Transactivator of transcription*

Tbx-3: *T-box transcription factor protein*

Tcl-1A: *T-cell leukemia/lymphoma 1A*

TCP-1 β : *T-complex protein 1 subunit beta*

TGF β : *Transforming Growth Factor β*

TRAP1: TNF receptor-associated protein 1

Wnt: *Wingless-type MMTV integration site family*

ZFX: *X-linked zinc finger protein*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
1.1. Células tronco.....	22
1.1.1. As células tronco embrionária (CTE)	24
1.1.1.1. <i>Algumas vias de sinalização responsáveis pela manutenção das características das CTE:</i>	25
1.2. Células Tronco Embrionária e Metabolismo	30
1.3. A importância da fosforilação como modificação pós-traducional responsável pela modulação de vias de sinalização em CTE.....	32
1.4. A Família da Proteína Quinase C (PKC)	33
1.4.1. Etapas da ativação das PKCs	36
1.4.2. A especificidade dos substratos das PKCs	39
1.4.3. Estratégias para inibição seletiva das PKCs.....	40
1.5. Proteína Quinase C e Célula Tronco Embrionária.....	42
2. OBJETIVOS	47
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	49
3.1. Peptídeos	49
3.2. Cultura de células.....	49
3.3. Identificação de alvos diretos e indiretos das aPKCs por fosfoproteoma	51
3.3.1. Preparação de lisados para géis bidimensionais	51
3.3.2. Eletroforese Bidimensional.....	51
3.3.3. Detecção das proteínas.....	52
3.3.3.1. <i>Detecção de fosfoproteínas</i>	52
3.3.3.2. <i>Detecção de proteínas totais</i>	53
3.3.4. Análise dos géis.....	53
3.3.5. Secção das proteínas do gel e identificação por espectrometria de massa	54
3.3.6. Identificação das proteínas e sua caracterização funcional	55
3.4. Validação de Alvos das aPKCs	56
3.5. Predição de interações entre alvos das aPKCs.....	56
3.6. Avaliação da atividade enzimática da Lactato Desidrogenase e Piruvato Quinase	57
3.7. Análise do perfil metabólico.....	57

3.7.1.	Consumo de glicose e produção de lactato	57
3.7.2.	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN-H)	58
3.7.3.	Consumo de oxigênio.....	58
3.7.4.	Ensaio de fosforilação <i>in vitro</i>	59
3.8.	Identificação dos resíduos de α -tubulina fosforilados	60
3.9.	Alinhamento de sequência, dinâmica molecular e cálculo de energia de ligação dos polímeros de tubulina	61
3.10.	<i>Imunoblotting</i>	63
3.11.	Plasmídeos e mutação sítio-dirigida da α -tubulina.....	64
3.12.	Transfecção da linhagem celular HEK 393T com α -tubulina	64
3.13.	Fracionamento celular	65
3.14.	Imunoprecipitação	66
3.15.	Polimerização da tubulina <i>in vitro</i>	67
3.16.	Microscopia Confocal de Fluorescência.....	68
3.16.1.	Coleta e imunofluorescência dos embriões de camundongo	69
4.	RESULTADOS	72
4.1.	Elucidação funcional das aPKCs em células tronco indiferenciada, identificação e caracterização dos substratos destas isoenzimas.	72
4.1.1.	Identificação dos alvos das aPKCs em CTE indiferenciadas utilizando fosfoproteômica.....	72
4.1.2.	Caracterização funcional da aPKC no controle metabólico.....	79
4.1.3.	Análise da atividade enzimática da lactato desidrogenase e da piruvato quinase	88
4.1.4.	Análise do perfil metabólico das CTEs indiferenciada após inibição das aPKCs	89
4.1.4.1.	Alteração no consumo de glicose e produção de lactato	89
4.1.4.2.	Análise da atividade mitocondrial.....	94
4.1.5.	Caracterização funcional da aPKC na manutenção do citoesqueleto e polarização celular	96
4.1.6.	α -tubulina como alvo das aPKCs e da PKC β I	100
4.2.	Estudo da modificação pós-traducional de α -tubulina pela PKC β I e a sua importância funcional.	103
4.2.1.	Identificação da α -tubulina como substrato direto da PKC β I	103
4.2.2.	T253 como um novo sítio consenso estrutural da PKC	106
4.2.3.	Estudos de dinâmica molecular indicam a importância da fosforilação de T253	108
4.2.4.	A importância da fosforilação de α -tubulina pela PKC β I na cinética de polimerização do microtúbulo	111

4.2.5. O efeito da fosforilação T253 de α -tubulina na estabilização do polímero	115
4.2.6. A fosforilação de α -tubulina durante a divisão celular	118
5. DISCUSSÃO	122
5.1. A importância das aPKCs em CTEs indiferenciada	123
5.1.1. O controle metabólico em CTE	124
5.1.1.1. <i>Alvos das aPKCs identificados envolvidos na via glicolítica.....</i>	125
5.1.1.2. <i>Alvos das aPKCs identificados envolvidos na via das pentoses</i>	130
1	
5.1.1.3. <i>Alvos das aPKCs identificados envolvidos na biossíntese de serina</i>	133
5.1.1.4. <i>Alvos das aPKCs identificados envolvidos no ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa.....</i>	135
5.1.1.5. O efeito da inibição das aPKCs no perfil bioenergético das CTEs indiferenciadas	138
5.1.2. O controle do citoesqueleto, polarização e adesão celular em CTE 1401	
5.1.2.1. <i>Alvos das aPKCs identificados: Chaperonas e proteínas reguladoras da dinâmica do citoesqueleto</i>	141
5.1.2.2. <i>Proteínas que interagem com a família das Ras-GTPases.....</i>	144
5.1.2.3. <i>Proteínas do citoesqueleto.....</i>	145
5.2. A importância das PKCβI na fosforilação de α-tubulina.....	147
5.2.1. <i>A dinâmica do microtúbulo.....</i>	149
5.2.2. <i>O conceito de um sítio consenso para a PKC estruturalmente formado.....</i>	151
6. CONCLUSÃO.....	155
7. REFERÊNCIAS	158
8. ANEXO (SÚMULA CURRICULAR)	195

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Células tronco

As células tronco foram assim nomeadas por fundamentalmente apresentarem a característica de originar diversos tipos celulares (revisado por Zhu Z. & Huangfu D., 2013). A alta taxa de replicação e a capacidade de se auto-renovar, isto é, a capacidade de proliferar, mantendo a pluripotência (Zhao W. *et al.*, 2012), são uma das principais características das células tronco (Yousefi M. *et al.*, 2012).

As células tronco podem ser subdivididas em dois grupos principais, as células tronco embrionárias e as células tronco adultas ou somáticas. As células tronco adultas podem ser encontradas em diversos tipos de tecido (Spradling A *et al.*, 2001), sendo as células tronco hematopoiéticas e mesenquimais os tipos celulares mais bem estudados. A principal diferença entre as células tronco embrionária (CTE) e adulta está na capacidade de diferenciação. Enquanto as CTE são pluripotentes, ou seja, são capazes de diferenciar em todos os tipos celulares do organismo com exceção de algumas células que formam a placenta; as células tronco adulta são multipotente, sendo capazes de se diferenciar em um número limitado de tecidos (Zhao W. *et al.*, 2012).

A primeira descrição sobre a existência de células tronco adulta foi no início de 1930, onde através da utilização de raio-X foi observado a alta sensibilidade de um grupo específico de células hematopoiéticas que não apresentavam características similares as outras células do tecido sanguíneo (Sabin F.R. *et al.*, 1932). Após uma série de observações clínicas, em que o conceito de células tumorais leucêmicas estava erroneamente associado ao de célula tronco (Lepak J.A., 1948; Anlyana A.J., 1954; Anastasea-Vlachou C. *et al.*, 1961), Till e McCulloch,

em 1961, observaram pela primeira vez que um único grupo de células hematopoiéticas era capaz de gerar todos os tipos de células sanguíneas *in vivo* (Till J.E. & McCulloch E.A., 1961).

Muitos autores acreditam que doenças como Parkinson (Martínez-Morales P.L., *et al.*, 2013), Alzheimer (Kondo T. *et al.*, 2013), diabetes (Li M. & Ikehara S., 2013), doenças cardíacas (Iglesias-García O. *et al.*, 2013), esclerose múltipla (Mandana M.B. *et al.*, 2013) e distrofia muscular (Shi H. *et al.*, 2013) podem ter sua cura associada à aplicação da terapia celular com células tronco. Porém o uso das mesmas é bastante controverso, isso porque, as células tronco adultas têm uma capacidade de diferenciação limitada e as embrionárias, que dariam origem aos múltiplos tipos celulares, tem sua origem na massa interna de blastocistos do embrião em desenvolvimento (Annas G.J. *et al.*, 1999).

Takahashi e colaboradores, em 2006, foram capazes de desenvolver células tronco induzidas a partir de células somáticas. Conhecidas como iPSC (*induced Pluripotent Stem Cells*), essas células foram criadas a partir da transfecção de apenas quatro genes fatores de transcrição Oct4 (*POU transcription factor*), c-Myc (*Myc proto-oncogene protein*), Sox-2 [*SRY (sex determining region Y)-box 2*], Klf4 (*Krüppel-like transcription factor*) em células somáticas, como por exemplo fibroblastos embrionário ou adulto (Takahashi & Yamanaka, 2006; Okita *et al.*, 2007; Wernig *et al.*, 2007). Outras combinações de fatores de transcrição como Tcl-1A (*T-cell leukemia/lymphoma 1A*), c-Myc e Sox-2, também foram capazes de induzir a formação deste tipo celular (Picanco-Castro *et al.*, 2011). Estas células têm diversas características semelhantes às CTE, podendo se diferenciar em diversos tipos celulares. As iPSC são, portanto, células tronco pluripotente obtidas a partir da

reprogramação de células somáticas diferenciadas e potencialmente podem ser utilizada para fins terapêuticos (Takahashi K. *et al.*, 2007).

Além da sua aplicação terapêutica, a partir do estudo das iPSC, um novo campo de pesquisa pode ser desenvolvido, sendo possível obter esse tipo celular a partir de células somáticas de pacientes que sofrem determinada doença genética e então utilizá-las como ferramenta de estudo para compreender melhor mecanismo moleculares dessas doenças, o que poderá auxiliar as pesquisas de novas alternativas terapêuticas (Bellin M. *et al.*, 2012; Yao J *et al.*, 2012).

Estudos anteriores ao trabalho pioneiro de Takahashi já haviam observado que diversas vias de sinalização convergem para a indução de fatores de transcrição fundamentais para o controle da auto-renovação e diferenciação celular. Sendo os fatores de transcrição como Oct4, Nanog (*Homeobox transcription factor Nanog*), STAT3 (*Signal transducer and activator of transcription 3*), Smad1 (*transforming growth factor-beta signaling protein 1*), SOX2, c-Myc e Klf4, os principais responsáveis pela manutenção da auto-renovação das CTE (Chen *et al.*, 2008), porém resta ainda elucidar as diferentes vias que levam à ativação destes fatores de transcrição.

1.1.1. As células tronco embrionária (CTE)

As CTE, originárias da massa interna do blastocisto, são capazes de se diferenciar nos mais de 200 tipos celulares (Vats A. *et al.*, 2005). Os primeiros estudos com as CTE datam de 1968, quando Garner e colaboradores desenvolveram pela primeira vez animais quiméricos utilizando células retiradas da massa interna do blastocisto (Garner R.L. *et al.*, 1968). Em 1981, dois grupos demonstraram que quando este tipo celular era plaqueado em co-cultura com

fibroblastos de origem murina, um crescimento contínuo das CTE que mantinham sua pluripotência era observado (Evans M.J. *et al.*, 1981; Martin G.R. *et al.*, 1981).

Atualmente, apesar do enorme volume de trabalhos publicados nessa área, compreender os mecanismos que controlam a capacidade de auto-renovação e de diferenciação das CTE ainda é um dos principais desafios da ciência atual (Stice S.L. *et al.*, 2006; Cervera R.P. *et al.*, 2009). O estudo com as CTE permitirá compreender melhor sobre os *mistérios* do desenvolvimento humano (Verlaillie C., 2009), e entender os mecanismos que modulam o envelhecimento (Isobe K. *et al.*, 2012) e o câncer (Briest F. *et al.*, 2012).

1.1.1.1. Algumas vias de sinalização responsáveis pela manutenção das características das CTE:

A manutenção do equilíbrio preciso e dinâmico de vias de sinalização é essencial para a auto-renovação e a diferenciação das CTE (Strauss R. *et al.*, 2012). Diversos fatores são responsáveis por este equilíbrio, dentre os principais se destacam as vias de sinalização mediada pelo LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*), a via do BMP4 (*Bone Morphogenetic Protein 4*) e finalmente a família de proteínas Wnt (*Wingless-type MMTV integration site family*); (Yousefi M. *et al.*, 2012). Essas vias estão resumidas na figura 1 e descritas a seguir:

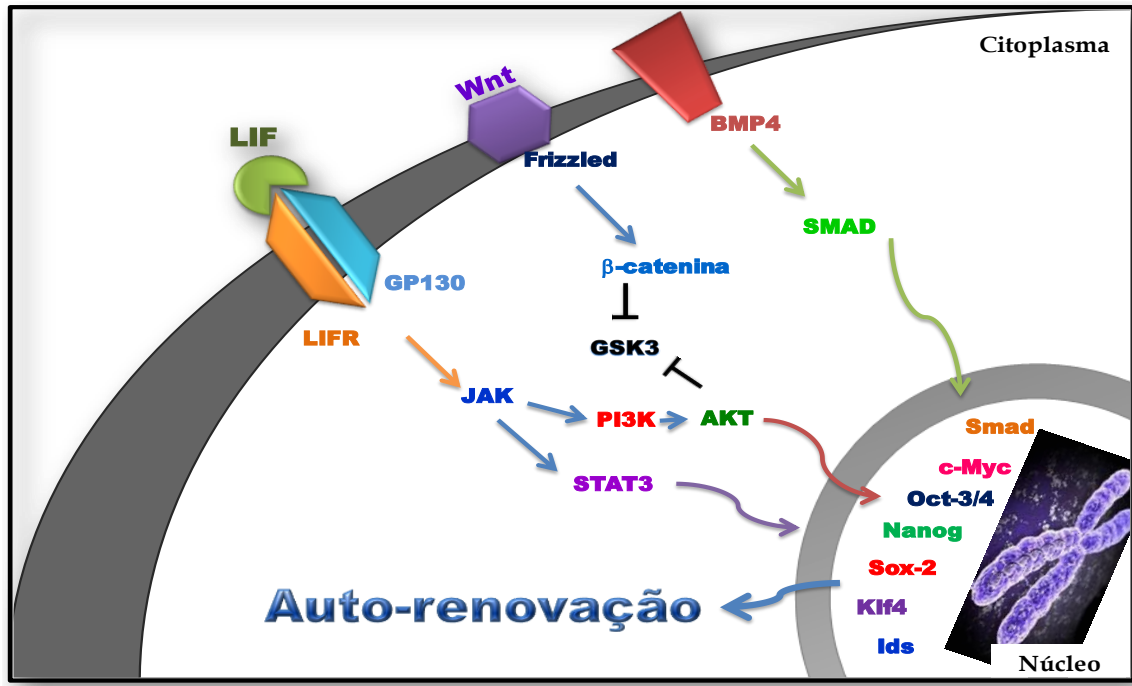


Figura 1: Modelo simplificado de algumas vias de transdução de sinais responsáveis pela manutenção da auto-renovação das CTE murina. A ligação do *Leukemia Inhibitory Factor* (LIF) aos receptores LIFR e GP130 em conjunto com a ativação dos receptores BMP4 e Frizzled irão induzir as cascatas de sinalização que induzem a transcrição de genes fundamentais para a manutenção e controle da auto-renovação das CTE bem como inibir a transcrição de genes que levam à diferenciação (adaptado de Hirai H. *et al.*, 2011).

1. Via de sinalização mediada pelo *Leukemia Inhibitory Factor* (LIF). O LIF é uma citocina da família das IL-6, que se liga ao seu receptor LIFR (LIF receptor) e à GP130 (Glycoprotein 130, também conhecida como *Interleukin receptor beta chain*) (Levy D.E. & Darnell J.E., 2002; Murray P.J., 2007). O LIF ativa uma cascata de sinalização considerada como um dos principais mecanismos de controle da manutenção do estado indiferenciado das CTE. Esta cascata tem como seus intermediários a JAK (*Janus Kinase*)/ STAT3 (*Signal transducer and activator of transcription 3*) (Matsuda T. *et al.*, 1999; Kisselva T. *et al.*, 2002). A etapa inicial dessa via consiste na dimerização do receptor LIFR/ GP130, seguida da ligação e consequente fosforilação e ativação de JAK (Starr R. & Hilton D.J., 1999). JAK ativada é capaz de fosforilar quatro resíduos de tirosina da GP130, permitindo assim a formação de um sítio de ligação para STAT3 na GP130 (Gerhartz C. *et al.*, 1996).

JAK também é responsável por fosforilar STAT3 no resíduo Y705 induzindo então sua homodimerização e translocação para o núcleo, através das importina $\alpha 3$ e $\alpha 6$ (Liu L. *et al.*, 2005; Reich N.C. *et al.*, 2006). No núcleo, STAT3 dimerizada se liga a regiões consenso de sequência TTCCSGGAA (S = C ou G) e assim ativa a transcrição de genes alvos, como por exemplo, Oct4, STAT3, Smad1, Sox2, Zfx (*X-linked zinc finger protein*), c-Myc, n-Myc, Klf4, responsáveis pela manutenção das CTEs no seu estado indiferenciado (Chen X. *et al.*, 2008).

Outra via de sinalização mediada pelo LIF, apresenta como intermediários principais as proteínas PI3K (*Phosphoinositide 3-kinase*) / AKT (*RAC-alpha serine/threonine-protein kinase*). A cascata de sinalização dessa via tem início na ativação da PI3K e fosforilação da JAK, que por sua vez ativa a AKT (Paling N.R. *et al.*, 2004). AKT ativada é capaz de induzir a proteína Acetil Transferase p300/CBP [*CREB (cAMP-response-element-binding protein)-binding protein*] a acetilar e ativar STAT3 (Yuan Z.L. *et al.*, 2005). Dessa maneira, a acetilação de um resíduo de lisina da STAT3 é também um dos responsáveis por estabilizar e ativar a sua forma dimérica, sendo esta outra modificação pós-traducional responsável por ativar STAT3. Além da ativação da STAT3, AKT é o principal inibidor da GSK3 (*Glycogen synthase kinase 3b*) (Cartwright P. *et al.*, 2005). Cabe destacar que além da sua função metabólica, GSK3 é responsável por inibir a atividade de dois fatores de transcrição: Nanog e c-Myc. Através da inibição de GSK3 observa-se um aumento dos níveis desses fatores de transcrição, ambos fundamentais para a manutenção da auto-renovação de CTE (Korur S. *et al.*, 2009; Kirby L.A. *et al.*, 2012).

A via de sinalização mediada por LIF e PI3K também foi capaz de induzir a expressão de Nanog e Oct-4, possivelmente via a ativação de Tbx-3 (*T-box transcription factor protein*; Storm M.P. *et al.*, 2009). Em um estudo recente, foi

observado que a ativação de PI3K é suficiente para manter a auto-renovação e a sobrevivência das CTE (Ling L.S. *et al.*, 2013), indicando a importância fundamental desta quinase.

Dentre os fatores de transcrição, Nanog se destaca por ser fundamental para a manutenção estado indiferenciado das CTE murinas. A expressão de Nanog é observada durante as primeiras etapas da embriogênese, da mórula até a formação do blástocisto (Mitsui *et al.*, 2003; Chambers *et al.*, 2003). A depleção do mesmo, por si só, foi capaz de levar a diferenciação celular (Pan G. & Thomson J.A., 2007) e camundongos *knockout* para este gene não se desenvolvem após a implantação (Mitsui *et al.* 2003). Em adição, a superexpressão de Nanog foi suficiente para induzir a auto-renovação de CTEs, independente de citocinas (Chambers *et al.*, 2003). Os mecanismos que regulam a expressão do Nanog ainda não são completamente compreendidos, Navarro e colaboradores, em 2012, observaram que a autorrepressão do Nanog é o seu principal regulador transcricional. Em adição, sítios de ligação para os fatores OCT-4 e SOX2 foram identificados na região do promotor deste gene (Pan e Thomson, 2007) indicando que os fatores de transcrição envolvidos na auto-renovação são capazes de se interregular (Navarro *et al.*, 2012).

2. A via transduzida pelo receptor do BMP4 (*Bone Morphogenetic Protein 4*) atua em conjunto com a cascata do LIF em CTE (Ying *et al.*, 2003, Palmqvist *et al.*, 2005). As proteínas BMP são membros da família TGF β (*Transforming Growth Factor β*) e participam de importantes vias que regulam as características fundamentais das CTE. O BMP4 é capaz de ativar a SMAD4, que, por sua vez, induz a transcrição de genes responsáveis pela manutenção das CTE no seu estado indiferenciado (Yang S.M. *et al.*, 2011) (Figura 1). SMAD4 é essencial para o desenvolvimento embrionário, uma vez que camundongos *knockout* para esta

proteína não sobrevivem após 7.5 dias (Sirard C. *et al.*, 1998; Yang X. *et al.*, 1998). Por outro lado na ausência do LIF, BMP4 é capaz de ativar outros membros da família SMAD, responsáveis por reprimir genes de indiferenciação e consequentemente induzir a diferenciação celular (Liu *et al.*, 2007). Desta forma as cascatas de sinalização ativadas por BMP4 e LIF são essenciais na manutenção da auto-renovação das CTE.

3. A família de proteínas Wnt (*Wingless-type MMTV integration site family*) constitui uma via independente da via do LIF (Moon *et al.*, 2004). Através da sua ligação com receptores Frizzled, há acúmulo de β -catenina no núcleo, além de aumentar a expressão dos fatores de transcrição como OCT-4, REX-1 (*Reduced expression protein 1*), FoxD3 (*Forkhead box protein D3*) e SOX-2, responsáveis por manter a autor-renovação e inibir a diferenciação celular (Simcha *et al.*, 1998). A Wnt ainda é capaz de ativar ciclina D1 (Shtutman *et al.*, 1999). A β -catenina também é capaz de inibir a GSK3 (*Glycogen synthase kinase 3*), permitindo assim a auto-renovação das CTE (Figura 1).

Além das vias descritas anteriormente, responsáveis por manter a auto-renovação das CTEs, o mecanismo de controle da diferenciação celular tem um outro componente chave, as proteínas da família das MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*) (Brien P. *et al.*, 2013). Dentre os alvos da cascata das MAPKs, a redução da expressão do Nanog e a inibição da atividade de Klf4 (*Krüppel-like factor 4*) são dois eventos bem caracterizados por serem responsáveis por induzir a diferenciação celular das CTE. A ativação das MAPK é responsável pela diferenciação celular em um amplo espectro de tecidos, como por exemplo, a indução da formação de células neuronais e adipócitos (Binétruy B. *et al.*, 2007).

Além do controle dos fatores de transcrição, outra característica fundamental para a manutenção do estado indiferenciado das CTE é a regulação metabólica destas células.

1.2. Células Tronco Embrionária e Metabolismo

Atualmente, diversos trabalhos descrevem que o controle de algumas vias metabólicas é fundamental para a diferenciação celular (Madonna R. *et al.*, 2013; van der Windt G J. & Pearce E L., 2012). A diferenciação de células tronco embrionárias em cardiomiócitos parece estar intrinsecamente relacionada à modulação da via glicolítica (Chung *et al.*, 2010). Em 2010, Bracha e colaboradores observaram que o *knockdown* de três enzimas metabólicas (fosfoglicerato cinase, hexose-6-fosfato desidrogenase e a ATP citrato liase), induzia a diferenciação miogênica (Bracha *et al.*, 2010). Em adição, nas CTE que sofreram diferenciação celular para cardiomiócitos observou-se um aumento no número de cópias de DNA mitocondrial (mtDNA) assim como no número de mitocôndrias e no metabolismo oxidativo (St.Jhon *et al.*, 2005; Cho *et al.*, 2006).

A modulação da via das pentoses, por exemplo, tem sido relacionada ao processo de diferenciação celular. Manganeli e colaboradores, em 2012, observaram que o tratamento das CTE com DHEA (dehidroepiandrosterone) e 6PG (6-fosfogluconato), responsáveis por inibir as enzimas da via das pentoses fosfato, Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) e a Fosfogluconato desidrogenase (PDG), respectivamente, foram capaz de induzir a diferenciação celular, via cMyc e mTOR (*Mammalian target of rapamycin*) (Manganelli G. *et al.*, 2012). Cabe destacar que, fatores de transcrição como cMyc e mTOR, além de induzirem a síntese de ribose e ativar a transcrição de genes envolvidos na via das pentoses, são também

responsáveis pelo controle e destino das CTE, principalmente durante a diferenciação do endoderma (Zhou J. *et al.*, 2009; Smith K.N. *et al.*, 2010; Duvel K. *et al.*, 2010; Morrish F. *et al.*, 2009).

O perfil bioenergético das células somáticas transformadas em iPSC também é alterado (Folmes *et al.*, 2011). As células somáticas, dependentes da fosforilação oxidativa mitocondrial como fonte primária de energia (DeBerardinis *et al.*, 2008), ao serem convertidas em iPSC, se tornam mais glicolíticas e a produção de ATP passa a ser independente da disponibilidade de oxigênio (Chung *et al.*, 2007; Kondoh *et al.*, 2007). A figura 2 ilustra essa diferença no perfil metabólico entre as células tronco e as células somáticas. Resta elucidar as vias de sinalização que mantêm o perfil metabólico das CTE e conseqüentemente a sua auto-renovação.

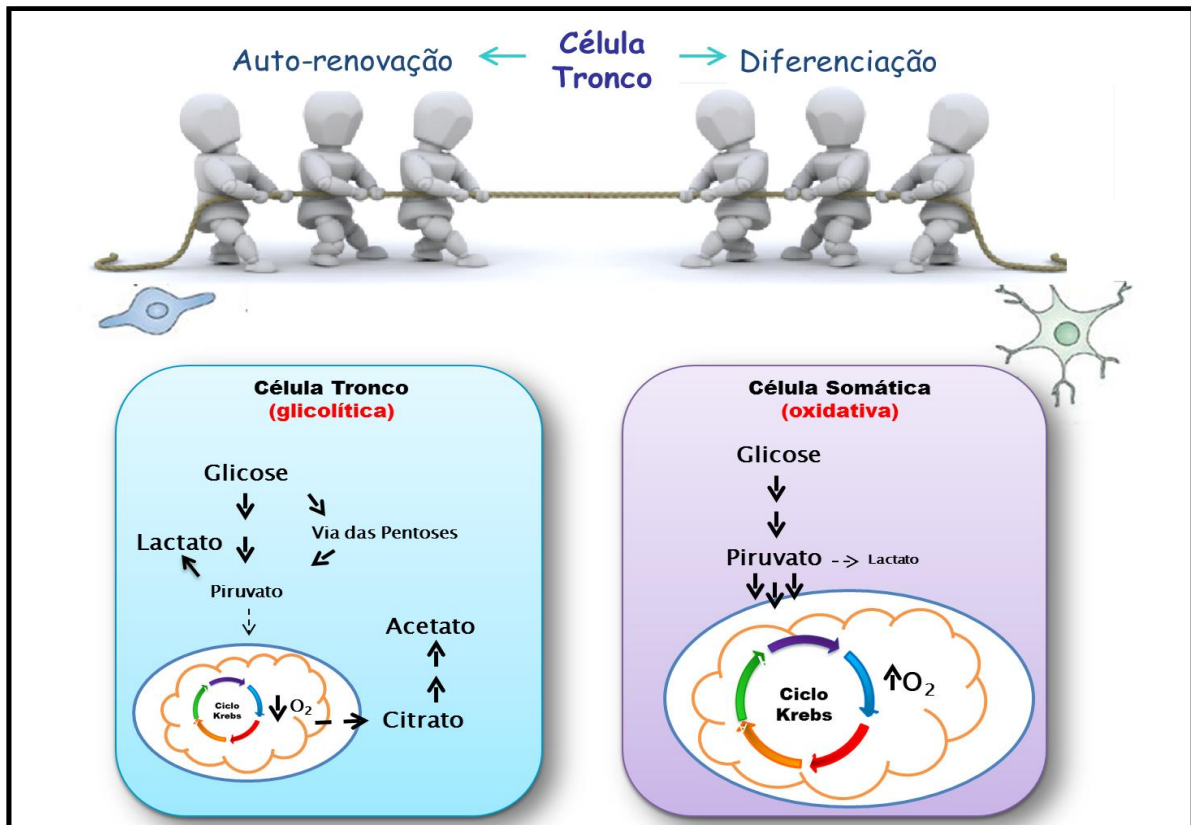


Figura 2: A diferença no perfil bioenergético das CTE e células somáticas. O equilíbrio entre a auto-renovação e a diferenciação celular das células tronco está, dentre outros fatores, intrinsecamente relacionada à mudança do perfil metabólico destas células. As células somáticas apresentam mitocôndrias mais alongada, uma baixa produção de lactato e alto consumo de oxigênio, sendo, portanto classificadas como células oxidativas. Ao passo que as células tronco, consideradas mais glicolíticas, apresentam uma mitocôndria menor, um alto consumo de glicose e produção de lactato, alta atividade da via das pentoses e baixo consumo de oxigênio (Adaptado de Folmes *et al.*, 2011).

1.3. A importância da fosforilação como modificação pós-traducional responsável pela modulação de vias de sinalização em CTE

A fosforilação é a principal modificação pós-traducional (PTM) responsável por conectar e integrar proteínas entre diversas redes de sinalização celular, sendo fundamental para regular a atividade de algumas proteínas, localização subcelular e interação proteína-proteína (Prabakaran S. *et al.*, 2012). Em células eucarióticas, entende-se por fosforilação a transferência do grupo fosforila localizado na posição

gama do ATP para resíduos de serina, treonina ou tirosina presente em substratos protéicos (Alberts B. *et al.*, 2002).

A importância da fosforilação de proteínas em eucariotos é evidenciada no fato de que 2% do genoma é formado por domínios de proteínas quinases (Manning G. *et al.*, 2002). Para se compreender a sinalização celular desencadeada por uma fosforilação específica, devem-se considerar duas características importantes da fosforilação: (i) identificação da relevância funcional da fosforilação; (ii) o contexto fisiológico em que essa PTM ocorre (Cohen P., 2001).

Hutchins e Van Hoof, em 2009, observaram que a maioria das proteínas fosforilada nos eventos iniciais da diferenciação está envolvida com a regulação da síntese protéica, modificações epigenéticas ou são fatores de transcrição (Hutchins & Robson, 2009; Van Hoof *et al.*, 2009). Dentre as quinases envolvidas nos processos de auto-renovação e diferenciação merece destaque a família da Proteína quinase C (PKC) discutida a seguir.

1.4.A Família da Proteína quinase C (PKC)

Nishizuka e colaboradores, em 1977, descreveram pela primeira vez um grupo de proteína quinases ativadas por Ca^{2+} e fosfolípido. Denominadas como Proteína quinase C (PKC), estas enzimas são capazes de fosforilar resíduos de serina e treonina (Chihara-Nakashima M. *et al.*, 1977).

A família da PKC é composta por pelo menos dez isoenzimas codificadas por nove genes diferentes em mamíferos (Nishizuka Y., 1988). Os domínios das diferentes isoenzimas podem ser subdivididos em três grupos: (i) domínio regulatório; (ii) dobradiça; (iii) domínio catalítico. Cabe destacar que o domínio

regulatório é responsável pela ligação da PKC a co-fatores necessários para sua ativação.

A classificação das dez diferentes isoenzimas de PKC em subfamílias é feita de acordo com seus requerimentos para a ativação (Newton A. C., 1995), sendo agrupadas em três famílias principais descritas a seguir e ilustradas na Figura 3.

1. As PKCs clássicas (cPKCs) incluem as isoenzimas α , β I, β II, e γ sendo ativadas pelo íon Ca^{2+} , fosfatidilserina [(2S)-2-amino-3-[(2-butanoiloxi-3-propanoiloxi)propoxi]-hidroxifosforil]oxipropanóico; (PS)] e diacilglicerol [1-Oleoil-2-acetil-glicerol; (DAG)] ou seu análogo o éster de forbol [12-O-Tetradecanoilforbol-13-acetato]. As PKCs β I e β II são isoformas originadas por *splicing* alternativo e diferem em apenas 43 aminoácidos na região V5 (Ono, Y. *et al.*, 1987).

2. As PKCs nóveis (nPKCs), correspondem as isoenzimas δ , ϵ , η , e θ . Esta subfamília não requer Ca^{2+} para a sua ativação, uma vez que não contém, no domínio C2, os resíduos de ácido aspártico que coordenam esse íon divalente. Entretanto também são dependentes dos mesmos lipídeos ativadores das cPKCs.

3. As PKCs atípicas (aPKCs) representadas pelas isoenzimas ζ e λ / ι , não dependem de Ca^{2+} para a sua ativação e não possuem afinidade pelo DAG, uma vez que são formadas por um único domínio C1. Esta subfamília da PKC é capaz de ser ativada por PS, fosfatidilinositol (PIs), ácido fosfatídico, ácido araquidônico e ceramida (Nishizuka Y. *et al.*, 1988; Newton A.C. *et al.*, 1995). Esta subfamília das PKCs apresenta ainda um domínio característico de interação proteína-proteína, conhecido como domínio PB1, (Moscat J. *et al.*, 2006), responsável pela interação com outras proteínas como membros da família PAR (Moscat J. *et al.*, 2009), ZIP/p62 (Samuels I.S. *et al.*, 2001) e MEK (*ERK activator kinase*); (Ponting C. *et al.*, 2002).

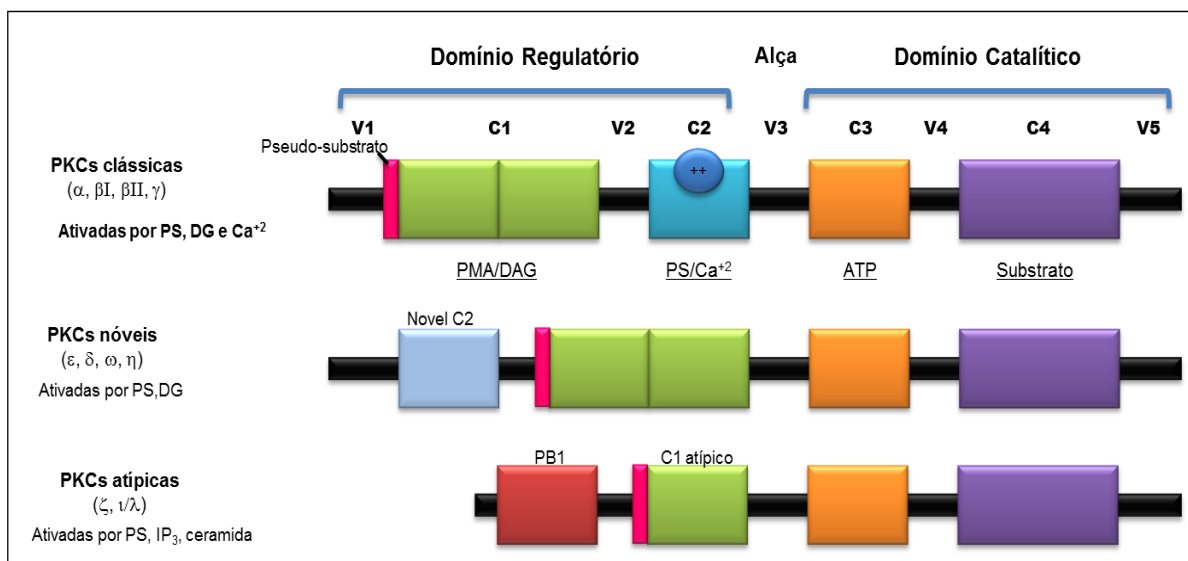


Figura 3: Esquema dos domínios funcionais das diferentes isoenzimas das PKCs. Os domínios mais conservados foram denominados de C e os domínios mais variáveis de V. O domínio C1 duplo presente nas isoformas das PKCs clássicas e noveis é responsável pela interação com o éster de forbol/ DAG. A região C2 (também conhecido como V1 nas nPKCs) é responsável pela ligação ao íon cálcio nas cPKCs, além de ser o domínio responsável pela interação com fosfatidil serina tanto nas cPKCs como nas nPKCs. As regiões C3 e C4 contêm sítios de ligação para o ATP e o substrato. As aPKCs não possuem o domínio C2 e possuem um único domínio C1 não apresentando desta forma afinidade para o DAG. O domínio PB1, presente nas aPKCs é o domínio de interação proteína-proteína. O domínio V5, presente em todas as isoenzimas das PKCs além de mediar interações proteína-proteína, também sofre fosforilações sendo este um dos mecanismos responsáveis pela maturação e ativação das PKCs (adaptado de Nishizuka *et al.*, 1988).

Além da ligação das PKCs aos seus co-fatores, interações intramoleculares são importantes para a modulação da atividade das enzimas. Em 1991, Kemp e Pearson identificaram uma sequência denominada pseudossubstrato em diversas serina/ treonina quinases (Kemp & Pearson, 1991). Esta sequência é composta por aminoácidos semelhantes ao substrato, porém não possui os resíduos de aminoácidos, serina ou treonina, que seriam fosforilados pela quinase e sim uma alanina. Dessa maneira, o domínio pseudossubstrato é capaz de interagir com o sítio de ligação do substrato no domínio catalítico, porém como ele não é fosforilado, a ligação com o sítio catalítico não é desfeita da mesma forma que ocorre com o

substrato após sua fosforilação. O pseudossustrato desta forma é responsável por uma das interações intramoleculares que mantém as PKCs em sua conformação inativa. Além disso, o peptídeo pseudossustrato pode ser usado como um inibidor específico para as diferentes PKCs, visto que as diferentes classes possuem pseudossustratos distintos e conseqüente especificidades para os substratos conforme será discutido a seguir.

Apesar de serem muito semelhantes, cada PKC irá mediar uma função única. Em parte devido à especificidade por diferentes substratos, determinada pelo sítio catalítico e também pelos domínios regulatórios individuais de cada isoenzima, capazes de se ligarem especificamente aos diferentes substratos, e, fundamentalmente, pela localização sub-celular das diferentes isoenzimas das PKCs. A ativação de diferentes isoenzimas algumas vezes, pode induzir até mesmo funções opostas. Um dos exemplos é a ativação da PKC ϵ e da PKC δ , responsáveis por proteger cardiomiócitos da morte celular por isquemia e aumentar a morte celular no mesmo processo, respectivamente (Chen L. *et al.*, 2001). Outro exemplo que deve ser destacado ocorre entre as isoformas PKC ζ e a PKC λ , ambas pertencentes à família das aPKCs. Estudos indicam que a PKC ζ atua como um supressor de tumor e a sua perda de expressão ou inativação induz o processo de tumorigênese (Regala R.P. *et al.*, 2005), ao passo que, a PKC λ , altamente expressa em tecidos tumorais, quando inativada bloqueia a formação do tumor (Eder A.M. *et al.*, 2005).

1.4.1. Etapas da ativação das PKCs

As serina/treonina quinases estão presente dentro da célula na sua conformação inativa, onde o sítio catalítico está ligado à região do pseudossustrato (Kemp and Pearson 1991), como indicado na figura 4.

Uma variedade de hormônios (como adrenalina e angiotensina), fatores de crescimento (como insulina e EGF) e neurotransmissores (como a dopamina e a endorfina), são capazes de se ligar a receptores específicos e ativar os membros da família das fosfolipase C (PLC) (revisado por Mochly-Rosen *et al.*, 2012). A ativação da PLC resulta na hidrólise do fosfolípido de membrana fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP₂), formando DAG e inositol-1.4.5-trifosfato (IP₃), sendo este último responsável por ativar a liberação do íon cálcio do retículo endoplasmático para o citoplasma. Dessa maneira, um único evento, mediado pela ativação da PLC, é capaz de gerar dois segundos mensageiros (DAG e liberação do íon cálcio) importantes para a ativação das n e cPKCs (Steinber S.F., 2008; Gerald P & King G.L., 2010).

Modificações pós-traducional são importantes para a ativação das PKCs. A fosforilação mediada por PDK1 (*3-phosphoinositide Dependent Protein Kinase-1*) que ocorre em um motivo altamente conservado entre as diferentes isoenzimas da PKC, correspondente a sequência TFCGTX(E/D)YXAPE. A fosforilação deste domínio induz uma forma da PKC cataliticamente competente, esse mecanismo de regulação é um dos principais observados nas aPKCs, uma vez que essas enzimas são insensíveis ao cálcio e ao DAG. A proteína quinase PI3K (Standaert M.L., 1997; Campbell C.S. *et al.*, 2004) é responsável por converter PIP₂, (formado a partir da ação da PLC), em PIP₃. PIP₃ além de ser capaz de ativar diretamente as aPKCs (Standaert M.L. *et al.*, 2001), também fosforila a PDK1 (Miao B. *et al.*, 2010), que como citado anteriormente é um dos responsáveis por modular a atividade das PKCs.

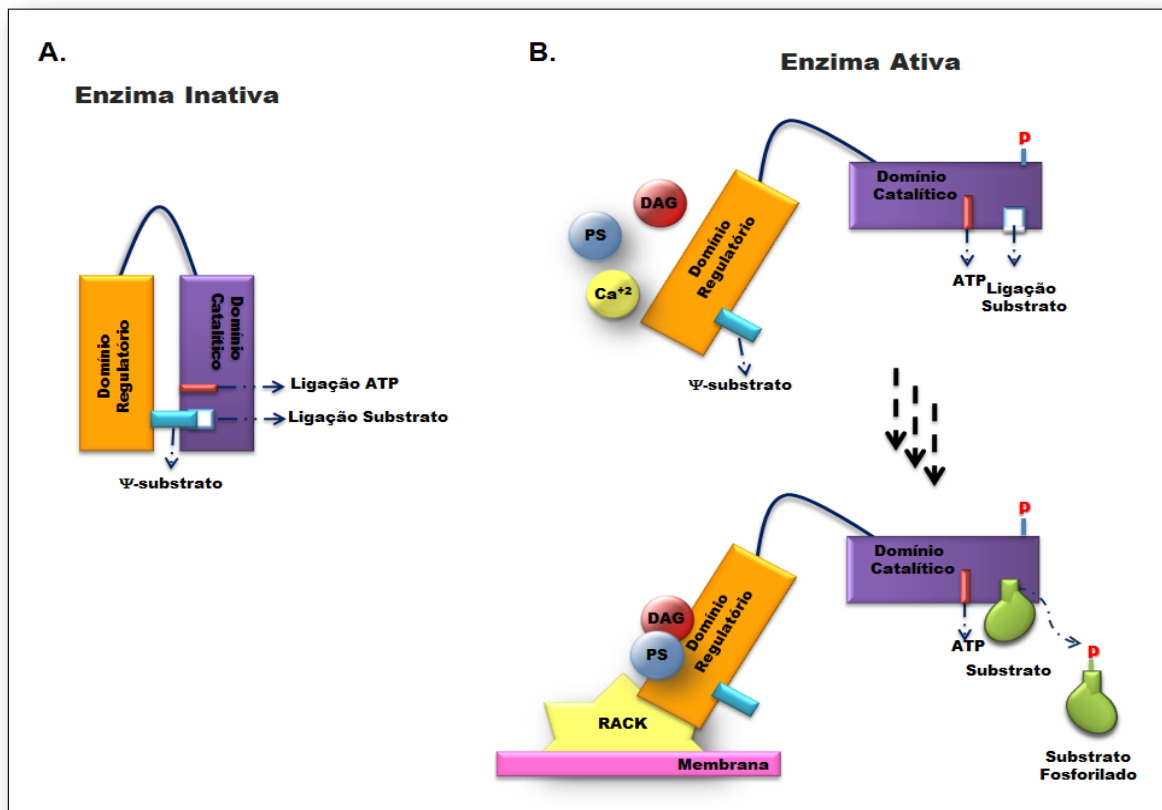


Figura 4: Diagrama das diferentes conformações das PKCs. A) A PKC inativa encontra-se em uma conformação mais fechada, isto é, ocorrem interações intra-moleculares como, por exemplo, do domínio pseudosubstrato com o sítio catalítico da quinase. B) Um dos mecanismos de ativação das PKCs é a fosforilação de resíduos específicos presentes nessas isoenzimas, e a ligação de Ca^{2+} , PS e DAG (no caso das cPKCs) ilustrado de maneira simplificada na figura. A PKC ativa sofre uma mudança conformacional expondo seu sítio catalítico. Esta mudança permite que a PKC transloque para a membrana celular onde passa a interagir com a membrana e com a sua proteína ancoradora [Rack (Receptores de Proteína Kinase C Ativada)] tornando-se capaz de fosforilar substratos específicos (Adaptado de Schechtman *et al.*, 2004).

A ativação da PKC gera mudanças conformacionais e interrupção de interações intra-moleculares que favorecem a exposição do domínio catalítico e de domínios responsáveis pela interação da PKC com proteínas adaptadoras (Schechtman & Mochly-Rosen, 2001) (Figura 4B). Esta ativação é acompanhada pela translocação da enzima do citoplasma para a membrana plasmática e membranas das organelas, ou seja, para a fração particulada da célula. (Newton, 1995). Cabe destacar que o sítio de ligação da RACK, presente nas PKCs, se torna

exposto após a ativação destas proteína quinases (Schechtman D. & Mochly-Rosen D., 2002).

Mochly-Rosen, em 1991, demonstrou que a localização subcelular das diferentes isoenzimas da PKC pode ser determinada pela ligação específica das isoenzimas aos seus "Receptores de Proteína Kinase C Ativada" (RACK) (Mochly-Rosen *et al.*, 1991; Schechtman D. & Mochly-Rosen D., 2001). Estas proteínas adaptadoras são capazes de interagir com diversas proteínas participantes do mesmo processo de transdução de sinal. As RACKs têm como função ancorar a PKC ativa a membranas celulares e coordenar cascatas de sinalização, aumentando a velocidade de reações de fosforilação, a especificidade das vias de sinalização (Schechtman, D. & Mochly-Rosen. D., 2001) bem como facilitando a interação das PKCs com seus substratos. Como exemplo, foi demonstrado que a RACK1 pode se ligar concomitantemente à PKC β II e a dinamina-1, levando a um aumento da fosforilação da dinamina-1 por esta isoenzima (Rodriguez *et al.*, 1999).

1.4.2. A especificidade dos substratos das PKCs

Apesar de serem estudadas há muitos anos, poucos substratos intracelulares das PKCs foram caracterizados. Os primeiros trabalhos que procuraram caracterizar as sequências consenso de fosforilação das PKCs se baseavam na observação da fosforilação de peptídeos criados a partir de bibliotecas randômicas (Pearson R.B. *et al.*, 1991; Nishikawa *et al.*, 1997). Estes trabalhos permitiram observar que a fosforilação dos resíduos de serina e treonina dos substratos apresentavam aminoácidos positivos adjacentes a sua cadeia peptídica (Nishikawa *et al.*, 1997). Posteriormente, utilizando dados de cristalografia e modelagem molecular do domínio catalítico da quinase determinou-se mais

precisamente o motivo consenso do sítio de fosforilação (Knighton D.R., *et al.*, 1991). Essas análises foram realizadas a partir da Proteína Quinase A (PKA) dependente de AMPc, cujo sítio ativo é muito semelhante ao da PKC (Plewczynski D. *et al.*, 2005). A sequência consenso, reconhecida pelas serina/ treonina quinases (PKA/C), é formada pelos resíduos de aminoácidos R/K R/K X S/T (Brinkworth *et al.*, 2003). Apesar da similaridade nessa sequência, entre PKA/C, ainda muitos estudos necessitam ser realizados para determinar as diferenças nas sequências peptídicas dos substratos que podem determinar a preferência por uma proteína quinase ou outra (Durek P. *et al.*, 2009; Pears S. *et al.*, 1991).

A identificação de sítios de fosforilação pode ser realizada através de predição *in silico*. O desenvolvimento dos algoritmos é feito utilizando um banco de dados composto por uma grande variedade de substratos já descritos. A partir dessas análises, uma assinatura é criada sendo possível prever novos sítios de fosforilação (Obenauer *et al.*, 2003; Brinkworth *et al.*, 2003). Cabe destacar que, apesar dessas ferramentas terem sido desenvolvidas com informações presente na estrutura terciária das proteínas quinases, estas não consideram a estrutura tridimensional do substrato (Brinkworth *et al.*, 2003) o que demonstramos nesta tese ser essencial para a determinação de um sítio consenso conformacional.

1.4.3. Estratégias para inibição seletiva das PKCs.

A alta conservação do domínio catalítico das PKCs dificulta a especificidade de inibidores convencionais a este sítio (Costa-Junior H.M. *et al.*, 2009). A estratégia encontrada para o desenvolvimento de moduladores específicos das diferentes isoformas das PKCs tem como o principal racional as diferenças nas sequências peptídicas variáveis entre as isoenzimas. Dentre essas regiões, se destacam os

domínios dos pseudossustratos e os domínios de interação com as proteínas ancoradoras RACK (Figura 5).

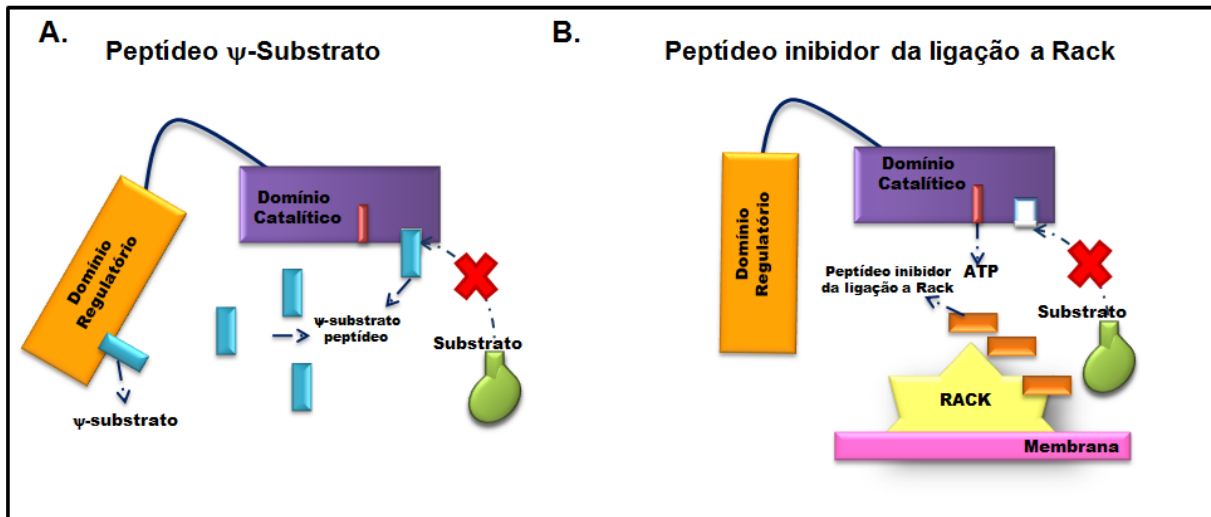


Figura 5: Mecanismos de inibição seletiva das PKCs. O desenvolvimento de peptídeos complementares ao domínio do pseudossustrato (A) e que bloqueiam a interação com a Rack (B) foram alternativas desenvolvidas para a inibição específica das diferentes isoenzimas das PKCs.

O peptídeo responsável pela inibição das aPKCs, por exemplo, foi desenvolvido a partir da seqüência do pseudossustrato desta enzima. Os peptídeos derivados dessa região inibem competitivamente a interação entre a enzima e o substrato (Laudana C. *et al.*, 1998; Kemp B.E. & Pearson R.B., 1991) (FIGURA 6A). Outra estratégia de inibição, está no bloqueio da ligação das PKCs com as suas RACK (Souroujon *et al.*, 1998) (Figura 6B). Como exemplo, o peptídeo inibidor da PKC β I, β I V5-3 foi desenvolvido a partir da determinação experimental que dois domínios das PKCs se ligam à RACK (C2/ V1 e V5), dessa maneira a utilização deste peptídeo bloqueia o ancoramento da PKC β I à sua RACK e conseqüentemente sua atividade (Stebbins & Mochly-Rosen, 2001). Na presente tese, a função das aPKCs e da PKC β I, em CTE indiferenciadas, foi caracterizada utilizando esses dois inibidores.

1.5. Proteína Quinase C e Célula Tronco Embrionária

Quinlan e colaboradores, em 2003, foram os primeiros a sinalizar a importância das PKCs na manutenção das características das CTE. Através da utilização de CTE murinas, este grupo descreveu o envolvimento da fosfolipase C e das PKCs na proliferação destas células (Quinlan L.R. *et al.*, 2003). Neste estudo, ativadores globais das PKCs foram capazes de induzir a proliferação das CTE (Quinlan L.R. *et al.*, 2003). Em adição, algumas vias responsáveis pela diferenciação e auto-renovação, como as mediadas por Sonic hedgehog e MAPK, envolvem a ativação das PKCs (Heo *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2006; Yun *et al.*, 2009). Apesar dessas evidências, mais estudos precisam ser desenvolvidos para o conhecimento sobre o papel específico das diferentes isoformas da PKC nas CTE.

Resultados preliminares obtidos pelo nosso grupo, em 2010, permitiram observar uma alta expressão das isoformas PKC α , β I, β II, δ e ζ/λ em célula tronco embrionária murina (Costa-Junior H.M. *et al.*, 2010). Além da alta expressão dessas isoenzimas, uma localização sub-celular distinta foi observada para cada isoenzima. Onde as PKC α , δ e ε encontram-se dispersas no citoplasma, enquanto que a PKC ζ/λ além da sua localização citoplasmática, também podem ser observadas no contato célula-célula. A PKC β II está localizada na região perinuclear e em regiões pontuais do núcleo próximas ao nucléolo. A PKC β I foi encontrada principalmente concentrada no núcleo (Costa-Junior H.M. *et al.*, 2010). Dessa maneira, esta diferença na distribuição sub-celular sugere funções específicas para cada isoenzima em CTE murina indiferenciada (Costa-Junior H.M. *et al.*, 2010).

Estudos anteriores descrevem o envolvimento das PKC ζ/λ na ativação da cascata da MAPK (Berra *et al.*, 1995), na ativação do fator de transcrição Nf κ B (Leitges *et al.*, 2001), na polarização celular, via PAR/ RhoA, e na indução da

translocação dos receptores de glicose (GLUT), dependente de insulina, para a membrana plasmática, (Standaert *et al.*, 1999). Em adição, a PKC λ , é uma das isoformas das aPKCs, essenciais para o desenvolvimento embrionário, uma vez que o *knockout* para a esta isoenzima foi letal após a primeira semana de desenvolvimento (Farese & Sajan, 2010). Dard e colaboradores, em 2009, observaram que a PKC λ foi capaz de estabilizar a polarização de proteínas e a morfologia celular, além de regular o processo de divisão assimétrica durante as etapas iniciais de formação do blastocisto (Dard N. *et al.*, 2009). Nas linhagens de célula tronco nulas para PKC λ , o transporte de glicose dependente de insulina foi drasticamente comprometido (Sajan M.P. *et al.*, 2006). Em outro trabalho, foi observado que a diferenciação das CTEs em cardiomiócito foram acompanhadas pela redução da expressão das isoformas PKC ζ e PKC β (Zhou *et al.*, 2003). Desta forma, as aPKCs parecem regular eventos de importância fundamental em diferentes vias de sinalização celular, bem como na auto-renovação das CTE. Mais estudos são necessários para avaliar o envolvimento específico das aPKCs nas CTE, portanto, a identificação e a caracterização de seus substratos foi um dos focos dessa tese

A PKC β I é outra isoforma da PKC importante nas vias de sinalização das CTE indiferenciadas, esta isoforma é a única expressa majoritariamente no núcleo de células tronco indiferenciada (Costa-Junior H.M. *et al.*, 2010). Costa-Junior e colaboradores avaliaram através de fosfoproteoma, que proteínas alvos desta isoenzima estão envolvidas na regulação transcripcional, no evento de *splicing* e no remodelamento de cromatina, importantes processos da divisão e diferenciação celular. Apesar da inibição da PKC β I não alterar a síntese de DNA em CTEs indiferenciada, foi observado uma alteração na sua localização sub-celular durante a

divisão celular e durante a diferenciação celular. Em CTE diferenciadas ocorre ou uma redução da expressão de PKC β I ou a expressão desta isoenzima no citoplasma. Estes resultados sugerem que a PKC β I pode participar ou do controle da diferenciação celular, ou da manutenção do estado indiferenciado ou de ambos os processos (Costa-Junior H.M. *et al.*, 2010).

No fosfoproteoma realizado por Costa-Junior e colaboradores também foi observado que além da redução da fosforilação de proteínas nucleares, houve redução da fosforilação de proteínas envolvidas na manutenção do citoesqueleto. Dentre os possíveis alvos da PKC β I destaca-se a α -tubulina. Esta proteína do citoesqueleto não tem a fosforilação como principal modificação pós-traducional determinante do controle da sua atividade. Entretanto, pouco se sabe sobre o intrigante mecanismo de controle da polimerização e despolimerização do microtúbulo e a relevância da fosforilação no processo de divisão celular (revisado por Fukushima N. *et al.*, 2009). Dessa maneira, os resultados gerados a partir das observações de Costa-Junior e colaboradores, abriram um leque de informações, onde a caracterização da α -tubulina como possível substrato direto da PKC β I foi também um dos alvos de estudo desta tese.

O estudo das vias de sinalização mediadas pelas PKCs em CTE torna-se importante para uma eficiente utilização clínica destas células. Para esse feito duas abordagens metodológicas podem ser utilizadas: (i) uma abordagem exploratória, utilizando moduladores específicos das PKCs para identificar alvos e determinar vias de sinalização moduladas pelas diferentes isoenzimas; (ii) caracterização dos alvos identificados como substratos diretos ou indiretos das diferentes isoenzimas das PKCs, bem como a determinação da importância da fosforilação de resíduos de

aminoácidos específicos como elementos sinalizador das cascatas ativadas pelas PKCs.

A presente tese procurou seguir esse racional metodológico, através de análise fosfoproteômica obtida a partir da modulação das aPKCs foi possível mapear as vias de sinalização moduladas por essa isoenzima em CTEs indiferenciadas. Ao passo que, o estudo aprofundado da relevância funcional da fosforilação de resíduos específicos mediados pelas PKCs foi desenvolvido através da investigação da importância da fosforilação da α -tubulina, como possível substrato da PKC β I.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

O trabalho desenvolvido nessa tese apresentou dois objetivos gerais, descritos a seguir:

Objetivo 1: Elucidação funcional das aPKCs em células tronco indiferenciada, através da identificação e caracterização dos alvos destas isoenzimas.

1.1) Inibir as aPKCs utilizando um peptídeo modulador específico para estas isoenzimas, a fim de identificar novos alvos por análise fosfoproteômica.

1.2) Determinar a relevância funcional das aPKCs no modelo de CTE indiferenciada, caracterizando os alvos identificados.

Objetivo 2: Estudo da fosforilação de α -tubulina pela PKC β I e a sua importância funcional.

2.1) Caracterizar a α -tubulina como substrato direto da PKC β I.

2.2) Determinar a importância funcional do sítio fosforilado pela PKC β I na α -tubulina.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Peptídeos

A inibição das diferentes isoenzimas das PKCs [PKC β I e aPKCs (PKC ζ e PKC λ)], foi realizada a partir da utilização de peptídeos moduladores específicos (Costa-Junior H.M. *et al.*, 2009).

O peptídeo inibidor da PKC β I denominado β IV5-3, formado pela sequência, KLFIMN (Stebbiens E.G. & Mochely-Risen D., 2001), ligado covalentemente por uma ponte dissulfeto (Chen L. *et al.*, 2001), ao peptídeo carreador Tat₄₇₋₅₇, aminoácidos (₄₇YGRKKRRQRR₅₇), da proteína *Transactivator of transcription* do HIV (Deshayes S. *et al.*, 2005) foi doado pela empresa KAI Pharmaceuticals® (Califórnia, EUA).

O peptídeo inibidor das aPKCs, pseudossustrato das aPKCs (₁₁₃SIYRRGARRWRKLYRAN₁₂₅) (Laudana C. *et al.*, 1998; Kemp B.E. & Pearson R.B., 1991), denominado de aPKC- ψ S, foi sintetizado em fusão com o peptídeo carreador Tat₄₇₋₅₇ através de um *linker* de GSG (YGRKKRRQRRGSGSIYRRGARRWRKLYRAN) pela empresa Proteimax (São Paulo, Brasil).

3.2. Cultura de células

A linhagem celular de CTE murina, E14TG2A, foi cedida pelo Dr. Joshua Brickman (Center of Development in Stem Cell Biology, Institute for Stem Cell Research, School of Biological Sciences - University of Edinburgh). Essa linhagem celular tem a vantagem de se manter indiferenciada na ausência de fibroblastos embrionários murinos inativados (células *feeder*). A cultura celular de E14TG2A indiferenciada foi mantida em meio Glasgow Modificado por Eagle (GMEM; Sigma-Aldrich, MO, EUA), suplementado com LIF (10³ U/mL; ESGRO-LIF; Life

Technologies Co., CA, EUA), soro fetal bovino (15% v/v; SFB, Hy-clone, Logan, UT, EUA), β -mercaptoetanol (0.1 mM), aminoácidos não essenciais (1% v/v; Life Technologies Co., CA, EUA), L-glutamina (2 mM; Life Technologies Co., CA, EUA), penicilina (50 U/mL; cat.15140 Life Technologies Co.) e estreptomicina (50 μ g/mL; cat.15140 Life Technologies Co.) (Morrison G.M. & Brickman J.M., 2006). As garrafas de cultura utilizadas para o cultivo das CTE foram previamente gelatinizadas com gelatina de porco (0.2% m/v, cat.S2500, Sigma-Aldrich). Nessas condições de cultivo os marcadores de indiferenciação como Oct4, Nanog, SSEA eram expressos em aproximadamente 80% das células (Costa-Junior H.M. *et al.*, 2010).

A linhagem celular HEK293T foi gentilmente cedida pela Dra. Nadja Cristhina de Souza Pinto Lardner (Laboratório de Genética Mitocondrial, Instituto de Química - Universidade de São Paulo). Essa linhagem foi cultivada em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Sigma-Aldrich, MO, EUA), suplementado com SFB (15% v/v; Hy-clone, Logan, UT, USA), bicarbonato de sódio (44 mM), penicilina (50 U/mL, Life Technologies Co.), estreptomicina (50 μ g/mL, Life Technologies Co.), em uma atmosfera umidificada com 5% de CO₂ a 37°C.

O sub-cultivo das duas linhagens foram feitos a cada dois dias, ou quando as células atingissem 80 - 90% de confluência.

3.3. Identificação de alvos diretos e indiretos das aPKCs por fosfoproteoma

3.3.1. Preparação de lisados para géis bidimensionais

Para identificar substratos diretos e indiretos das aPKCs, nas CTE indiferenciada E14TG2A, foi realizado estudos de fosfoproteômica. As células foram tratadas com 500 nM do peptídeo aPKC- ψ S ou com o peptídeo carreador controle Tat₄₇₋₅₇, por 15 minutos a 37°C.

Após o tratamento das CTE, estas foram lavadas duas vezes com tampão fosfato (PBS) a 4°C e lisadas com 400 μ l de tampão DyeStreak (Ge-Healthcare, Buckinghamshire, UK) contendo [urea (7 M); tiourea (2 M); CHAPS (4% m/v); ditioneitol (DTT; 40 mM), inibidores de proteases (1:300; Sigma-Aldrich # P8340) e de fosfatases (1:100; Phosphostop Inhibitor cocktail tablets, # no04906845001; Roche, Basel, Suíça)]. A lise celular mecânica foi realizada através do uso de *rubber policeman* também a 4°C, seguida da passagem do lisado dez vezes por uma seringa de insulina (31G - Becton Dickinson & Company, Nova Jersey, EUA). O lisado foi sonificado (Branson Sonifier 250, CO, EUA), em banho de gelo a 40 Htz, por cinco minutos. A concentração protéica foi determinada pelo método colorimétrico de Bradford (BioRad, CA, EUA) e confirmada por análise em gel de eletroforese poli-acrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) corado com Coomassie Coloidal G250 (Costa-Junior H.M. *et al.*, 2010). As amostras foram aliqüotadas e congeladas a -80°C. Quatro experimentos independentes com cada tratamento foram realizados.

3.3.2. Eletroforese Bidimensional

Os lisados protéicos preparados, como descrito acima, na concentração de 500 μ g, foram carregados em fitas de 14 cm de comprimento com um intervalo de pH 4-7 (Ge Healthcare) por hidratação, durante 18 horas a temperatura ambiente.

Para a validação dos dados do proteoma por eletroforese bidimensional seguida do *immunoblotting*, foram utilizadas fitas de 7 cm com o mesmo intervalo de pH (Ge Healthcare).

A eletroforese bidimensional foi realizada com o sistema IPG4 (GE Healthcare). A primeira dimensão, separação por ponto isoelétrico, denominada focalização isoelétrica (IEF) foi dividida em quatro etapas: (i) 500 volts por 500 volts/h; (ii) 1000 volts por 800 volts/h; (iii) 8000 volts por 11300 volts/h; (iv) 8000 volts por 10000 volts/h. O total de volts acumulados foi de 39600 volts/h. Ao final do eletrofocamento, as fitas foram reduzidas e alquiladas, durante 20 minutos a temperatura ambiente, com solução de equilíbrio [urea (6 M), Tris-HCl (75 mM, pH 8.8); glicerol (30% v/v); SDS (2% m/v); azul de bromofenol (0.002 % m/v)] contendo DTT (10 mg/ml) ou iodocetamida (2.5 mg/ml), respectivamente. Em seguida, as fitas foram transferidas para a segunda dimensão de separação, que consistiu na separação por peso molecular por SDS-PAGE (Ausubal F.M. *et al.*, 1994).

3.3.3. Detecção das proteínas

3.3.3.1. Detecção de fosfoproteínas

A detecção de proteína fosforiladas nos géis bidimensionais foi feita utilizando-se um corante fosfo-específico, Pro-Q Diamond (Life Technologies Co.). Para esta coloração, os géis bidimensionais foram fixados com solução contendo metanol (50% v/v) e ácido acético (10% v/v), por 16 horas a temperatura ambiente. Os géis foram, então, lavados três vezes com H₂O deionizada por 30 minutos e corados com o Pro-Q Diamond® (Life Technologies Co.) por 120 minutos. A solução descorante contendo acetato de sódio (50 mM; pH 4) e acetonitrila (20% v/v) foi adicionada aos géis, durante três ciclos de lavagens de 30 minutos, cada, seguido

da adição de H₂O deionizada. Os géis foram digitalizados no aparelho Typhoon 9400 (GE Healthcare) com excitação/emissão de aproximadamente 555/580 nm (Marondedze C. *et al.*, 2013).

3.3.3.2. Detecção de proteínas totais

Após a coloração com Pro-Q Diamond, os géis foram corados com, Coomassie Coloidal G-250 (Sigma-Aldrich) para a detecção de proteínas totais. Para tanto, os géis foram incubados com uma solução contendo Coomassie Coloidal G-250 (0,1% m/v); ácido orto-fosfórico (2% m/v) e sulfato de amônio (10% m/v), por 12 horas. Em seguida, os géis foram descorados com uma solução contendo ácido acético (5% v/v) por 60 minutos (Marondedze C. *et al.*, 2013). Os géis foram digitalizados e analisados conforme descrito abaixo.

3.3.4. Análise dos géis

As imagens adquiridas foram analisadas utilizando o programa ImageMaster 2-D Platinum 5.0 (GE Healthcare), no qual foram avaliados os parâmetros a seguir: (i) o número total de *spots*; (ii) a similaridade entre os géis pareados e (iii) a diferença da porcentagem de volume, entre cada condição de tratamento. Cabe destacar que, este último parâmetro corresponde ao valor referente à normalização da saliência pela área do *spot* e a representatividade do mesmo no gel como um todo, isto é, pelo total de proteínas coradas (fosforiladas). *Spots* comuns a todas as condições foram considerados como marcadores para a realização de um pareamento eficiente e posterior análise dos mesmos. Assim, a partir das imagens obtidas após coloração com ProQDiamond®, foram selecionados *spots* que apresentava redução da fosforilação de pelo menos 1,5 vezes em relação ao

controle e/ou *spots* que apresentavam uma alteração com valor de $p < 0,05$ pelo teste estatístico de ANOVA.

Para certificar de que a concentração proteica de cada amostra era similar, uma análise global da expressão proteica dos géis corados com Coomassie Coloidal G-250 foi realizada.

3.3.5. Secção das proteínas do gel e identificação por espectrometria de massa

Os *spots* de interesse foram seccionados do gel a partir do mapa gerado pelo programa Image Master 2-D Platinum 5.0 (GE Healthcare) utilizado nas análises.

Antes da digestão das proteínas presentes nos *spots*, estes foram descorados, por uma solução contendo metanol (50% v/v) e ácido acético (2,5% v/v). Os *spots* foram, então, desidratados com acetonitrila (100%) e as proteínas, presentes no gel, foram reduzidas e alquiladas com uma solução contendo DTT (10 mM) e iodoacetamida (50 mM), respectivamente, a temperatura ambiente, por 30 minutos, cada. Após remoção da solução contendo iodoacetamida foi adicionado ao gel bicarbonato de amônio (100 mM) por dez minutos. Os *spots* foram desidratados com acetonitrila (100%), incubados por cinco minutos a temperatura ambiente e rehidratados com bicarbonato de amônio (100 mM) por dez minutos. Ciclos de desidratação e rehidratação foram repetidos duas vezes. Cerca de 30 a 50 μl de solução contendo tripsina (20 ng/ μl , Promega, WI, EUA) em bicarbonato de amônio (50 mM) foi adicionada por *spot* e os mesmos foram mantidos por 30 minutos em banho de gelo. O excesso desta solução foi removido e bicarbonato de amônio (50 mM), foi adicionado até a total imersão do *spot*.

Os *spots* foram incubados por 16 horas a 37°C. A atividade da tripsina foi interrompida com uma solução de extração contendo ácido fórmico (5% v/v), por 10 minutos. O sobrenadante foi recolhido e incubado com segunda solução de extração contendo ácido fórmico (5% v/v) e acetonitrila (50% v/v), por dez minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi recolhido e os peptídeos eluídos foram concentrados em evaporador por aproximadamente 40 minutos a temperatura ambiente.

Após a secagem das amostras, os peptídeos foram ressuspensos em solução de ácido fórmico (1% v/v) e submetidos para análise por espectrometria de massas ESI-Q-TOF acoplado ao sistema nanoAcquity® (Waters Co. MA, EUA). Esta etapa do procedimento foi realizada utilizando o serviço de Espectrometria de Massas do Laboratório Nacional de Biociências (LnBio), Campinas, SP, Brasil.

3.3.6. Identificação das proteínas e sua caracterização funcional

Os espectros de massas gerados foram analisados pelo software Mascot Daemon 2.3 (Matrix Science USA, analisado em junho de 2009). Foram consideradas como identificadas, somente as proteínas que apresentaram uma cobertura de no mínimo quatro sequencias peptídicas com uma pontuação total (*score*) superior a 70 definido pelo programa Mascot Daemon. O banco de dados utilizado para alinhamento e identificação das proteínas foi o banco de dados do Swiss Prot (Boeckmann B. *et al*, 2005). O peso molecular e o ponto isoelétrico, teórico e experimental também foram obtidos a partir dessa análise.

O perfil funcional das proteínas identificadas pelo fosfoproteoma e a sua localização subcelular foi realizada a partir da análise, em fevereiro de 2013, dos

bancos de dados GeneOntology (Martin D. *et al.* 2004; <http://www.geneontology.org>) e Kegg (Kanehisa M & Goto S.; 2000; <http://www.genome.jp/kegg/>).

3.4. Validação de Alvos das aPKCs

As CTE, E14TG2A ao atingirem 70-80% confluência foram tratadas com peptídeo aPKC- ψ S ou com peptídeo carreador Tat₄₇₋₅₇, por 15 minutos a 37°C. As células foram lisadas, quantificadas, eletrofocalizadas, rehidratadas e resolvidas em gel de SDS-Page conforme descrito na seção 3.3. acima.

Após a eletroforese bidimensional os géis foram transferidos para membrana de nitrocelulose e incubadas com anticorpo específico anti-PKM2 (1:500, cat. sc-65176; Santa Cruz Biotechnology Inc., TX, EUA), seguindo o protocolo de *immunoblotting* descrito a seguir. As proteínas foram analisadas quanto os deslocamento do seu ponto isoeletrico, indicando a redução da fosforilação mediante o tratamento com o peptídeo aPKC- ψ S.

3.5. Predição de interações entre alvos das aPKCs

O programa STRING foi utilizado para predizer e reconhecer as interações de proteínas identificadas a partir do fosfoproteoma (Emily M. *et al.*, 2009). Através do *website* <http://string-db.org/> foi possível avaliar a interação entre algumas proteínas do citoesqueleto e as aPKCs. A partir da análise foram geradas linhas tracejadas e linhas contínuas conectando as proteínas, elas representam substratos hipotéticos e interações já confirmadas experimentalmente em humanos na literatura, respectivamente.

3.6. Avaliação da atividade enzimática da Lactato Desidrogenase e Piruvato Quinase

As CTE E14TG2A, indiferenciada, foram plaqueadas na concentração de 3×10^6 . Após 24 horas, as células foram tratadas com 500 nM de peptídeo aPKC- ψ S ou do peptídeo carreador controle Tat₄₇₋₅₇, nos intervalos de tempo de 30 minutos, uma hora, quatro horas e oito horas. O meio foi removido e as células foram contadas, 10^6 células para cada experimento, as quais foram lisadas na presença dos tampões específicos para cada ensaio enzimático.

A avaliação da atividade da lactato desidrogenase, da piruvato quinase e da isocitrato desidrogenase foram realizadas seguindo as instruções dos fabricantes (Cayman, Brasil & Abcam, USA, respectivamente).

3.7. Análise do perfil metabólico

3.7.1. Consumo de glicose e produção de lactato

As CTEs E14TG2A, indiferenciada, foram semeada em placas de 6 poços na concentração de $3,5 \times 10^5$ células/poço. Após 24 horas, as células foram tratadas com 500 nM dos peptídeos aPKC- ψ S ou Tat₄₇₋₅₇, nos intervalos de tempo de trinta minutos, uma hora, quatro horas e oito horas. Após o tratamento, o meio foi removido e centrifugado a 2.000 g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C até a análise no equipamento Bioprofile Basic 4 (Derfus G.E. *et al.*, 2010; NovaBiomedical, MA, EUA), em colaboração com o Laboratório Nacional de Biociências (LnBio, Campinas). As células de cada poço foram contadas e a concentração de glicose e lactato foram normalizadas a partir destes valores. Este ensaio foi realizado em três momentos diferentes e para cada análise foram utilizadas triplicatas experimentais.

3.7.2. Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN-H)

A técnica de RMN-H foi utilizada como o estratégia de estudo para observar alteração de compostos da via metabólica produzidos após a inibição das aPKCs (Beale M.H. *et al.*, 2009). A pesquisadora Dra. Ana Carolina Zeri (Laboratório Nacional de Biociências, Laboratório Nacional de Luz Síncroton em Campinas) foi nossa colaboradora para a realização desta etapa da tese. As CTEs E14TG2A, indiferenciada, foram semeada em garrafas de T25cm² na concentração de 1.0 x 10⁶ células. Após 16 horas, as células foram tratadas com 500 nM dos peptídeos aPKC- ψ S ou Tat₄₇₋₅₇, nos intervalos de tempo de uma hora, quatro horas e oito horas

O meio foi removido em cada um dos intervalos do tratamento e após centrifugação a 1000 x g por cinco minutos a 4°C, o sobrenadante foi coletado e filtrado em filtros de exclusão de massa molecular (3kDa, Centricon – Millipore) previamente centrifugados com pelo menos dois volumes de água para retirada do glicerol presente no filtro. Estas amostras foram liofilizadas e ressuspendidas em tampão fosfato (50 mM pH 7.5); Imidazol (10 mM); Azida Sódica (3 mM) e DSS (4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonic acid; 0.5 mM). As amostras foram processadas em um aparelho de RMN-H de 500 MHz e 600 MHz. Os espectros foram analisados pelo software Chenomx NMR Suite 7.1, a fim de identificar os metabólitos que apresentam variação de concentração após a inibição das PKCs atípicas. Sextuplicata experimental foram realizadas para a análise dessa metodologia.

3.7.3. Consumo de oxigênio

O consumo de oxigênio foi medido utilizando o equipamento Seahorse (Seahorse Bioscience), seguindo as instruções do fabricante (Choi S.W. *et al.*, 2009), em colaboração com a Dra Alícia Juliana Kowaltowski, do laboratório de

Bioenergética Mitocondrial do Instituto de Química (Universidade de São Paulo, SP, Brasil). Os ensaios foram realizados na presença de monocamada de células aderidas no modelo de placa V7 PS Cell Culture Microplates (Seahorse Bioscience, Noble Park, Austrália) e a hidratação do sensor cartridge (Seahorse Bioscience) foi realizada com tampão XF Calibration Solution (Seahorse Bioscience) por 18 horas a 37°C.

As CTE E14TG2A, indiferenciada, foram semeadas na concentração de 10^5 células/poço após exatamente 18 horas, o meio foi removido, os poços foram lavados uma vez com PBS e as células foram incubadas por uma hora em estufa sem CO₂ a 37°C, em meio DMEM High Glucose (Sigma-Aldrich), SFB (15%v/v), sem adição de bicarbonato de sódio. Leituras basais, por aproximadamente 20 minutos, foram feitas e as células foram tratadas, por injeção automática, com os peptídeos aPKC- ψ S ou Tat₄₇₋₅₇, na concentração final de 500 nM. Após o intervalo de aproximadamente três horas de tratamento foi adicionado 1 μ M de oligomicina, durante aproximadamente uma hora, em seguida FCCP na concentração final de 500 nM foi adicionado. Por fim, antimicina A, na concentração de 1 μ M foi adicionado (Fornazari M. *et al.*, 2011). O consumo de oxigênio foi observado a cada nove minutos durante todo o experimento.

3.7.4. Ensaio de fosforilação *in vitro*

O ensaio de fosforilação *in vitro* foi realizado em dois momentos durante o desenvolvimento desta tese. No primeiro momento, em colaboração com a Dra Daria Mochly-Rosen do *Department of Chemical and Systems Biology*, (Stanford University School of Medicine, CA, EUA), onde a α -tubulina, identificada como possível substrato da PKC β I, foi fosforilada utilizando a proteína recombinante GST- α -

tubulina (H00007278-P01 Abnova Co. CA, EUA) e GST-PKC β I (Cell Signaling Technology, MA, EUA). A concentração de substrato e PKC foi utilizada na proporção 2:1, o tampão utilizado foi Tris-HCl (20 mM, pH 7.5), MgCl₂ (20 mM) e ATP (20 mM), [³²]ATP (5 μ Cu), CaCl₂ (2 mM) contendo 1.2 mg/ml de PS e 0.04 mg/ml de DAG (Schechtman D. *et al.*, 2004). Após a reação de fosforilação as amostras foram corridas em gel SDS-PAGE 8%. Os géis foram secados e expostos para a realização da autoradiografia.

No segundo momento, foram avaliados os substratos identificados no fosfoproteoma com modulador específico das aPKCs. As enzimas Piruvato Quinase (Sigma-Aldrich) e Lactato Desidrogenase (Sigma-Aldrich), nas concentrações de 1000 ng, respectivamente, foram adicionadas ao tampão contendo Tris-HCl (20 mM, pH 7.5), MgCl₂ (20 mM) e ATP (20 mM), além das enzima PKC λ ou PKC ζ (100 ng, Invitrogen®) (Schechtman D. *et al.*, 2004), ceramida C6 (50 nM; Avanti Polar Lipids, Alabana, EUA) foi utilizada como ativador . Após reação de fosforilação *in vitro*, foi adicionado as amostras 5 μ l de tampão *Laemmli* [Tris-HCl (60 mM, pH 6.8), SDS (2% m/v); glicerol (10% v/v), β -mercaptoetanol (5% v/v), azul de bromofenol (0.001% m/v)], seguido do aquecimento das amostras por dez minutos a 100°C e aplicação no gel SDS-PAGE. O gel foi fixado, corado com corante fosfoespecífico ProQ Diamond® (Life Technologies Co.) e escaneado como descrito anteriormente. A concentração de proteína total foi observada após coloração com Coomassie Coloidal. A intensidade de fosforilação foi quantificada utilizando o programa ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>), a normalização dos dados foi feita a partir da intensidade de proteína total. Análise estatística (teste t) foi realizada comparando as amostras fosforiladas ou não pelas aPKCs, utilizando o programa GraphPad Prism.

3.8. Identificação dos resíduos de α -tubulina fosforilados

A tubulina bovina purificada (T1238, Cytoskeleton Inc., CO, EUA) foi fosforilada *in vitro*, como descrita anteriormente, e a identificação do sítio de fosforilação foi realizada em colaboração com Dra Daria Mochly-Rosen no Mass Spectrometry Laboratory (Stanford University School of Medicine, CA, EUA). A proteína fosforilada foi precipitada com quatro vezes o volume de acetona a -80°C . O pellet de proteína foi reconstituído com 15 μl de urea (8 M; pH 7.8) e 20 μl de Protease Max (0.2% v/v; Promega) como descrito pelo fabricante. As amostras foram solubilizadas por agitação e sonicação a temperatura ambiente. O material solubilizado foi reduzido e alquilado como descrito anteriormente. A digestão foi realizada durante 16 horas a 37°C com tripsina (100 ng, Promega). As amostras foram acidificadas com ácido fórmico (1%).

A identificação do resíduo de aminoácido de α -tubulina fosforilado foi feita utilizando espectrometro de massa LTQ Orbitrap VelosData (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA), os arquivos gerados em RAW foram convertidos para formato mzXML e localizados no sistema de processamento SORCERER™ (SageN Research, CA, EUA).

3.9. Alinhamento de sequência, dinâmica molecular e cálculo de energia de ligação dos polímeros de tubulina

Esta etapa da tese foi realizada em colaboração com o Dr Paulo Sérgio Lopes de Oliveira do LnBio. O alinhamento das sequências de α e β -tubulina foram realizadas seguindo os parâmetros definidos pelo programa Clustalx (Conway Institute, Dublin, Irlanda). A construção do polímero de tubulina foi criada a partir do modelo estrutural do heterodímero α e β -tubulina depositada no *Protein Data Bank* (PDB Id # 1JFF, <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) (Löwe J. *et al.*, 2001). As

quatro unidades do polímero foram obtidas duplicando e sobrepondo a estrutura cristalográfica do heterodímero seguida por uma adição de um outro dímero ao longo do eixo anteriormente fixado. O segundo polímero contendo a treonina fosforilada na posição 253 de α -tubulina foi gerado. Ambas as estruturas foram submetidas a minimização de energia e simulação de dinâmica molecular usando o programa YASARA (<http://www.yasara.org/index.html>). Todos os átomos de hidrogênio e outros átomos não presentes na estrutura foram criados usando parâmetros de campo de força obtidos por AMBER99 (Wang J. *et al.*, 2000). A protonação foi realizada tendo como referência o pH 7.0. O limite de simulação foi definido por 15 Å em torno de todos os átomos de cada complexo macromolecular. Inicialmente, uma simulação de dinâmica molecular foi realizada pelo ajuste de solvente e moléculas de água que foi em seguida removida até obter um modelo com densidade da água de 0.997 mg/ml. Em seguida, um novo passo de simulação foi realizado a fim de minimizar a energia até que a velocidade máxima do átomo fosse reduzida até 2200 m/s. 500 etapas de simulação de anelamento foram realizadas com temperatura de 0 K. Finalmente, uma simulação de quatro nanosegundo a 298 K, com um corte de 7.86 Å de heterodímeros de tubulina não ligada foi realizada e imagens a cada 7.5 picosegundos foram salvas. Foram moduladas 150 conformações e a energia potencial calculada para todo o polímero e para cada heterodímero. O cálculo da energia de ligação utilizando o programa YASARA foi realizado a partir da subtração da energia do polímero pela soma dos dímeros isolados de cada conformação. A significância estatística da distribuição de energia foi avaliada por teste t.

3.10. *Imunoblotting*

Aproximadamente 150 µg do lisado proteico foi resolvida por SDS-PAGE, a preparação das amostras foi realizada como descrita na secção 3.3.2. Em seguida, as proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de nitro-celulose (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, EUA), com o auxílio de um aparato de transferência (Bio-Rad Laboratories, Inc.) a 100 W por duas horas em temperatura ambiente, de acordo com o método de Towbin (Towbin H. *et al.* 1979).

A membrana de nitrocelulose, contendo as proteínas, foi bloqueada com tampão de bloqueio TBS-T [leite desnatado (5%); Tris-HCl (20 mM), Tween20 (0.05% v/v, pH7.4)] por 2 horas a temperatura ambiente. Após o bloqueio, a membrana foi incubada com o anticorpo primário, por 1 hora a temperatura ambiente ou alternativamente por 16 horas à 4°C, sob agitação constante. Foram utilizados anticorpos anti- α -tubulina (1:2000, cat. T5168; Sigma-Aldrich), anti-GFP (1:1000; gentilmente cedido pelo Dr. Frederico José Gueiros Filho do Laboratório Divisão Celular Bacteriana, Instituto de Química - Universidade de São Paulo), anti-PKM2 (1:500, cat. sc-65176; Santa Cruz Biotechnology), diluídos em tampão de bloqueio TBS-T por uma hora. Ao término da incubação, a membrana foi lavada três vezes com TBS-T, por 30 minutos à temperatura ambiente. As membranas foram subsequentemente incubadas por uma hora com anticorpo secundário específico conjugados à peroxidase (1:1000; Ge-Healthcare) seguindo as recomendações do fabricante. A membrana foi lavada novamente, como descrito acima, e a revelação realizada por quimioluminescência de acordo com as instruções do fabricante (Enhancer Chemi-Luminescence, Ge-Healthcare). Para a análise quantitativa, as auto-radiografias foram escaneadas e quantificadas utilizando-se o software Image J

(<http://rsbweb.nih.gov/download.html>). A significância estatística foi determinada utilizando-se o teste T (GraphPad Software, Inc).

3.11. Plasmídeos e mutação sítio-dirigida da α -tubulina

A α -tubulina humana derivada do vetor pTagBFP-tubulina (Evrogen, Mo, Rússia gentilmente cedida pelo Dr. Jorg Kobarg, Laboratório Nacional da Luz Síncrotron, LNBio, Campinas, Brasil) foi subclonada no N-terminal ao vetor de expressão de mamíferos pEGFP-C1 (Clontech Laboratories, Inc., CA, EUA) entre os sítios de restrição enzimática Xho I e Bam HI. As mutações sítio dirigidas dos mutantes T253E e T253A foram realizadas com o kit *QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit* (Agilent Technologies - USA) conforme instruções do fabricante. Os oligonucleotídeos utilizados estão descritos na tabela 1 a seguir. As mutações foram confirmadas por sequenciamento (IQ-USP) das regiões mutadas.

Tabela 1: Sequência dos oligonucleotídeos utilizados para a realização das mutações sítio dirigidas em α -tubulina

Mutante	Orientação	Sequência
T253E	<i>Forward</i>	TGAATGTTGACCTGGAAGAATTCCAGACCAAC
T253E	<i>Reverse</i>	GTTGGTCTGGAATTCTTCCAGGTCAACATTCA
T253A	<i>Forward</i>	TGAATGTTGACCTGGCAGAATTCCAGACCAAC
T253A	<i>Reverse</i>	GTTGGTCTGGAATTCTGCCAGGTCAACATTCA

3.12. Transfecção da linhagem celular HEK 393T com α -tubulina

A LipofectaminaTM 200 (Invitrogen), 15 μ l, foi diluída em 500 μ l de DMEM contendo 25 mM de glicose (DMEM High Glucose – Invitrogen/USA; Hashemi A. *et al.*, 2012) sem soro e incubada por dez minutos a temperatura ambiente. Após esta

incubação 5 μg de DNA foi adicionado a esta solução que foi incubada a temperatura ambiente por mais dez minutos. Em seguida, 10^6 células, previamente lavadas com PBS, foram incubadas com a solução contendo LipofectaminaTM e DNA por cinco minutos adicionais a temperatura ambiente. As células foram ressuspensas em 5 ml de DMEM (Sigma-Aldrich), suplementado com SFB (15% v/v; Hy-clone-Invitrogen/USA) e bicarbonato de sódio (44 mM).

As células transfectadas foram mantidas a 37°C em atmosfera com 5% CO₂, por 48 horas, para a realização subsequente dos experimentos descritos. A intensidade de transfecção foi monitorada por microscopia de fluorescência e por imunoblotting, utilizando anticorpo anti- α -tubulina e anti GFP.

3.13. Fracionamento celular

O fracionamento celular para separar tubulina solúvel e insolúvel (Tagawa H. *et al.*, 1996; Tashiro T. *et al.*, 1989) foi realizado como descrito por Schechtman D. e colaboradores, (2003). As linhagens celulares HEK293T transfectadas, como descrita anteriormente, foram lisadas com tampão de homogenização [Tris-HCl (20 mM; pH 7.5); EDTA (2 mM); EGTA (10 mM); sucrose (0.25 M); coquetel inibidores de protease (1:300, Sigma # P8340) e coquetel inibidores de fosfatase (1:100 Cat n° 04906845001, Roche). Após ultracentrifugação a 100.000 Xg por 40 minutos a 4°C, o sobrenadante foi removido (fração solúvel) e o precipitado ressuspenso em tampão de DE [Tris-HCl (20 mM; pH 7.5; EDTA (1 mM), EGTA (1 mM); β -mercaptoetanol (12 mM), glicerol (10% v/v), Triton-X 100 (1% v/v) e inibidores de protease e fosfatase, na mesma concentração descrita anteriormente].

O homogenato (fração insolúvel) foi sonicado por dez minutos na amplitude de 60 (Branson Sonifier # S-450A). A concentração de proteína foi determinada por

Bradford (Bio-Rad Laboratories, Inc.) e o *imunoblotting* das duas frações foi realizado como descrito anteriormente.

A taxa de despolimerização foi observada pela razão de tubulina insolúvel após o tratamento com nocodazol pelo controle (sem tratamento). Este tipo de análise foi realizado tanto na linhagem E14TG2A tratada com o peptídeo inibidor da PKC β I, quanto na linhagem HEK293T transfectada com os diferentes mutantes de α -tubulina-GFP (descritos acima). Neste último caso, após a extração e fracionamento celular, a análise foi realizada a partir dos dados obtidos pelo *imunoblotting* utilizando anticorpo específico anti-GFP. O teste t foi o ensaio estatístico escolhido para comparar a relevância significativa de cada condição de tratamento. A intensidade das bandas foi analisada por densitometria usando o Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

3.14. Imunoprecipitação

A α -tubulina foi imunoprecipitada das CTE, E14TG2A, a partir da fração insolúvel descrita anteriormente. Esta fração foi diluída dez vezes em Tris-HCl (20 mM; pH 7.5), coquetel inibidores de proteases (1:300, # P8340 Sigma-Aldrich) e coquetel inibidores de fosfatases (1:100 Cat n° 04906845001, Roche).

A α -tubulina-GFP foi imunoprecipitada a partir de extrato celular de HEK293T transfectada com os diferentes mutantes da α -tubulina (Selvagem, α -tubulina-GFP-T253A e α -tubulina-GFP-T253E). O lisado de HEK293T foi congelado (-80°C) e descongelado quatro vezes e posteriormente foi passado por uma seringa vinte vezes e sonificado por dez minutos na amplitude de 60, como descrito anteriormente.

O *pré-clearing*, para estes dois tipos de extratos, foi feito incubando-se as amostras com 20 μ l de *beads* de proteína G-agarose (Life Technologies Co.) por duas horas a 4°C. O material não ligado foi então incubado com 30 μ l de *beads* de proteína G-agarose e anti- α -tubulina (150 μ g/ml, cat. T5168; Sigma-Aldrich), por 16 horas à 4 °C. Após a incubação das amostras, os *beads* foram lavados por centrifugação três vezes com Tris-HCl (20 mM; pH 7.5) contendo coquetel inibidor de proteases (1:300, # P8340 Sigma-Aldrich) e coquetel inibidor de fosfatases (1:100 Cat n° 04906845001, Roche). Os *beads* foram ressuspensos em 60 μ L de tampão Laemmli, aquecidos a 100°C por dez minutos e aplicadas em gel SDS-PAGE (Schechtman D. *et al.*, 2003). O *imunoblotting* foi realizado utilizando anticorpo anti-fosfotreonina (Life Technologies Co.), anti- α -tubulina e anti-GFP, conforme descrito anteriormente.

3.15. Polimerização da tubulina *in vitro*

O ensaio de polimerização da tubulina foi realizado em colaboração com o laboratório da Dra Daria Mochly-Rosen do *Department of Chemical and Systems Biology*, (Stanford University School of Medicine, CA, EUA). Antes do ensaio de polimerização, as amostras foram incubadas por dez minutos no gelo, a fim de evitar qualquer tubulina polimerizada antes do início da realização do ensaio (Fourest-Lieuvin A. *et al.*, 2006).

A reação de polimerização da tubulina bovina (400 ng, TL238 Cytoskeleton®) não fosforilada e fosforilada, pela PKC β I ativada, (como descrito na secção 3.8), foi realizada em 180 μ l de tampão G-PEM [PIPIES (80 mM, pH 6.9); MgCl₂ (2 mM); EGTA (0.5 mM), glicerol (60% v/v)]. A polimerização foi iniciada adicionando GTP (1 mM) e as leituras de absorbância a 340 nm obtidas com um

espectrofotômetro. Em cada condição a polimerização foi acompanhada por 30 minutos a 37°C.

3.16. Microscopia Confocal de Fluorescência

As linhagens celulares, CTE E14TG2A e HEK293T, foram cultivadas em lamínulas redondas de 13 mm até que atingissem 70-80% de confluência. As células foram fixadas com paraformaldeído (PFA, 4%) por dez minutos a temperatura ambiente. Após fixação, as lamínulas foram lavadas novamente duas vezes com PBS e guardadas com água destilada a 4°C até serem marcadas com anticorpos específicos. As células fixadas foram bloqueadas com solução contendo PBS, soro de cabra (1% v/v) e Triton-X 100 (0.1% v/v) e incubadas em atmosfera úmida a temperatura ambiente por 30 minutos. A solução bloqueadora foi aspirada e as células incubadas com os anticorpos primários diluídos na solução bloqueadora por pelo menos duas horas a temperatura ambiente, incubações mais extensas foram feitas a 4°C (Costa-Junior H.M. *et al.*, 2010). Os anticorpos primários usados para o ensaio foram anti-PKC β I (1:100, Santa Cruz Biotechnology) e anti- α -tubulina (1:500, Sigma-Aldrich). Os anticorpos primários foram aspirados e as células lavadas três vezes com incubações de 15 minutos em solução contendo PBS e Triton-X 100 (0.1% v/v). Os anticorpos secundários fluorescentes [ex.: vermelho de Texas e/ou isothiocyanato de fluoresceína (FITC) (Molecular Probes®, OR, EUA)], foram diluídos (1:300) na solução de bloqueio e incubados no escuro a temperatura ambiente por uma hora. As células foram lavadas conforme descrito acima. As lâminas e lamínulas foram montadas em solução [glicerol (50% v/v) em PBS contendo DAPI (20 μ g/mL; 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride)]. As lamínulas foram seladas com esmalte incolor. A marcação foi detectada por

microscopia de epi-fluorescência (Nikon Eclipse E600, objetiva Plan FLuor 60X) ou por microscopia confocal (Carl Zeiss ® 510 LMS conectado ao microscópio Axiover, objetiva 68X).

Durante a aquisição das imagens por microscopia confocal, a intensidade do laser foi cuidadosamente controlada, a fim de evitar diferença de intensidade de cor entre as amostras. Para a análise de incorporação de α -tubulina-GFP no fuso mitótico, as imagens de cortes de 7.4 mm e pinhole de 0.82 mm foram obtidas. O perfil de intensidade de verde/ vermelho (488 nm e 555 nm, respectivamente) foi medido usando o programa Zen lite 2011 (Carl Zeiss ®, Ostalbkreis, Alemanha). Pelo menos sete células em metáfase foram analisadas para cada mutante de α -tubulina. O gráfico de dispersão decorrente dessa análise foi realizado a partir da razão da intensidade de marcação verde (α -tubulina-GFP) por vermelho (α -tubulina total).

3.16.1. Coleta e imunofluorescência dos embriões de camundongo

Esta etapa da tese foi realizada em colaboração com o Dr José Xavier (LnBio Laboratório Nacional Biosciências, Campinas). Camundongos fêmeas com idade de seis a oito semanas foram tratadas com gonadotrofina (5 UI, G4527 Sigma-Alcridh) e gonadotrofina coriônica humana hCG (5 UI; C8554, Sigma-Aldrich) como descrito por Dehghani H. e colaboradores, 2005. Três dias e meio após o coito, os blastocistos foram removidos do utero das fêmeas utilizando meio EmbryoMax ® M2 (Merck Millipore, MA, EUA) e imediatamente fixado com PFA (2%). A microscopia confocal de embriões de camundongos foi realizada como descrita por Dehghani e colaboradores (REF 18 do arquivo faseb). Os blastocistos fixados foram permeabilizados em solução contendo PBS e Triton-X 100 (0.5% v/v). Lavados com

PBS e glicina (5 mM) e incubados em PBS e Tween-20 (1% v/v) por dez minutos. Posteriormente, foi adicionado um tampão intracelular [KCl (100 mM); MgCl₂ (5 mM); EGTA (3 mM); BSA (1% m/v) e HEPES (20 mM pH 6.8)]. Após esta etapa de permeabilização, a marcação com anticorpos anti-PKC β I e anti- α -tubulina foi realizada conforme descrito previamente.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Elucidação funcional das aPKCs em células tronco indiferenciada, identificação e caracterização dos substratos destas isoenzimas.

4.1.1. Identificação dos alvos das aPKCs em CTE indiferenciadas utilizando fosfoproteômica

Conforme apresentado na introdução, as aPKCs (λ e ζ) são altamente expressas em CTE (Costa-Junior *et al.*, 2010) e apesar de alguns trabalhos indicarem sua importância nesse modelo (Heo *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2006; Yun *et al.*, 2009), as vias de sinalização em que estas isoenzimas estão envolvidas ainda não foram completamente elucidadas. Com o objetivo de avaliar a importância funcional destas serina/ treonina quinases em CTE indiferenciadas, foi utilizada a técnica de fosfoproteômica combinada ao tratamento com inibidor específico das aPKCs, o peptídeo pseudossustrato (aPKC- ψ S). As células tronco embrionária, E14TG2A indiferenciada, foram tratadas com peptídeo carreador controle Tat₄₇₋₅₇ e com o peptídeo inibidor aPKC- ψ S, na concentração de 500 nM, durante 15 minutos a 37°C. Cabe destacar que, estudos anteriores indicam que esta concentração de peptídeo foi suficiente para inibir a atividade das aPKCs (Laudanna C. *et al.*, 1998), e que tratamentos por curto período permitem observar o efeito inicial da inibição da fosforilação mediada por essas quinases (Costa-Junior H.M. *et al.*, 2010). Após o tratamento, os lisados protéicos foram preparados para observação das alterações nas fosfoproteínas por géis bidimensionais (Figura 6).

Os géis bidimensionais foram marcados com corante fosfoespecífico, (ProQ Diamond), sendo possível detectar em quatro géis, para cada tratamento, uma

média de cerca de 515 e 502 *spots* fosforilados obtidos a partir de amostras tratadas com o peptídeo Tat₄₇₋₅₇, e com o peptídeo inibidor, aPKC- ψ S, respectivamente (Figura 6). Estes mesmos géis também foram corados para proteínas totais, sendo possível identificar uma média de 500 *spots* corados com Coomassie Coloidal (G250), entre as quadruplicatas dos dois tratamentos (Figura 6B).

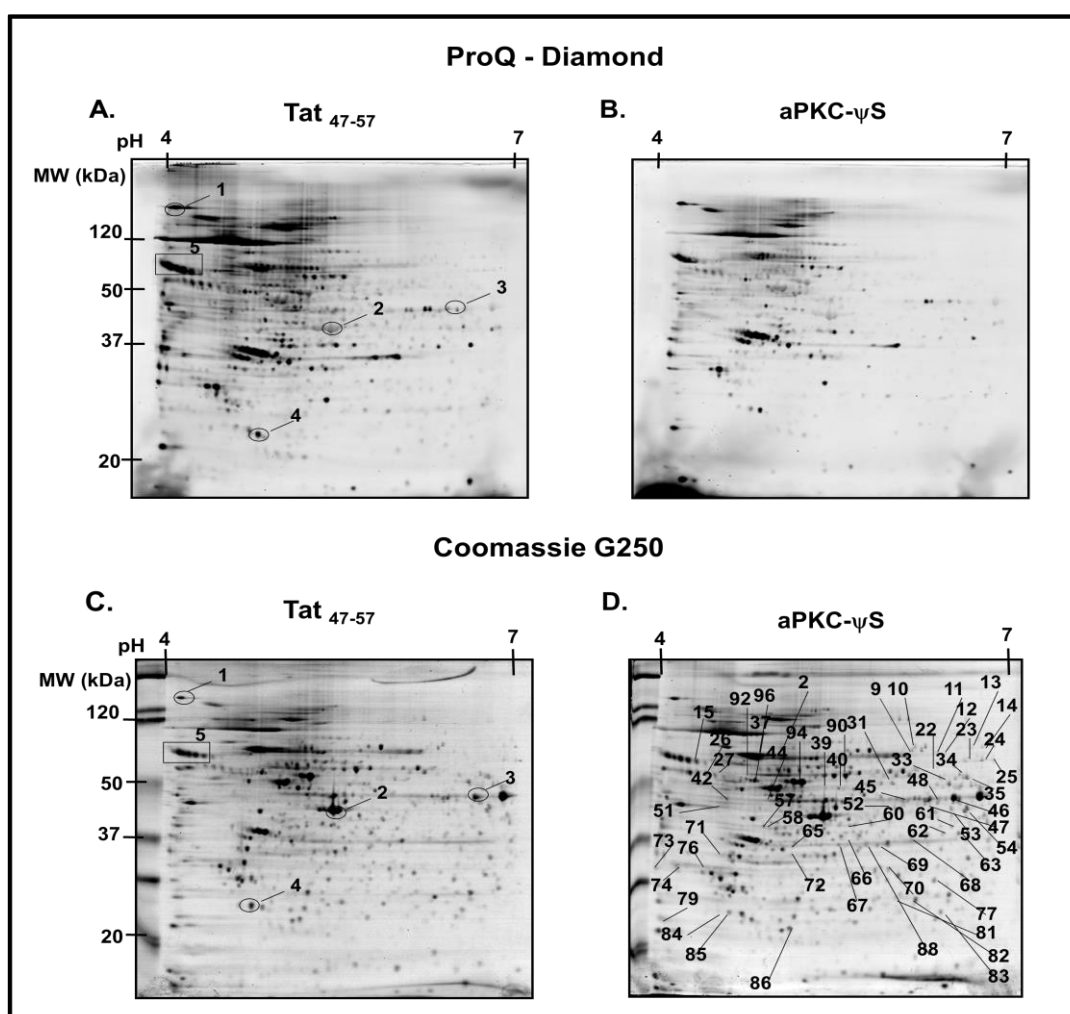


Figura 6: Detecção dos alvos das aPKCs em CTE E14TG2A, indiferenciada, utilizando corante fosfo-específico. Lisado protéico de células tratadas com 500 nM do peptídeo carreador controle TAT₄₇₋₅₇ (A e C) e com o peptídeo pseudossustrato das aPKCs (aPKC- ψ S) (B e D), por 15 minutos. A focalização isoeétrica foi realizada em fitas de 13 cm pH 4-7, em seguida as proteínas foram resolvidas em gel SDS-PAGE 11%. (A e B) Géis corados com corante fosfoespecífico Pro-Q Diamond (Invitrogen). (C e D) Coloração com Coomassie Coloidal, para análise de proteínas totais. Géis representativos de quadruplicata biológica. A numeração indicada nos géis A e C indicam os *spots* utilizados para realizar o alinhamento dos géis durante a análise no ImageMaster, ao passo que a numeração dos *spots* indicados em D é referente as proteínas que sofreram redução da fosforilação e estão descritas na tabela 2.

A análise dos géis foi realizada a partir do pareamento dos mesmos com os *spots* destacados nas Figuras 6A e C. Com o objetivo de identificar possíveis alvos, incluindo substratos diretos das aPKCs, foram selecionados 83 *spots* que apresentaram redução na intensidade de fosfo-marcação após o tratamento com o inibidor aPKC- ψ S.

Os *spots* selecionados apresentaram redução na fosforilação de pelo menos 1,5 vezes em relação ao controle (TAT₄₇₋₅₇) e/ou alteração na marcação com valor de $p < 0,05$, pelo teste estatístico de ANOVA, calculados pelo software Image Master 2D Platinum 7.0 (GE Healthcare Life Science), como pode ser observado na tabela 2. Cabe destacar que, apenas 57 *spots* foram passíveis de remoção dos géis, uma vez que, alguns deles, não foram detectados após a coloração com Coomassie Coloidal Blue (G250). Indicando, assim, que estas proteínas apesar de apresentarem intensa fosforilação, possuem expressão total reduzida.

Os *spots* foram digeridos com tripsina e os peptídeos submetidos à análise por espectrometria de massas utilizando o aparelho ESI-Q-Tof. As proteínas identificadas estão referenciadas na Figura 6D e descritas na tabela 2.

Tabela 2: Identificação das proteínas cuja fosforilação foi reduzida após o tratamento com o peptídeo aPKC-ψS

ID	Proteína	Uniprot	Score Mascot	Nº peptídeos	% Cobertura	Teórico		Experimental		Intensidade Fosforilação		ANOVA
						pI	PM (kDa)	pI	PM (kDa)	TAT ₄₇₋₅₇	aPKC-ψS	
2	ATP-dependent RNA helicase	Q62095	167	7	0,12	6,72	73,49	5,11	82,06	1,92	1,41	3,79E-02
2	Golgi resident protein GCP60	Q8BMP6	94	3	0,05	5,02	60,40	5,11	82,06	1,92	1,41	3,79E-02
9	TNF receptor-associated protein 1	Q12931	1024	29	0,38	6,25	80,03	6,40	83,70	1,11	-	1,63E-01
10	Glycyl-tRNA synthetase	Q9CZD3	522	15	0,23	6,24	82,60	6,36	81,52	1,11	-	1,56E-01
11	Glycerol phosphate dehydrogenase 2, mitochondrial	Q64521	204	7	0,1	6,17	80,85	6,49	79,53	1,10	-	1,89E-01
14	GMP synthase	Q3THK7	333	12	0,18	6,29	77,51	6,82	83,56	1,06	-	2,71E-01
15	Nuclear autoantigenic sperm protein (NASP)	Q99MD9	82	5	0,02	4,35	84,00	4,01	84,19	2,93	1,70	2,84E-02
22	M2-type pyruvate kinase	P52480	118	5	0,08	7,18	58,45	6,48	68,68	1,07	-	2,57E-01
23	inositol-3-phosphate synthase 1	Q9JHU9	155	5	0,09	5,99	61,52	6,68	74,95	1,10	-	2,00E-01
24	T-complex protein 1 subunit beta	P80314	122	2	0,04	6,23	61,02	6,83	75,32	1,08	-	2,28E-01
25	Stress-induced phosphoprotein 1	Q60864	962	29	0,35	6,40	63,16	6,91	75,32	1,08	-	2,35E-01
27	Tubulin alpha-1 chain	P05213	78	5	0,04	4,95	50,50	4,52	66,02	4,34	2,52	3,02E-03
33	Trifunctional purine biosynthetic protein adenosine-3	Q64737	656	19	0,35	6,25	107,5	8,39	60	1,09	-	2,13E-01
34	glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase X	Q00612	1054	33	0,51	6,06	59,23	6,71	67,00	1,07	-	2,58E-01
35	Pre-mRNA-processing factor 19	Q99KP6	364	9	0,2	6,14	55,66	6,77	65,15	1,10	-	1,90E-01
35	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	Q61753	258	6	0,13	6,29	57,34	5,56	61,60	1,10	-	1,90E-01
39	Actin-binding Rho-activating protein	Q8BUZ1	1027	24	0,52	5,29	42,05	5,56	61,60	1,11	-	2,08E-01
40	Ribosome biogenesis protein WDR12	Q9JJA4	527	20	0,46	5,36	47,77	5,68	60,50	4,04	1,62	2,60E-02
40	ATP synthase subunit alpha	Q03265	299	10	0,16	5,36	47,77	5,68	60,50	4,04	1,62	2,60E-02
44	Elongation factor 1-alpha 1	P10126	579	14	0,31	9,10	50,42	5,09	54,89	3,89	1,67	2,13E-02
44	Hsc70-interacting protein	Q99L47	179	8	0,19	5,19	41,80	5,09	54,89	3,89	1,67	2,13E-02
45	Rab GDP dissociation inhibitor beta	Q61598	173	8	0,17	8,66	53,42	5,98	54,62	1,11	-	1,40E-01
46	Alpha-enolase	P17182	2659	92	0,76	6,37	47,11	6,66	55,07	1,46	-	7,49E-02
47	Adenosine Kinase	P55264	759	30	0,49	5,84	40,12	6,29	53,11	2,43	-	5,26E-03
48	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 11	Q8BG32	530	14	0,36	6,09	47,18	6,44	54,71	1,05	-	1,18E-01
48	C-terminal-binding protein 2 isoform 2	P56546	422	13	0,35	6,47	49,44	6,44	54,71	1,05	-	1,18E-01
52	Annexin A7	Q07076	614	17	0,34	5,91	50,19	5,97	49,72	1,06	-	1,22E-01
53	Adenosylhomocysteinase	P50247	701	21	0,47	5,98	48,16	6,63	51,99	1,05	-	1,19E-01
53	Beta-centractin	Q8R5C5	414	10	0,37	5,98	42,37	6,63	51,99	1,05	-	1,19E-01
54	TAR DNA-binding protein 43	Q921F2	836	19	0,39	6,26	44,92	6,76	49,64	1,09	-	2,07E-01
57	ATPase Asna1	O54984	414	12	0,32	4,81	39,25	4,87	43,72	1,04	-	1,18E-01

ID	Proteína	Uniprot	Score Mascot	Nº peptídeos	% Cobertura	Teorico		Experimental		Intensidade Fosforilação		ANOVA
						pI	PM (kDa)	pI	PM (kDa)	TAT ₄₇₋₅₇	aPKC-ψS	
62	3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial	Q8BWT1	241	8	0,22	8,63	41,28	6,48	44,01	2,76	1,43	3,34E-02
65	Eukaryotic translation initiation factor 2A	Q9BY44	733	20	0,52	5,02	36,37	5,30	37,33	1,10	-	1,38E-01
66	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	O88844	214	8	0,28	6,27	39,61	5,66	40,27	1,07	-	2,40E-01
67	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	P16858	221	7	0,28	8,44	36,07	5,63	37,51	1,09	-	1,29E-01
67	Serine/threonine-protein phosphatase 2A	P62715	209	6	0,23	5,30	36,18	5,63	37,51	1,09	-	1,29E-01
67	Protein ADP-ribosylarginine	P54923	192	7	0,24	5,46	40,32	5,63	37,51	1,09	-	1,29E-01
68	Transaldolase	Q93092	379	11	0,29	6,57	37,53	6,18	40,80	1,10	-	1,34E-01
69	L-lactate dehydrogenase B chain	P16125	473	24	0,55	5,70	36,83	6,67	37,58	1,68	1,40	3,00E-02
70	60S acidic ribosomal protein P0	P47962	119	4	0,13	9,78	34,61	6,00	35,18	1,11	-	1,87E-01
71	Proliferating cell nuclear antigen	P17918	581	18	0,58	4,66	29,11	4,47	37,95	1,08	-	1,25E-01
72	Serine/arginine-rich splicing factor 1	Q6PDM2	842	16	0,5	10,37	27,84	5,19	34,77	4,22	1,65	3,25E-02
73	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32	O35381	525	15	0,35	4,00	28,50	3,90	31,14	5,36	1,65	1,76E-02
74	Apolipoprotein E	P08226	89	3	0,12	26,99	4,89	4,10	31,67	6,36	1,49	3,51E-02
77	Proteasome subunit beta type-7	P70195	312	12	0,24	8,14	30,21	6,49	28,25	1,06	-	2,68E-01
79	GTP-binding nuclear protein Ran	P62827	432	13	0,53	7,01	24,58	4,24	25,09	1,76	-	2,41E-02
81	DNA-directed RNA polymerases I, II, and III	Q80UW8	524	14	0,62	24,67	5,69	6,13	25,01	1,10	-	2,03E-01
81	Phosphoserine phosphatase	Q99LS3	218	7	0,28	5,81	25,31	6,13	25,01	1,10	-	2,03E-01
82	Peroxiredoxin-6	O08709	1337	19	0,83	5,71	24,97	6,30	24,56	1,09	-	1,30E-01
83	Heat shock protein beta-1	P14602	1281	38	0,9	6,12	23,00	6,62	25,13	2,95	-	2,31E-03
84	Translationally-controlled tumor protein	P63028	113	4	0,27	4,76	19,56	4,44	21,63	1,10	-	1,32E-01
85	Kinetochore protein Spc24	Q9D083	331	6	0,4	4,57	23,57	4,30	24,64	1,00	-	1,16E-01
86	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	P70296	859	17	0,8	5,19	20,99	5,19	19,12	1,11	-	1,84E-01
87	Chromobox protein homolog 3	P23198	150	4	0,25	4,96	19,91	5,44	13,61	0,65	-	7,20E-01
88	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha	Q99PT1	72	5	0,21	5,12	23,43	5,65	34,98	0,08	-	5,00E-02
88	40S ribosomal protein	P25444	112	8	0,15	4,74	32,81	4,79	42,10	1,04	1,01	1,90E-01
92	Tubulin beta-2C chain	P68372	181	8	0,13	4,79	50,26	4,81	57,27	0,38	0,31	6,50E-01
93	60 kDa heat shock protein, mitochondrial precursor	P63038	152	9	0,07	5,91	61,09	5,53	59,86	0,72	0,62	2,60E-01
94	Tubulin beta-5 chain	P99024	258	10	0,27	4,78	50,10	5,22	62,95	0,82	0,64	3,14E-01
96	Heat shock cognate 71kDa protein	P63017	74	11	0,11	5,37	71,06	4,88	72,09	1,40	1,17	1,00E-01
97	Eukaryotic Translation Initiation Factor 4B	Q8BGD9	86	4	0,09	5,47	68,97	5,59	81,77	0,37	0,17	6,50E-01

Como indicado na tabela 2, foram identificadas 62 proteínas dos 57 *spots* seccionados, uma vez que, em alguns casos, um único *spot* continha mais de uma proteína. Conforme sugerido pelo programa Mascot Daemon (Matrix Science USA), as proteínas consideradas apresentavam pontuação (*score*) superior a 70, sendo o *score* definido como a probabilidade que o pareamento observado seja um evento randômico (Perkins D.N. *et al.*, 1999). Em adição, as proteínas selecionadas a partir do resultado obtido pelo espectrometro de massas continham no mínimo quatro seqüências peptídicas alinhadas com a seqüência protéica identificada a partir do banco de dados do Swiss Prot (Boeckmann B. *et al.*, 2005). A partir da tabela 2, também é possível observar a porcentagem de cobertura dos peptídeos identificados em relação à proteína descrita, além do peso molecular e do ponto isoelétrico, teórico e experimental. Cabe destacar que, o nome das proteínas identificadas está descrito tal como foi indicado após análise no Mascot Daemon (em inglês).

Dentre as proteínas identificadas 41,6% são proteínas exclusivamente citoplasmáticas, 17% proteínas exclusivamente nucleares, 12,1% são proteínas mitocondriais e 29,3% são proteínas descritas como citoplasmáticas e nucleares. (Figura 7A). Esta distribuição está de acordo com a localização sub-celular das aPKCs, citoplasmática e em junções célula-célula, observada em trabalho anterior do nosso grupo (Costa-Junior *et al.*, 2010).

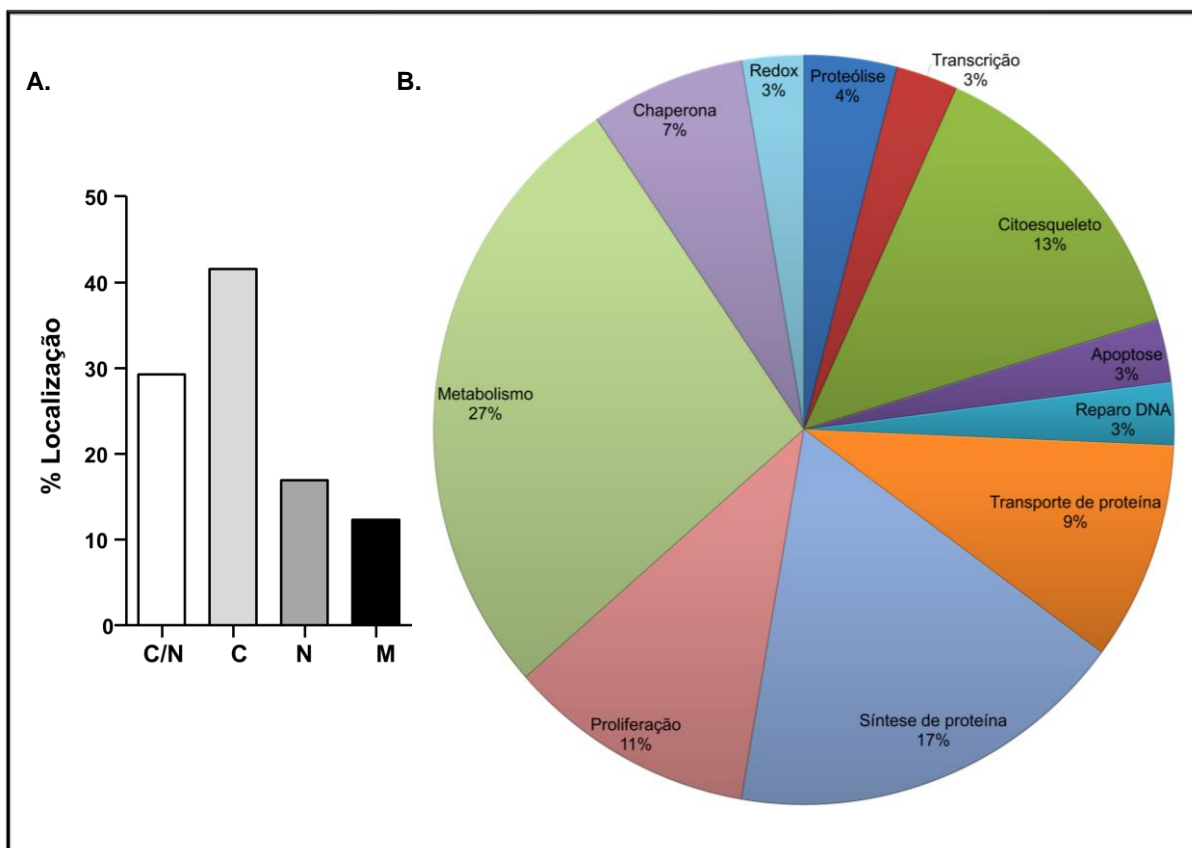


Figura 7: Classificação funcional das proteínas cuja fosforilação diminuiu após o tratamento com o inibidor das aPKCs. A) Distribuição percentual com relação à localização subcelular dos alvos das aPKCs, o citoplasma está representado como c; núcleo como n; mitocôndria como m. B) Distribuição das proteínas de acordo com o processo biológico que participam. Dados obtidos a partir da tabela 2 e do *GeneOntology* (<http://www.geneontology.org/>, analisado em fevereiro de 2013).

Ao avaliar a distribuição funcional das proteínas que apresentaram a redução da fosforilação após a inibição das aPKCs, dois principais grupos de proteínas foram identificados: i) proteínas envolvidas em vias metabólicas, como glicólise, metabolismo de lipídeos, via das pentoses e produção de aminoácidos (27%); ii) proteínas envolvidas na manutenção do citoesqueleto, adesão celular e transporte de proteínas (22%). Cabe destacar que, 7% das proteínas são chaperonas envolvidas no controle do metabolismo e na manutenção do citoesqueleto. Como pode ser observado na Tabela 2 e na figura 7B.

Aproximadamente um terço das proteínas, identificadas por sofrerem redução da fosforilação após o tratamento com o inibidor das aPKCs, estão

envolvidas no controle metabólico. Dessa maneira, considerando a grande importância da modulação das vias metabólicas no controle da auto-renovação / diferenciação das células tronco (Zhang J. *et al.*, 2012), somado ainda, ao papel já descrito das aPKCs no controle da captação de glicose (Sajan M.P. *et al.*, 2006), nas etapas subsequente dessa tese as aPKCs foram caracterizadas no controle metabólico.

4.1.2. Caracterização funcional das aPKCs no controle metabólico

Através da análise de bancos de dados GeneOntology (Martin D. *et al.*, 2004) e Kegg (Kanehisa M. & Goto S., 2000) foi possível identificar que dentre as proteínas envolvidas no controle da rede metabólica, cerca de 27% são proteínas da via glicolítica (seis proteínas), 23% são proteínas presentes no metabolismo de lipídeos (cinco proteínas), e dentre as proteínas que estão envolvidas na síntese de purinas, aminoácidos e metabolismo de glutathione, foram observados três proteínas em cada um desses grupos (Tabela 3).

Tabela 3: Identificação das proteínas metabólicas que sofreram redução da fosforilação após o tratamento com o peptídeo aPKC- ψ S

ID.	Proteína	Intensidade Fosforilação		ANOVA	Localização	Short name
		TAT ₄₇₋₅₇	aPKC- ψ S			
2	Golgi resident protein GCP60	1,92	1,41	3,79E-02	M	GCP60
11	Glycerol phosphate dehydrogenase 2, mitochondrial	1,10	-	1,89E-01	M	GPD2
14	GMP synthase	1,06	-	2,71E-01	C	GMPS
22	M2-type pyruvate kinase	1,07	-	2,57E-01	C/N	PKM2
23	Inositol-3-phosphate synthase 1	1,10	-	2,00E-01	C	IPS1
33	Trifunctional purine biosynthetic protein adenosine-3	1,09	-	2,13E-01	C	GART
34	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase X	1,07	-	2,58E-01	C	G6PDX
35	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	1,10	-	1,90E-01	M	PHGDH
40	ATP synthase subunit alpha	4,04	1,62	2,60E-02	M	Atp5a1
46	Alpha-enolase	1,46	-	7,49E-02	C	ENO1
47	Adenosine Kinase	2,43	-	5,26E-03	C/N	ADK
53	Adenosylhomocysteinase	1,05	-	1,19E-01	C	AHCY
62	3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial	2,76	1,43	3,34E-02	M	ACAA2
66	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	1,07	-	2,40E-01	C	IDH
67	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1,09	-	1,29E-01	C	GAPDH
67	Protein ADP-ribosylarginine	1,09	-	1,29E-01	C	Adprh1
68	Transaldolase	1,10	-	1,34E-01	C	TALDO
69	L-lactate dehydrogenase B chain	1,68	1,40	3,00E-02	C	LDH
74	Apolipoprotein E	6,36	1,49	3,51E-02	C	APOE
81	Phosphoserine phosphatase	1,10	-	2,03E-01	C	PSPase

Na figura 8, estão em destaque as proteínas envolvidas diretamente na via glicolítica e ainda algumas enzimas, presentes em algumas vias como a via das pentoses e biossíntese de serina, que são capazes de produzir ou utilizar intermediários metabólicos que convergem diretamente para a glicólise.

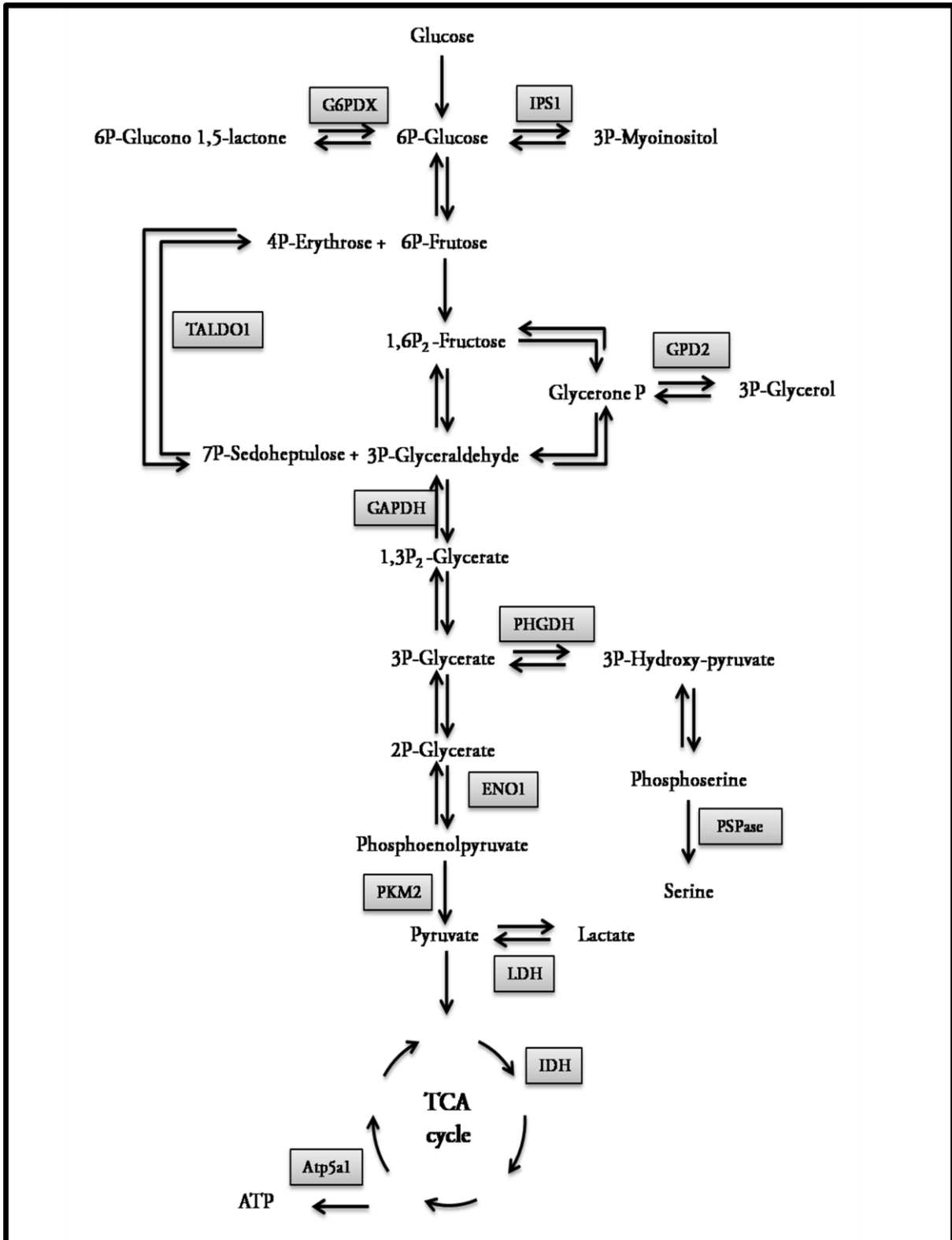


Figura 8: A inibição das aPKCs reduz a fosforilação de algumas enzimas envolvidas na biossíntese de intermediários da via glicolítica. As proteínas que sofreram a redução da fosforilação estão em destaque entre as etapas de algumas vias envolvidas no metabolismo da glicose.

A enzima Piruvato Quinase (PK) é responsável por uma das etapas limitante da glicólise (Mazurek S. *et al.*, 2011), em adição, trabalhos recentes descrevem a importância dela como regulador da diferenciação celular (Feron O, 2009) e auto-renovação das CTE (Lee J. *et al.*, 2008). Considerando este cenário, esta enzima foi validada como possível alvo das aPKCs, utilizando anticorpos específicos.

Como indicado na figura 9A e 9B, a Piruvato Quinase M2 (PKM2) sofre redução da fosforilação após o tratamento com o peptídeo inibidor das aPKCs. A realização de uma eletroforese bidimensional seguida do *immunoblotting* utilizando anti-PKM permitiu observar uma redução do *spot* com um pH mais ácido após o tratamento com o peptídeo aPKC- ψ S (Figura 9C) o que seria esperado na ausência da fosforilação. Estes dados reforçam a hipótese que esta enzima pode sofrer uma mudança na fosforilação após o tratamento com o peptídeo inibidor das aPKCs.

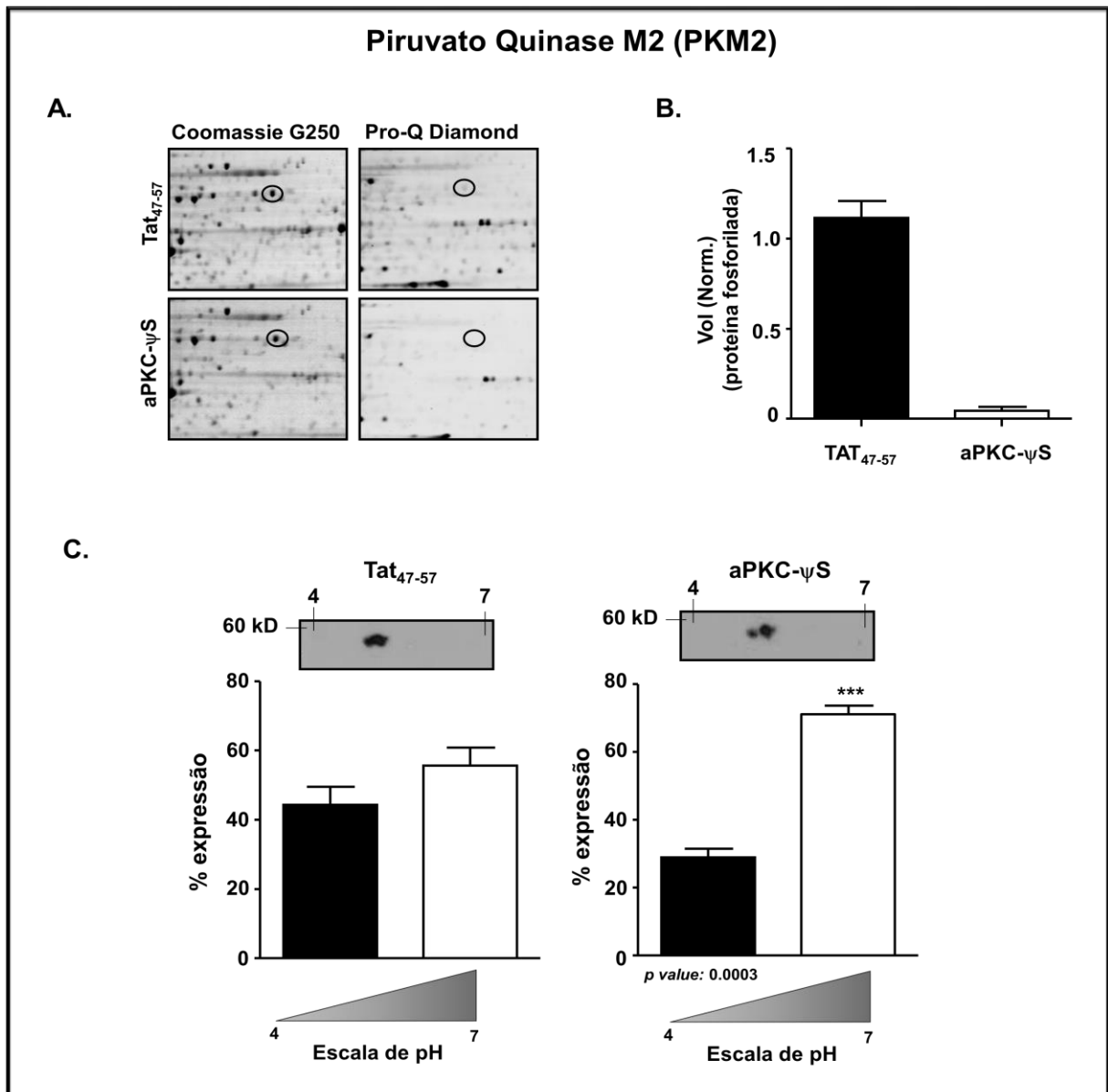


Figura 9: Validação da Piruvato Quinase-2 (PKM2) como um dos alvos das aPKCs em CTE indiferenciada. A linhagem celular E14TG2A foi tratada com 500 nM do peptídeo controle, TAT₄₇₋₅₇, e do peptídeo inibidor aPKC-ψS, por 15 minutos. A) *Spot* referente a PKM2. Géis de eletroforese bidimensional foram corados com os corantes ProQDiamond e Coomassie Coloidal. B) Análise quantitativa da média normalizada de quatro experimentos independentes, comparando o volume do *spot* fosforilado entre os géis controle, tratados com TAT₄₇₋₅₇, com os géis tratados com o peptídeo aPKC-ψS. Géis representativos de quadruplicata experimental, $p < 0,05$. C) Alteração do ponto isoelétrico da Piruvato Quinase observada por eletroforese bidimensional seguido de *imunoblotting* utilizando anti-PKM2, como anticorpo. Média de triplicata experimental; * $p < 0,005$ pelo teste *t*.

A partir do ensaio de *imunoblotting* dos géis bidimensionais não é possível inferir que a PKM2 é substrato direto das aPKC, para isso, foram realizados ensaio de fosforilação *in vitro* (Figura 10). Nesse ensaio, foi utilizado PKM2 purificada e as

isoformas PKC ζ e PKC λ recombinante além de ceramida (C6) como ativador das aPKCs. A reação de fosforilacao foi realizada por 30 minutos a temperatura ambiente. Após esse período as amostras foram resolvidas por SDS-PAGE e os géis foram corados com corante fosfoespecífico, ProQ Diamond, e para análise da concentração de proteína total foi utilizado Coomassie Coloidal Blue (G250) (Figura 10A e B). Como pode ser observada na figura 10, a PKC λ foi capaz de fosforilar a PKM2 (Figura 10 A e C), com um aumento na intensidade de fosforilação de aproximadamente quatro vezes. A PKC ζ também foi capaz de fosforilar diretamente PKM2, porém o aumento na intensidade de fosforilação foi de somente duas vezes, como pode ser observado no gráfico (Figura 10D). Estas diferenças podem ser devido a especificidade das duas enzimas ou da atividade específica das mesmas, o que não foi avaliado no presente estudo.

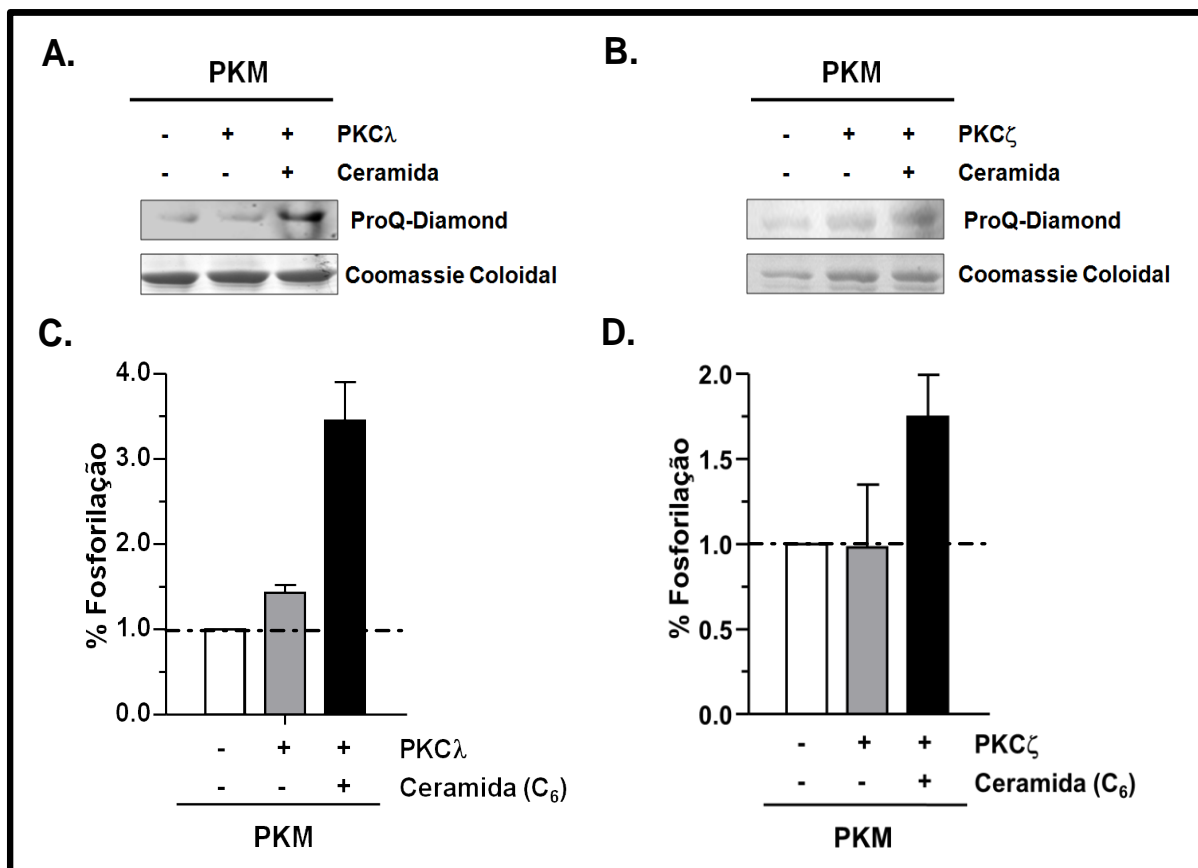


Figura 10: Piruvato Quinase é um substrato direto das aPKCs. A enzima PKM purificada foi submetida ao ensaio de fosforilação *in vitro*, 100 ng de PKC ζ e PKC λ foram adicionadas a reação contendo 1000 ng de PKM2, na presença ou ausência de 50 nM de ceramida (C₆). Após 30 minutos de reação, as proteínas foram desnaturadas com tampão Laemmli e resolvidas em gel de eletroforese SDS-PAGE. A e B) Os géis foram corados com ProQDiamond e Coomassie Coloidal. C e D) Porcentagem de fosforilação, após normalização das bandas pelo Coomassie Coloidal, gráfico obtido a partir da densitometria das bandas utilizando o *software* ImageJ. Média de duplicata experimental.

Além da enzima Piruvato Quinase, outras enzimas da via glicolítica como a Gliceraldeído 3-fosfato Desidrogenase (GAPDH), a Enolase (ENO) e a Lactato Desidrogenase (LDH), também sofreram redução da fosforilação após o tratamento com aPKC- ψ S, como pode ser observado na figura 11.

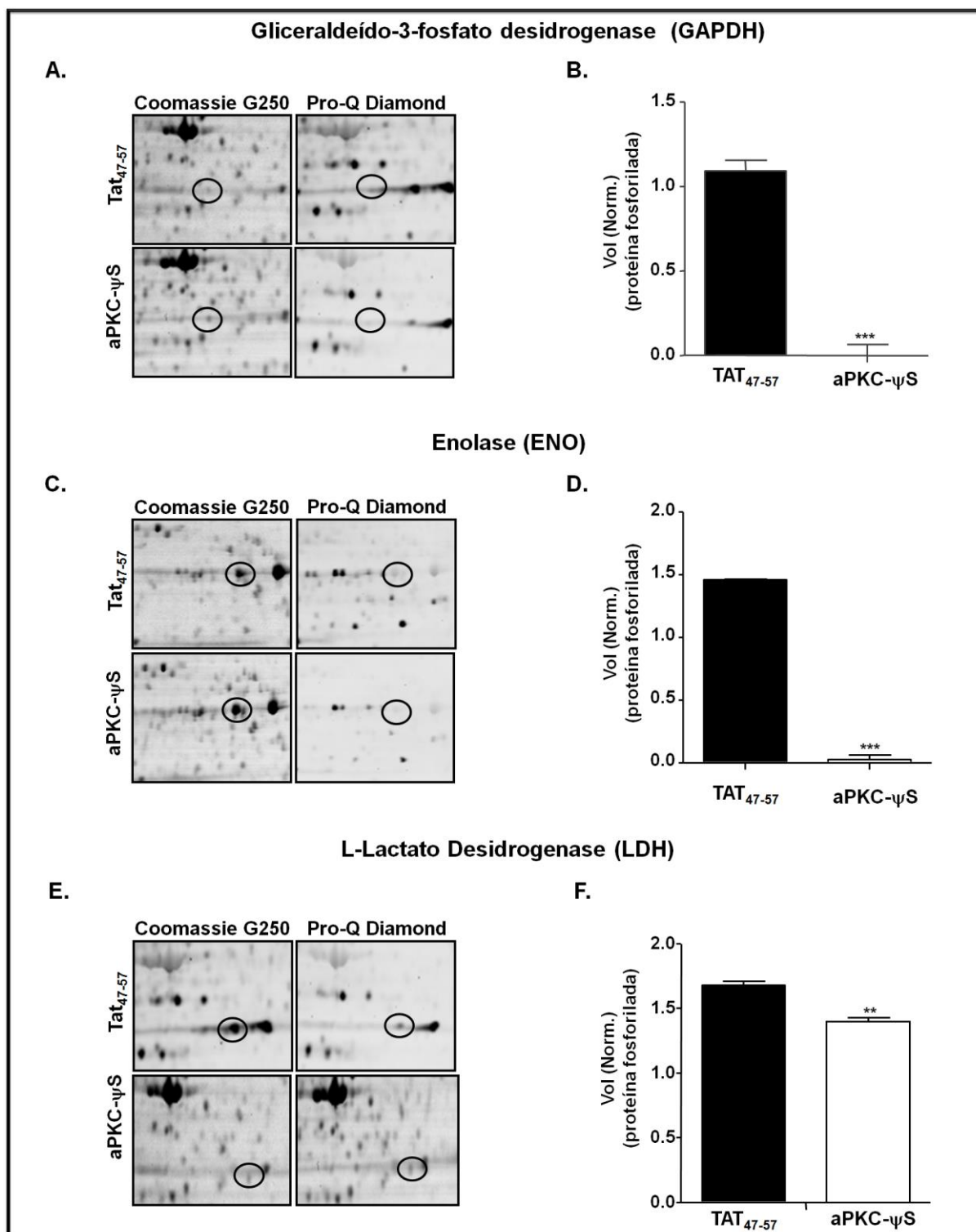


Figura 11: Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), Enolase (ENO) e L-Lactato Desidrogenase (LDH) sofrem redução da fosforilação após inibição das aPKCs em CTE indiferenciadas. A linhagem celular E14TG2A foi tratada com 500 nM do peptídeo controle, TAT₄₇₋₅₇, ou com o peptídeo inibidor aPKC-ψS, por 15 minutos. (A, C e E) *Spot* referente a GAPDH, ENO e LDH em destaque. Géis de eletroforese bidimensional foram corados com corante ProQ Diamond e com Coomassie Coloidal. (B, D e F) Análise quantitativa da média normalizada de quatro experimentos independentes, comparando o volume do *spot* fosforilado entre os géis controle, tratados com TAT₄₇₋₅₇, com os géis tratados com o peptídeo aPKC-ψS. ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$; teste *t*.

A fim de avaliar se as mesmas também são substratos diretos das aPKCs, o ensaio de fosforilação *in vitro* foi realizado (Figura 12). Ao contrário da PKM2, a enzimas Enolase e Lactato Desidrogenase não são substratos diretos das aPKCs, como pode ser observado na figura 12. Um aumento na intensidade de fosforilação não foi observado, quando o substrato, Enolase ou Lactato Desidrogenase, foi adicionado as diferentes isoenzimas das aPKCs ativadas. Cabe ressaltar, que foi considerado a fosforilação do substrato pelas aPKCs, quando há um aumento de mais de 1,5 vezes na intensidade de marcação do ProQDiamond.

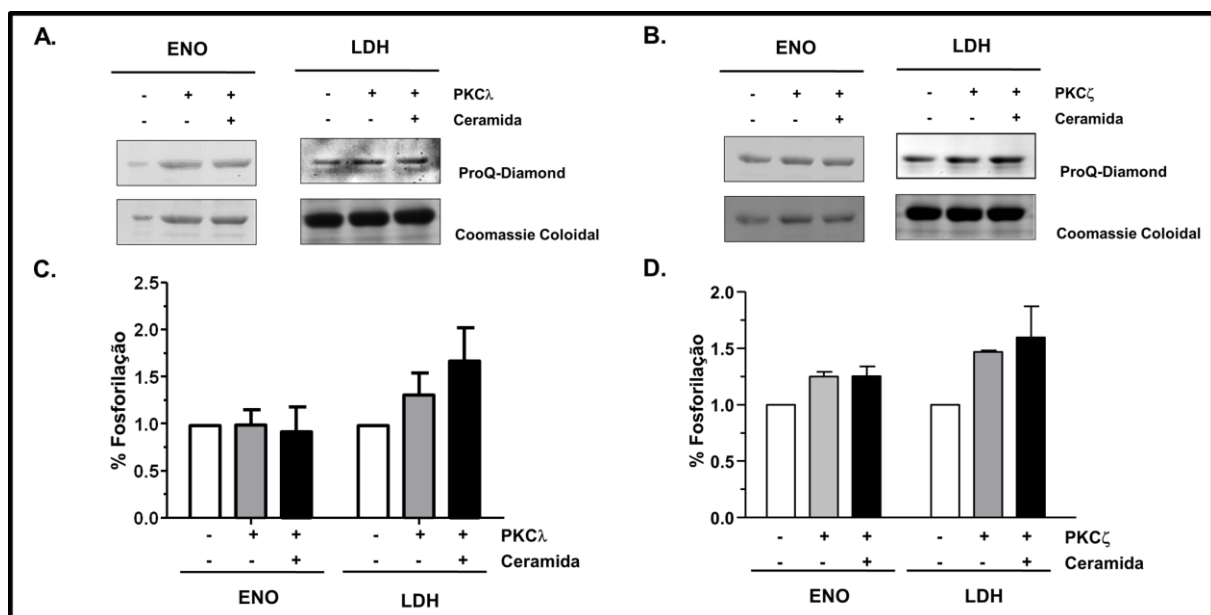


Figura 12: Enolase e Lactato Desidrogenase não são substratos direto das aPKCs. A As enzimas ENO e LDH purificadas (Sigmas) foram submetida ao ensaio de fosforilação *in vitro*. 100 ng de PKC ζ ou de PKC λ (Invitrogen) foi adicionada a reação contendo 1000 ng de substrato, na presença ou ausência de 50 nM de ceramida. Após 30 minutos de reação, as proteínas foram desnaturadas com tampão *Loading Buffer* e resolvidas em Gel SDS-PAGE. (A e B) Os géis foram corados com ProQDiamond e Coomassie Coloidal. (C e D) Porcentagem de fosforilação, após normalização das bandas pelo Coomassie Coloidal, gráfico obtido a partir da densitometria das bandas utilizando o *software* ImageJ. Média de duplicata experimental.

4.1.3. Análise da atividade enzimática da lactato desidrogenase e da piruvato quinase

A atividade enzimática da Piruvato Quinase e da Lactato Desidrogenase foram avaliadas na CTE E14TG2A, indiferenciada, após uma hora de tratamento com o peptídeo inibidor das aPKCs. Para a realização deste ensaio foram utilizados os kits de ensaio colorimétrico produzidos pela Doles (Brasil) e pela Cayman (EUA), para as enzimas Lactato Desidrogenase e Piruvato Quinase, respectivamente. Como pode ser observado pela Figura 13, a atividade da Lactato Desidrogenase foi reduzida significativamente após o tratamento com aPKC- ψ S, quando comparada ao Tat₄₇₋₅₇, ao passo que, a atividade da Piruvato Quinase não foi alterada. Esses ensaios foram realizados a partir da análise da redução do NAD⁺ no ensaio de atividade da Piruvato Quinase e oxidação do NADH no ensaio da Lactato Desidrogenase, medindo conseqüentemente a produção de piruvato e lactato, respectivamente.

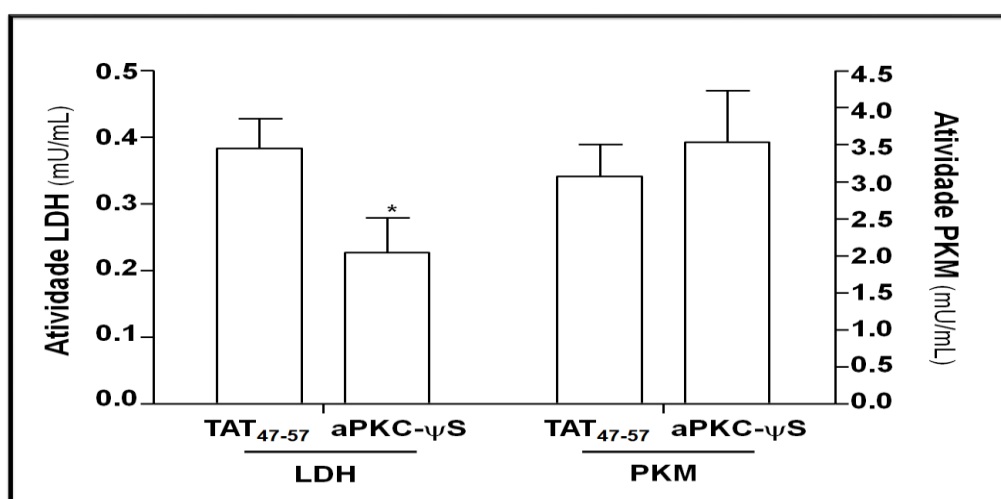


Figura 13: A inibição das aPKCs reduz a atividade da Lactato Desidrogenase em CTE E14TG2A indiferenciada. Atividade da LDH e da PKM medida utilizando os kits de ensaio colorimétrico seguindo as instruções do fabricante, Doles e Cayman, respectivamente. O extrato celular foi obtido após uma hora de tratamento com os peptídeos Tat₄₇₋₅₇ e com aPKC- ψ S, utilizando solução tampão fornecida pelos fabricantes. Média de quadruplicata experimental; * $p < 0,01$ pelo teste *t*.

4.1.4. Análise do perfil metabólico das CTEs indiferenciada após inibição das aPKCs

Os resultados obtidos nessa tese indicam pela primeira vez o envolvimento das aPKCs como um dos agentes responsáveis pela fosforilação de enzimas da via glicolítica, reforçando a hipótese de que estas quinases são importantes não apenas para a regulação do consumo de glicose como havia sido demonstrado anteriormente (Sajan M.P. *et al*, 2006) como também, em outras etapas do metabolismo. Dessa maneira, como próxima etapa da realização dessa tese, foi verificado que a captação de glicose, produção de lactato (Figura 14 e 15) e o consumo de oxigênio (Figura 17) sofrem alteração após o tratamento das CTE indiferenciada com o peptídeo inibidor das aPKCs.

O consumo de glicose e a produção de lactato foram avaliados por duas metodologias diferentes, pelo aparelho Bioprofile[®] (Nova Biomedical) e por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN-H). As células CTE, E14TG2A, foram tratadas com 500 nM de peptídeo carreador controle TAT₄₇₋₅₇ e com o peptídeo inibidor das aPKCs, aPKC- ψ S, o sobrenadante foi recolhido e submetido a análise metabólica pelas duas metodologias, como descrito nos Materiais e Métodos.

4.1.4.1. Alteração no consumo de glicose e produção de lactato

Como pode ser observado pela Figura 14, as células E14TG2A, indiferenciada, tratadas com o peptídeo inibidor aPKC- ψ S apresentaram redução no consumo de glicose e produção de lactato em comparação a células tratadas com o peptídeo controle, TAT₄₇₋₅₇. Essas análises foram realizadas pelo aparelho

Bioprofile® e são relativa a concentração de glicose e lactato presente no meio de cultura, ou seja, a concentração desses metabólitos presentes no meio de cultura (GMEN High Glucose) foram subtraídas pela concentração de glicose e lactato analisada no meio extracelular após os diferentes intervalos de tempo do tratamento com os peptídeos. Cabe destacar, que o número de célula não variou com a inibição das aPKCs, após oito horas de tratamento, como pode ser observado pela figura 14 C.

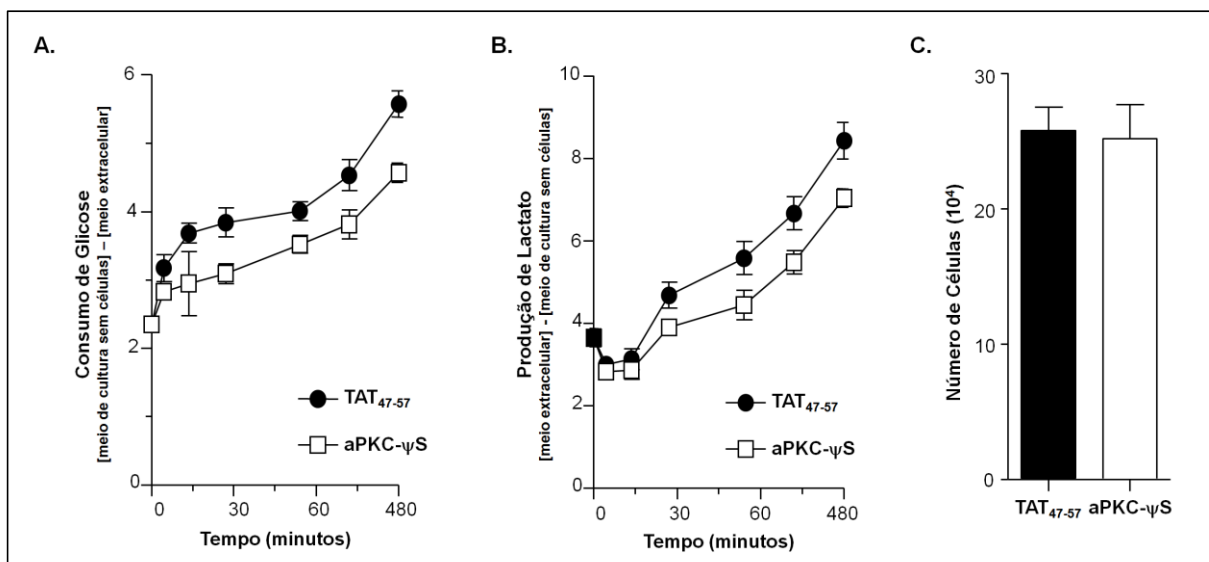


Figura 14: A inibição das aPKCs reduz o consumo de glicose e produção de lactato. A linhagem celular CTE E14TG2A, indiferenciada, foi tratada com 500 nM de peptídeo carreador controle (TAT₄₇₋₅₇) e com o peptídeo inibidor aPKC-ψS por até oito horas e a concentração dos metabólitos presente no meio celular foi obtida a partir da análise no Bioprofile®. A) O consumo de glicose relativo foi obtido a partir da concentração de glicose presente no meio de cultura (GMEM HighGlucose) pela subtração da concentração de glicose observada a partir do meio condicionado após os diferentes pontos da cinética. Valor de $p < 0,01$ a partir do teste estatístico *two-way ANOVA*. B) A produção de lactato relativa foi observada a partir da concentração de lactato liberada pela célula, nos diferentes pontos da cinética de tratamento, pela subtração da concentração presente no meio de cultura (GMEM HighGlucose). Valor de $p < 0,01$ a partir do teste estatístico *two-way ANOVA*. C) Análise da proliferação celular, após oito horas de tratamento. As células foram contadas em câmara de Neubauer. Dados obtidos a partir de triplicata experimental. Essas análises foram realizadas a partir de triplicata biológicas.

A figura 15 A indica a variação no consumo de glicose após uma hora de tratamento e nos intervalos entre 1-4 horas e 1-8 horas de inibição das aPKCs. A

produção de lactato, nestes mesmos intervalos, está descrita na figura 15 B. Diferente da análise anterior, esta foi realizada a partir da subtração da concentração de glicose presente no meio condicionado, no tempo zero (sem tratamento) ou no tempo de uma hora e após os intervalos de tempo indicados no gráfico. Como o lactato, ao contrário da glicose, é produzido pela célula, sua análise foi realizada pela subtração da concentração do mesmo no tempo final do experimento pelo tempo inicial, tempo zero (sem tratamento) ou pelo tempo de uma hora. A taxa fermentativa (Figura 15 C) foi obtida a partir da razão entre a produção de lactato pelo consumo de glicose, nos intervalos de tempo indicados no gráfico. Cabe destacar que valores próximos de dois indicam que o tratamento possivelmente torna a célula mais fermentativa. Todos esses cálculos foram normalizados pelo número de células.

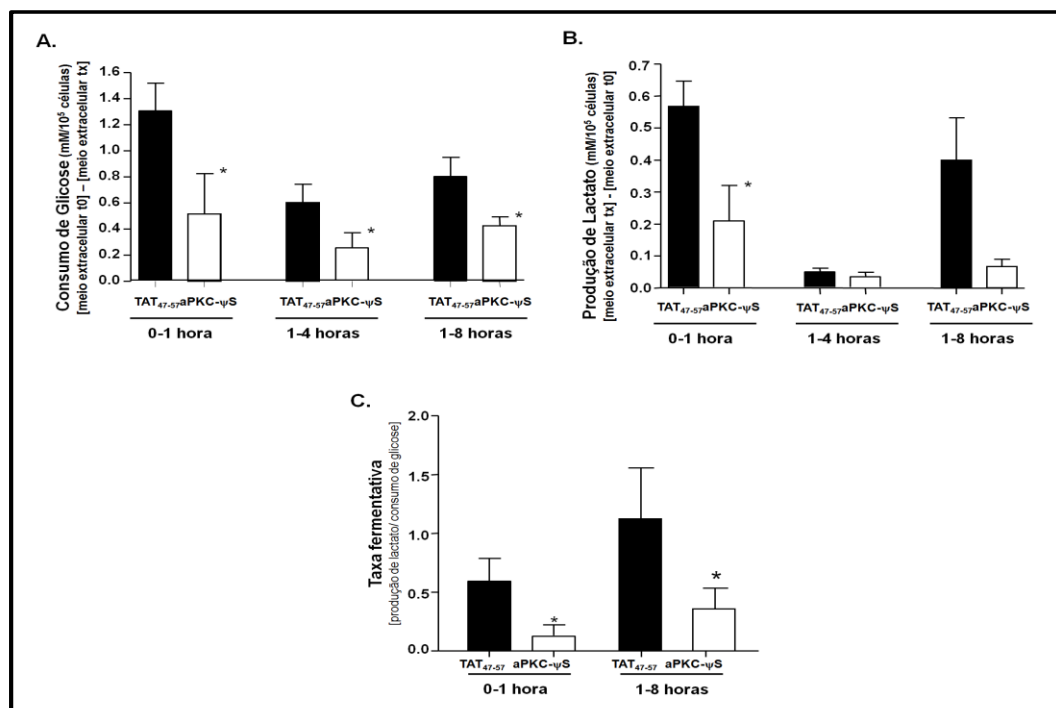


Figura 15: Análise da taxa metabólica da CTE TG2A indiferenciada tratada com o peptídeo inibidor das aPKCs, pelo Bioprofile®. A) Análise relativa a primeira hora de tratamento e dos intervalos entre 1-4 e 1-8 horas. Cálculo do consumo de glicose avaliado pela subtração da concentração de glicose extracelular no tempo zero e após uma hora de tratamento. B) Produção de lactato relativa a primeira hora de tratamento e dos intervalos entre 1-4 ou 8 horas. Produção de lactato avaliado pela subtração de da concentração de lactato em uma hora de tratamento pelo tempo zero. C) A taxa de fermentação é a razão da taxa de produção de lactato pelo consumo de glicose, entre a primeira hora de tratamento e no intervalo entre 1-8 hora. Cálculo realizado a partir dos resultados do bioprofile e normalizado pelo número de célula (10^5 células). Essas análises foram realizadas a partir de nove repetições biológicas. * $p < 0.05$ pelo teste *t*.

Análise do perfil bioenergético da linhagem celular E14TG2A após a inibição das aPKCs também foi avaliada por RMN-H (Figura 16). A análise dos espectros foi realizada a partir do software Chenomx (Figura 16A). O cálculo do consumo de glicose (Figura 16 B) e da produção de lactato (Figura 16 C) no intervalo entre 1-4 horas e 1-8 horas de tratamento com o peptídeo aPKC-ψS foram realizados tal como na figura anterior.

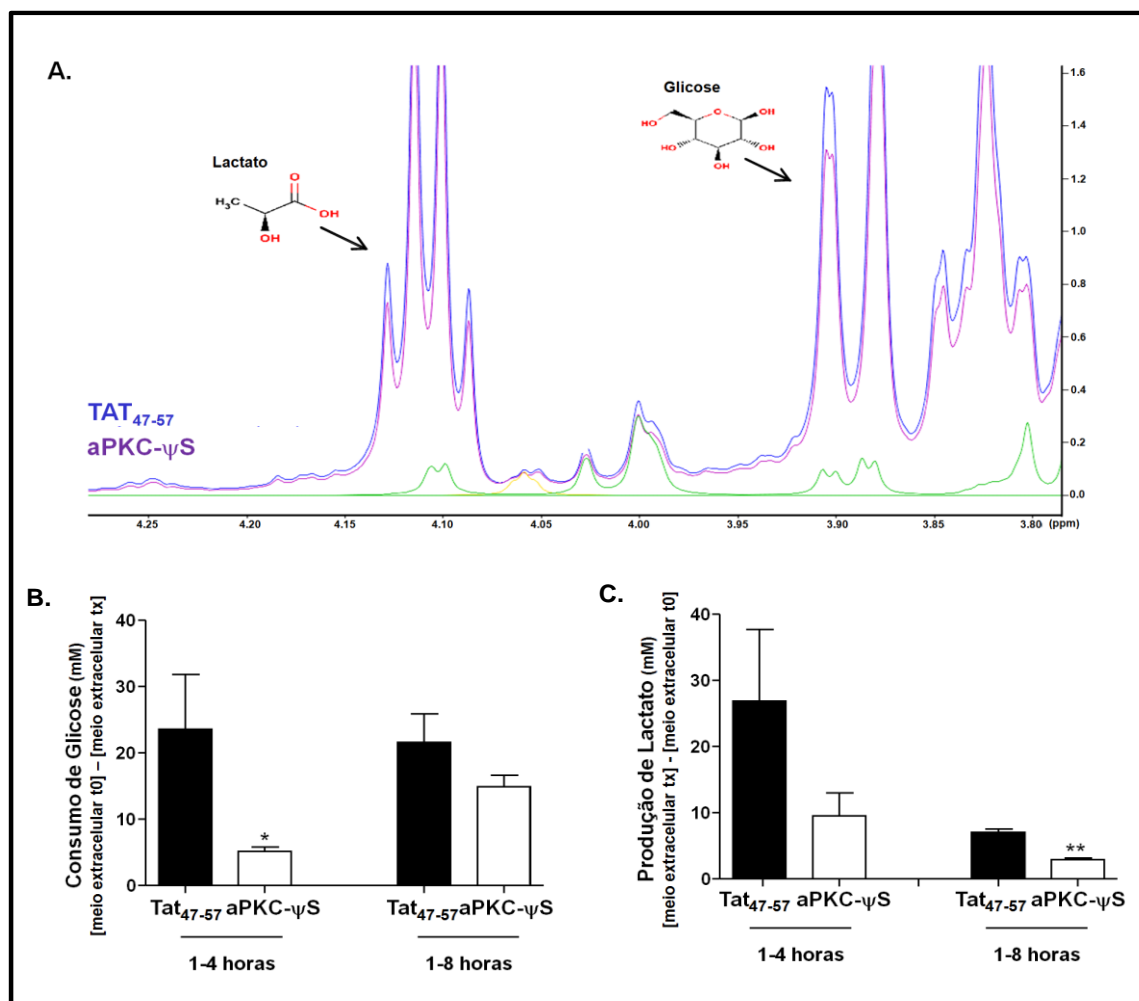


Figura 16: Análise da taxa metabólica da CTE TG2A indiferenciada tratada com o peptídeo inibidor das aPKCs, por RMN-H. A) Espectro obtido a partir da análise por RMN-H foi analisado utilizando o software Chenomx, sendo possível identificar a região referente ao lactato e a glicose, indicado na figura. A concentração foi obtida pela adição de CSI, como descrita nos Materiais e Métodos. A linha em azul indica o espectro do meio de cultura contendo as células tratadas com o peptídeo carreador Tat₄₇₋₅₇, e a linha em rosa indica o espectro do meio de cultura contendo as células tratadas com o peptídeo aPKC_{ψS}. B) Consumo de glicose observado no intervalo entre 1-4 ou 8 horas de tratamento. C) Produção de lactato observada no intervalo entre 1-4 ou 8 horas. Análises realizadas a partir de triplicatas biológicas; * p < 0.05; ** p < 0,005; teste t.

Esses dados corroboram a análise realizada pelo Bioprofile®, bem como os ensaios de atividade da enzima Lactato Dedidrogenase, descrita anteriormente (Figura 13). As células E14TG2A, indiferenciada, após o tratamento com o peptídeo inibidor das aPKCs apresentam sua taxa metabólica alterada, reduzindo o consumo de glicose, como descrito em outros trabalho (Bandyopadhyay G. *et al.*, 2004), a produção de lactato e consequentemente sua taxa fermentativa.

4.1.4.2. Análise da atividade mitocondrial

Com o propósito de confirmar a relevância da atividade das aPKCs na modulação bioenergética celular, o consumo de oxigênio das CTE E14TG2A, indiferenciada, foi avaliado (Figura 18). Utilizando o equipamento Seahorse, capaz de medir a concentração de O_2 (pMol) em diferentes intervalos de tempo, a linhagem celular E14TG2A, indiferenciada, foi tratada por três horas como os peptídeo carreador controle, TAT₄₇₋₅₇, e com o peptídeo aPKC- ψ S, na concentração de 500 nM, seguido da adição de oligomicina (inibidor da ATPsintase), na concentração de 1 μ M, de FCCP (desacoplador), na concentração de 500 nM e por fim antimicina (inibidor do complexo III), na concentração de 1 μ M (Figura 17).

Como pode ser observado pela figura 17, o consumo basal de oxigênio, correspondente a fase inicial de tratamento (primeiras três horas), foi maior na linhagem E14TG2A tratada com o inibidor das aPKCs. A diferença no consumo de oxigênio se torna significativa após a adição de oligomicina e FCCP, sendo, portanto, possível observar um aumento da atividade mitocondrial nas células que foram tratadas com o peptídeo aPKC- ψ S. A adição de antimicina permite inferir que a diferença no consumo de O_2 é devido a diferenças na atividade mitocondrial. A partir desses resultados foi possível concluir que o tratamento com o inibidor das aPKCs induziu um aumento da capacidade respiratória total.

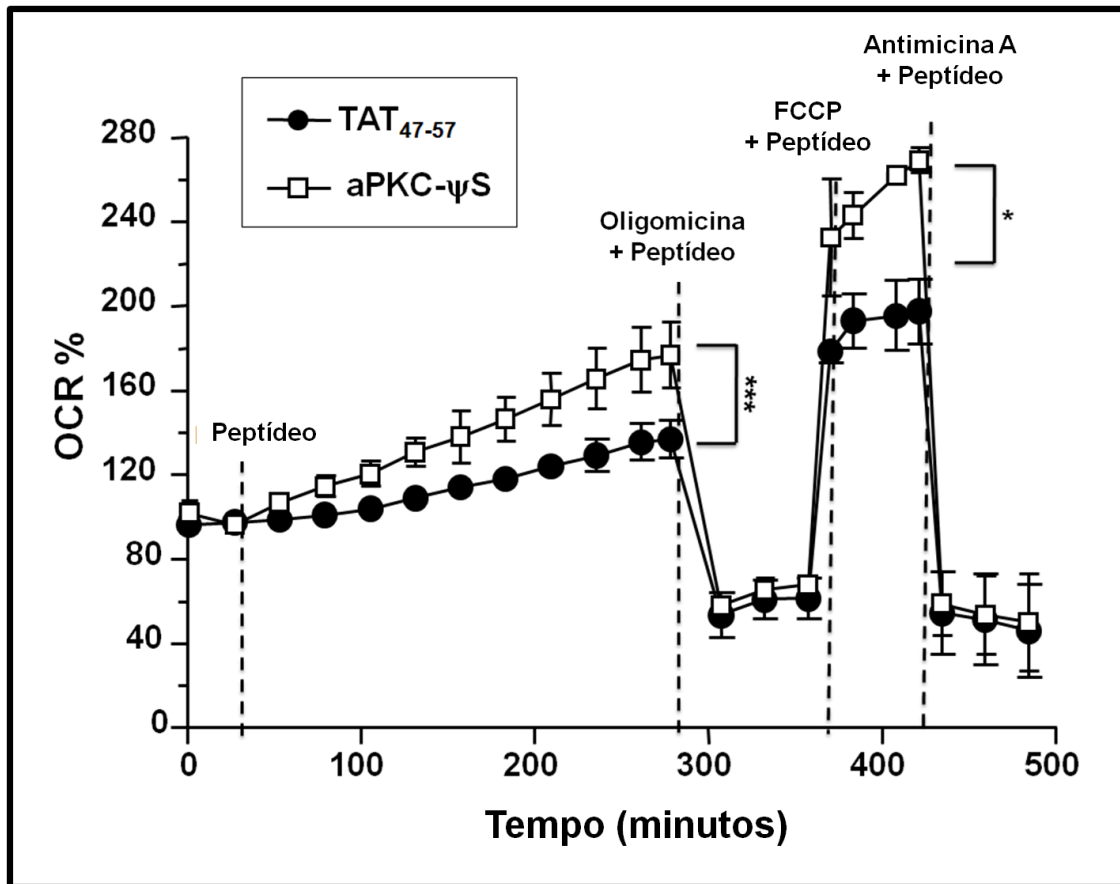


Figura 17: O consumo de oxigênio após o tratamento das em CTE indiferenciada, com o peptídeo aPKC-ψS. CTE E14TG2A indiferenciada foi plaqueada na concentração de 9×10^4 células por poço, após 18 horas, o meio foi removido, os poços foram lavados 1x com tampão salino e adicionado meio DMEM sem bicarbonato. A placa foi deixada por 1h em estufa sem CO_2 a 37°C e em seguida o consumo de oxigênio foi lido no aparelho Seahorse. As células foram tratadas com peptídeo inibidor das aPKCs e com o peptídeo carreador (500 nM), oligomicina ($1 \mu\text{M}$), FCCP (500 nM) e antimicina ($1 \mu\text{M}$), o consumo de oxigênio estão indicados no gráfico. Análises realizadas a partir de triplicatas biológicas. * $p < 0.05$; *** $p < 0,0005$; teste *t*.

Os resultados apresentados nesta etapa da tese indicam que as aPKCs são capazes de modular importantes proteínas da via glicolítica, como a PKM, a LDH e ENO, além de fosforilar diretamente a PKM2. Essa modulação está diretamente relacionada a atividade da lactato desidrogenase, a captação de glicose, produção de lactato e alteração da respiração celular e atividade mitocondrial.

4.1.5. Caracterização funcional da aPKC na manutenção do citoesqueleto e polarização celular

O segundo importante grupo de proteínas identificadas pelo fosfoproteoma (22%) foram às proteínas envolvidas na manutenção do citoesqueleto, adesão celular e transporte de proteínas, destacadas na tabela 4. O envolvimento das aPKCs na modulação da polarização e adesão celular é bem descrito (Chen J. *et al*, 2013) e a identificação desse segundo grupo de proteínas reforça a confiabilidade dos dados obtidos a partir desse proteoma.

Tabela 4: Identificação das proteínas estruturais que sofreram redução da fosforilação após o tratamento com o peptídeo aPKC- ψ S

ID.	Proteína	Intensidade Fosforilação		ANOVA	Localização	Função
		TAT ₄₇₋₅₇	aPKC- ψ S			
2	Golgi resident protein GCP60	1,92	1,41	3,79E-02	M	Transporte de proteína
24	T-complex protein 1 subunit beta	1,08	-	2,28E-01	C	Transporte de proteína
25	Hsc70	1,08	-	2,35E-01	C/N	Chaperona
27	alpha-tubulin	4,34	2,52	3,02E-03	C	Citoesqueleto
39	Actin-binding Rho-activating	1,11	-	2,08E-01	C	Transporte de proteína
44	Hsc70-interacting protein	3,89	1,67	2,13E-02	C	Chaperona
45	Rab GDP dissociation inhibitor	1,11	-	1,40E-01	C	Transporte de proteína
53	Beta-centractin	1,05	-	1,19E-01	C	Citoesqueleto
57	ATPase Asna1	1,04	-	1,18E-01	C/N	Chaperone
61	Septin-2	2,30	-	6,95E-03	C	Citoesqueleto
79	GTP-binding nuclear protein Ran	1,76	-	2,41E-02	C/N	Transporte de proteína
83	Hsp27	2,95	-	2,31E-03	C/N	Citoesqueleto
84	TPT1	1,10	-	1,32E-01	C	Citoesqueleto
85	Kinetochore protein Spc24	1,00	-	1,16E-01	N	Citoesqueleto
88	Rho GDP dissociation inhibitor	0,08	-	5,00E-02	C	Transporte de proteína
92	Tubulin beta-2C chain	0,38	0,31	6,50E-01	C	Citoesqueleto
94	Tubulin beta-5 chain	0,82	0,64	3,14E-01	C	Citoesqueleto
96	HSC70	1,40	1,17	1,00E-01	C/N	Chaperona

Com o objetivo de investigar a importância das aPKCs na manutenção do citoesqueleto foi realizado uma análise preliminar da interação proteína-proteína, entre os alvos identificados no proteoma por apresentarem redução da fosforilação na presença do inibidor das aPKCs. A partir da utilização do banco de dados STRING (<http://string-db.org/>), que utiliza informações de interações proteína-

proteína humanas previamente descritas (Figura 18), foi possível observar que oito proteínas, descritas por reduzir a fosforilação após a inibição das aPKCs, foram capazes de interagir entre si. Assim como, que as aPKCs podem interagir diretamente com algumas destas proteínas, como por exemplo a RhoGDI (linhas contínuas) ou possivelmente interage com as outras proteínas identificadas (linhas tracejadas). As linhas tracejadas marcam interações diretas que devem ser validadas. De qualquer maneira, com exceção da RHOA, as proteínas demarcadas na rede de interação foram identificadas no estudo de proteômica e estão envolvidas o processo de adesão célula-célula descrito anteriormente, mediado pelas aPKCs (Liu D. *et al.*, 2010).

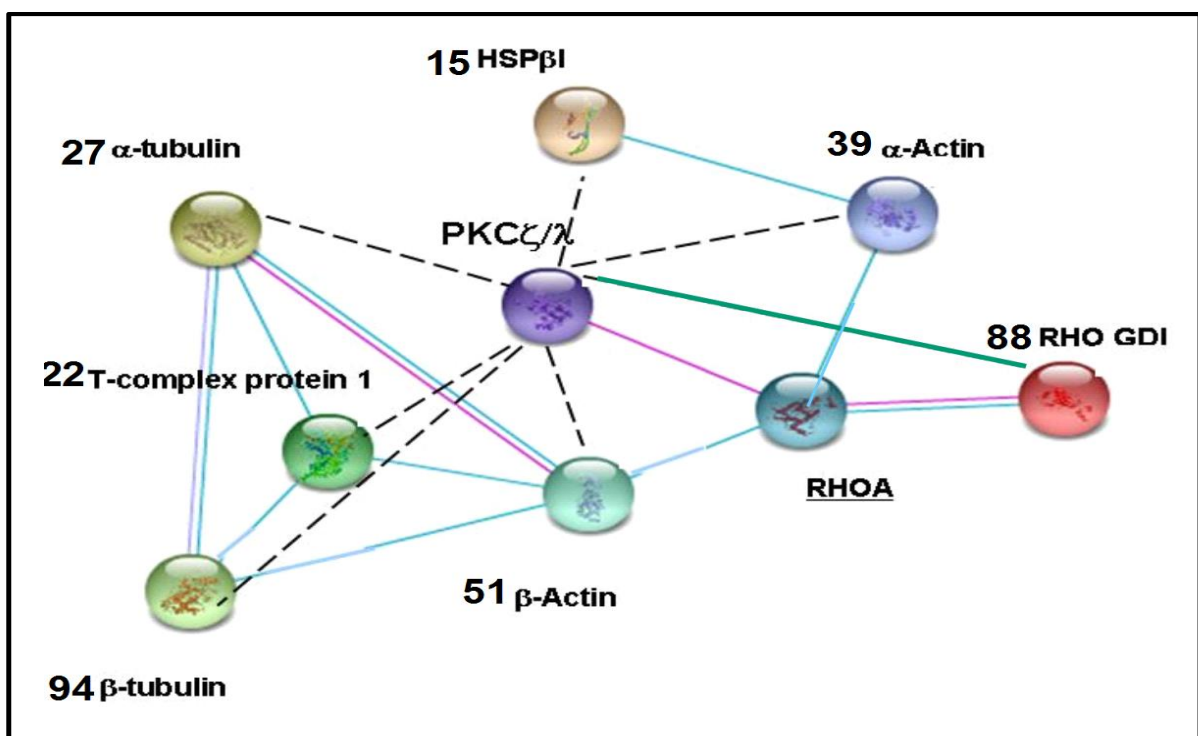


Figura 18: Interação entre os substratos (diretos ou indiretos) das aPKCs detectados por fosfoproteômica. Análise da interação entre as aPKCs com algumas proteínas identificadas no estudo de fosfoproteômica após o tratamento com o peptídeo inibidor aPKC-ψS. As linhas tracejadas indicam os substratos hipotéticos das aPKCs, sendo necessário avaliar se são substratos diretos ou indiretos. Linhas contínuas são interações já descritas anteriormente encontradas pelo programa pelo programa STRING (<http://string-db.org/>) usando um banco de dados de interações proteína-proteína de humanos.

Dentre as proteínas identificadas nesse grupo, aproximadamente 31% está envolvida com transporte de proteína e polarização celular. A RhoGDI (Figura 19) foi identificada por Kuribayashi e colaboradores, como um substrato direto da PKC ζ , esta fosforilação inibe a atividade dessa proteína, permitindo consequentemente a ativação da Rho, e alteração em importantes vias como a polarização e adesão celular (Kuribayashi *et al.*, 2007).

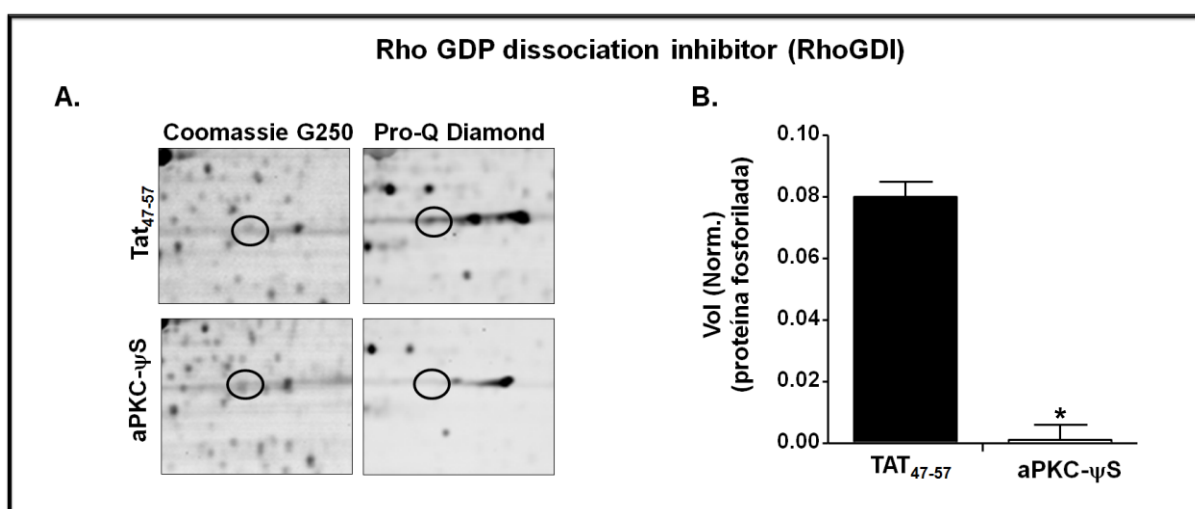


Figura 19: RhoGDI apresentou a sua fosforilação reduzida após a inibição das aPKCs. A linhagem celular E14TG2A foi tratada com 500 nM do peptídeo controle, TAT₄₇₋₅₇, e do peptídeo inibidor aPKC-ψS, por 15 minutos. A) *Spot* referente a RhoGDI em destaque. Géis de eletroforese bidimensional foram corados com corante ProQDiamond e com Coomassie Coloidal. B) Análise quantitativa da média normalizada de quatro experimentos independentes, comparando o volume do *spot* fosforilado entre os géis controle, tratados com TAT₄₇₋₅₇, com os géis tratados com o peptídeo aPKC-ψS. Géis representativos de quadruplicata experimental; $p < 0,05$; teste t.

Como pode ser observado pela tabela 3, algumas isoformas de tubulina sofreram redução da fosforilação após o tratamento com aPKC-ψS. Como apresentado na figura 20, α -tubulina tem a sua fosforilação reduzida após a inibição das aPKCs, indicando que esta proteína é também um possível substrato dessa subfamília das PKCs.

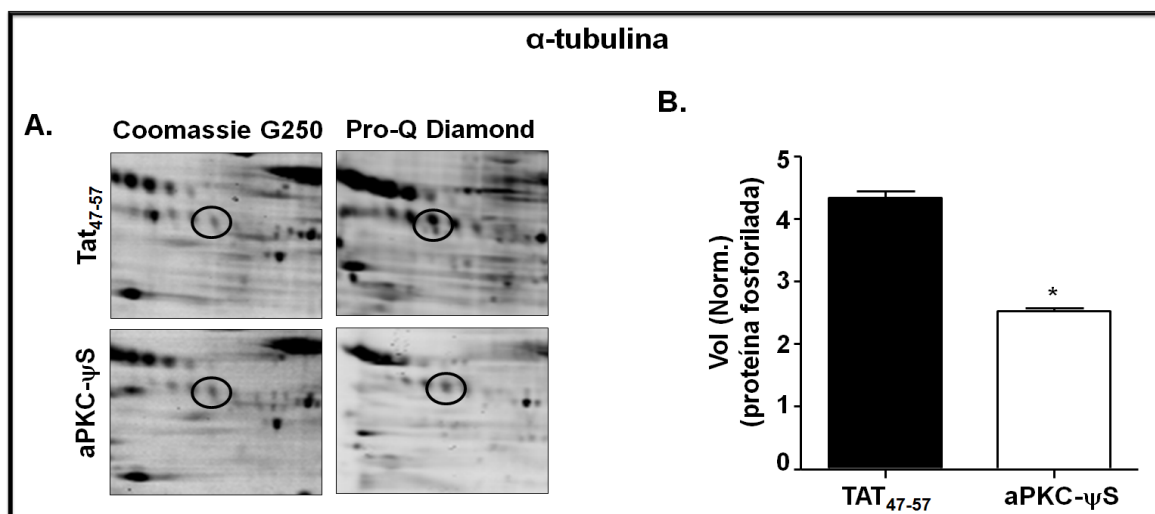


Figura 20: α -tubulina sofre redução da fosforilação após inibição das aPKCs em CTE indiferenciada. A linhagem celular E14TG2A foi tratada com 500 nM do peptídeo controle, TAT₄₇₋₅₇, e do peptídeo inibidor aPKC- ψ S, por 15 minutos. A) *Spot* referente a α -tubulina em destaque. Géis de eletroforese bidimensional foram corados com corante ProQDiamond e com Coomassie Coloidal. B) Análise quantitativa da média normalizada de quatro experimentos independentes, comparando o volume do *spot* fosforilado entre os géis controle, tratados com TAT₄₇₋₅₇, com os géis tratados com o peptídeo aPKC- ψ S. Géis representativos de quadruplicata experimental, * $p < 0,05$; teste t.

Alguns trabalhos descrevem que as PKC ζ/λ são capazes de interagir com tubulina (Garcia-Rocha *et al.*, 1997; Banan A. *et al.*, 2005). Garcia-Rocha e colaboradores observaram através de cromatografia de afinidade que tubulina é capaz de interagir com PKC ζ , possivelmente a partir da região do pseudossustrato (Garcia-Rocha *et al.*, 1997). Em 2005, Banan e colaboradores, observaram que a PKC λ ativa é capaz de despolimerizar tubulina. Contudo, nenhum desses trabalhos indicam se aPKCs são capazes de fosforilar diretamente α -tubulina.

Costa-Junior e colaboradores, em 2010, haviam observado que α -tubulina sofre também uma redução na fosforilação na presença do peptídeo inibidor da PKC β I (β IV5-3), em CTE E14TG2A, indiferenciada (Costa-Junior *et al.*, 2010). A fim de compreender a relevância funcional da fosforilação da α -tubulina por diferentes

isoenzimas das PKCs, foi realizado ensaios de imunoflorescência como próxima etapa desta tese.

4.1.6. α -tubulina como alvo das aPKCs e da PKC β I

Como pode ser observado na figura 21, durante a interfase, a α -tubulina está co-localizada majoritariamente com as PKC ζ/λ , ao passo que, nas células em mitose, a co-localização com as PKCs atípicas não é tão marcante quanto como observado com a PKC β I, como está indicado pelas setas brancas. Desta forma as diferentes isoenzimas das PKCs deve fosforilar a α -tubulina em diferentes momentos do ciclo celular.

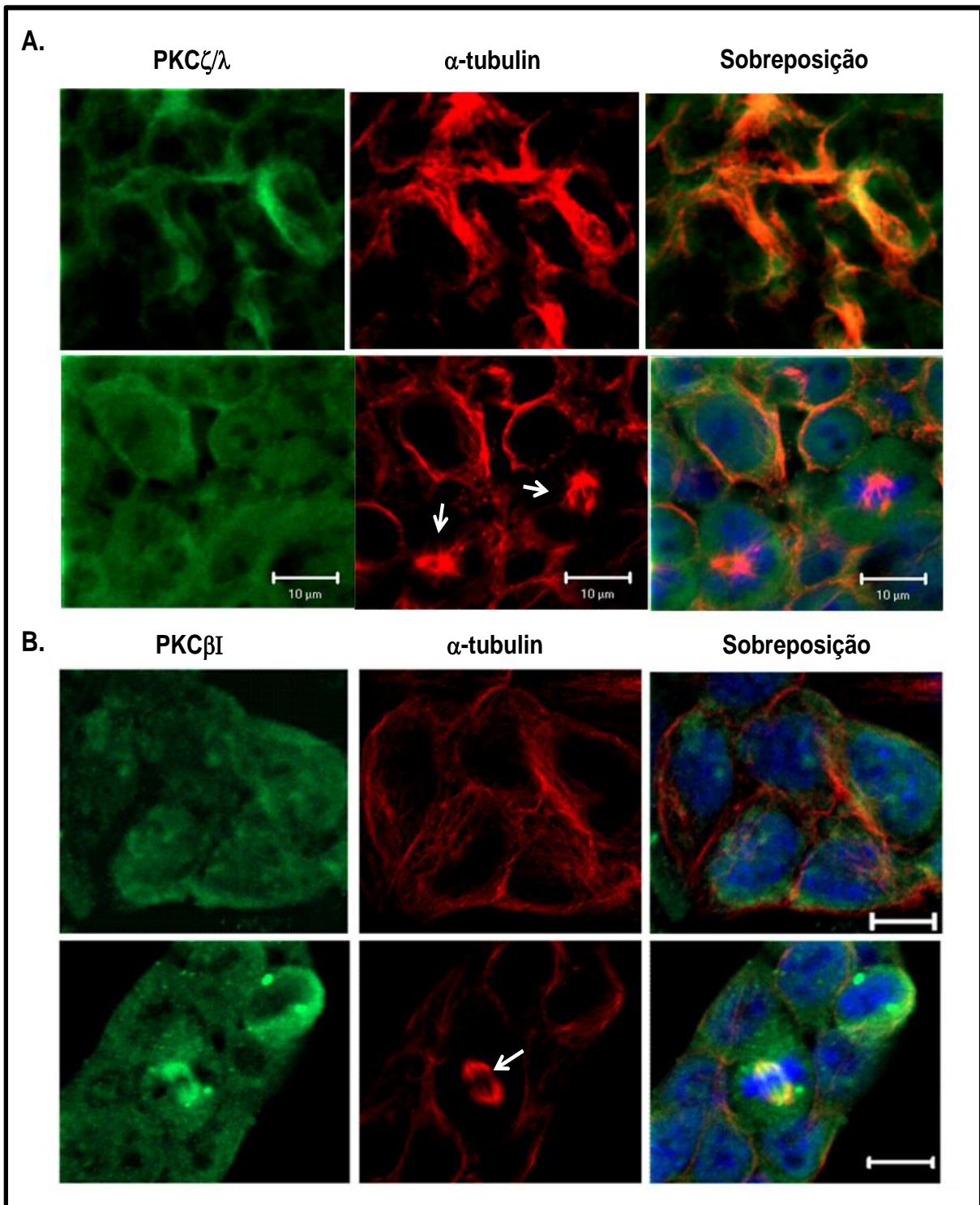


Figura 21: α -tubulina se co-localiza com as aPKCs e PKC β I em diferentes estágios do ciclo celular. As aPKCs se co-localizam com a α -tubulina durante a interfase, enquanto que a PKC β I se co-localiza com a α -tubulina durante a mitose, na linhagem celular E14TG2A, indiferenciada. As setas indicam as células em mitose. A análise da co-localização foi realizada por microscopia confocal, PKC ζ/λ (A) e PKC β I (B) foi detectada após imunofluorescência utilizando anti-PKC ζ/λ e anti-PKC β I e anti-rabbit Alexa 488; anti- α -tubulina e anti-mouse Alexa 555 em vermelho e o núcleo em azul marcado com DAPI. As barras em branco indicam distância de 10 μ m.

A co-localização entre α -tubulina e a PKC β I foi observada durante a mitose em outras linhagens celular, como a Hek 293T e o blastocisto murino (Figura 22). Esses resultados indicam que de fato a PKC β I co-localiza com o microtúbulo durante a divisão celular.

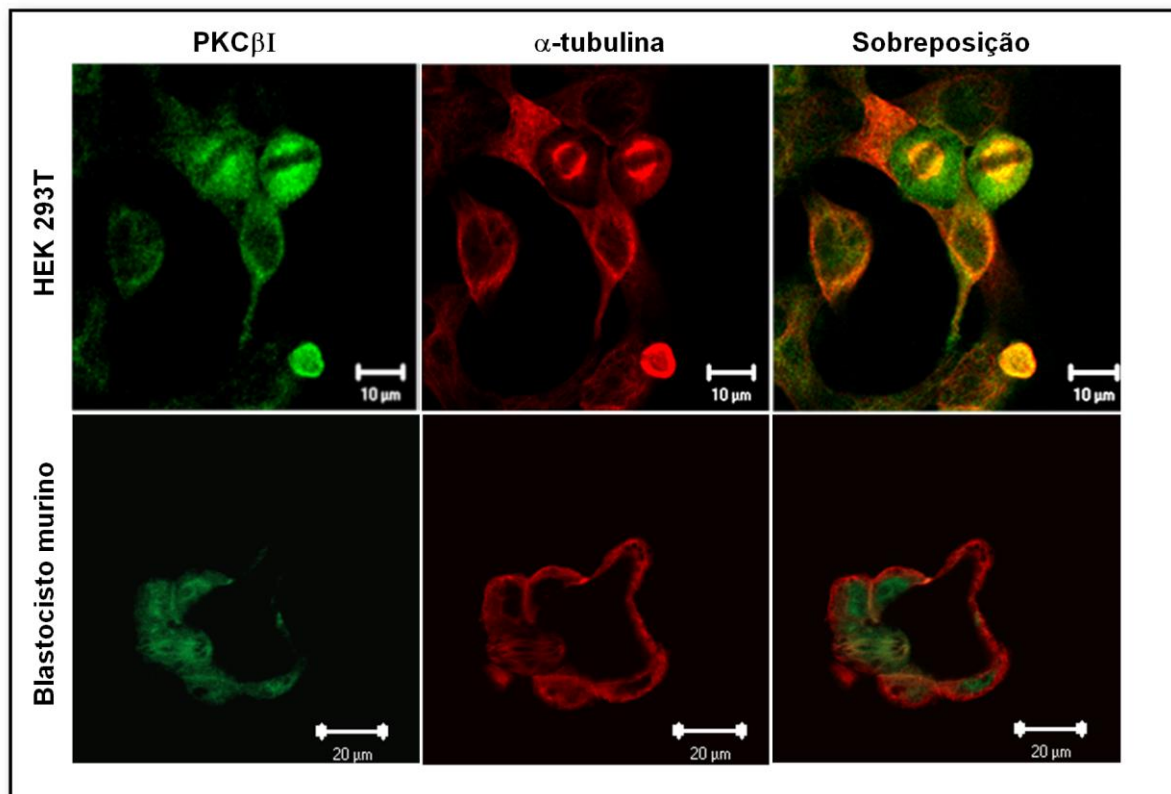


Figura 22: α -tubulina também se co-localiza com as PKC β I durante a mitose em tipos celulares. A PKC β I co-localiza com a α -tubulina durante a mitose, na linhagem celular HEK 293T e no blastocisto murino. A análise da co-localização foi realizada por imunofluorescência e microscopia confocal, PKC ζ/λ (A) e PKC β I (B) foi detectada após imunofluorescência utilizando anti-PKC ζ/λ e anti-PKC β I e anti-rabbit Alexa 488; anti- α -tubulina e anti-mouse Alexa 555 em vermelho

Poucos estudos descrevem sítios de fosforilação em α -tubulina, apesar de alguns trabalhos sugerirem que esta modificação pós-traducional é importante para o controle da dinâmica do microtúbulo (Janke C. & Bulinski J.C., 2011). A importância da redução da fosforilação da α -tubulina, em CTE E14TG2A, após o tratamento com o peptídeo inibidor da PKC β I foi estudada durante o desenvolvimento dessa tese e compreende a segunda parte dos resultados.

4.2. Estudo da modificação pós-traducional de α -tubulina pela PKC β I e a sua importância funcional.

4.2.1. Identificação da α -tubulina como substrato direto da PKC β I *in vitro*

O ensaio de fosforilação *in vitro*, desenvolvido em colaboração com Dra Daria Mochly-Rosen do *Department of Chemical and Systems Biology*, (Stanford University School of Medicine, CA, EUA), foi realizado com o objetivo de avaliar se α -tubulina é substrato direto da PKC β I. GST- α -tubulina recombinante (~ 70 kDa) e a isoenzima da PKC recombinante, GST-PKC β I (~ 110 kDa) foram utilizadas na ausência e na presença dos agentes ativadores das PKCs, cálcio e fosfolipídios (PS e DAG), como doador de fosfato foi utilizado o [³²P]ATP (Figura 23).

Como pode ser observado na coluna dois da figura 23, houve um aumento na intensidade da banda referente a α -tubulina-GST (~72 kDa), em presença dos ativadores da PKC β I. Cabe destacar, que a auto-fosforilação de GST-PKC β I pode ser observada na banda de ~ 110 kDa, intensificada na segunda e terceira coluna, pela presença dos seus ativadores. A partir desse resultado foi possível concluir que a PKC β I é capaz de fosforilar diretamente a α -tubulina *in vitro*.

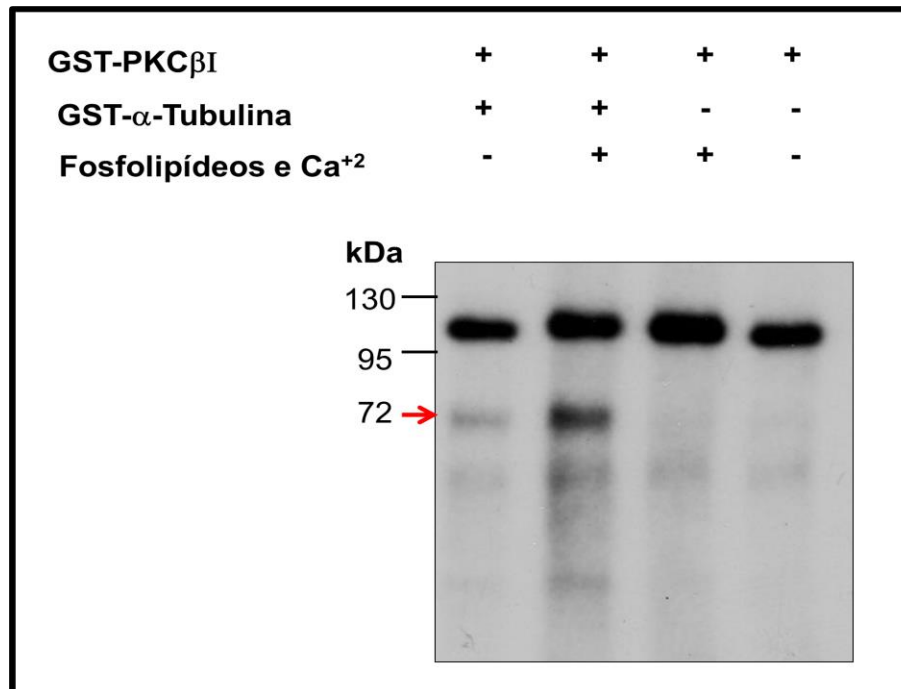


Figura 23: α -tubulina é substrato direto da PKC β I. Ensaio de fosforilação *in vitro* utilizando [³²P]ATP, para avaliar a fosforilação da α -tubulina pela PKC β I. Autoradiografia do gel feito das reações de fosforilação *in vitro* da α -tubulina-GST (~70 kDa) pela PKC β I-GST na presença e ausência do íon Ca⁺² e dos fosfolipídeos, PS e DAG, agentes ativadores da PKC β I.

Sabendo que a α -tubulina é substrato direto da PKC β I, a identificação do sítio de fosforilação de α -tubulina foi realizada em uma *facility* de espectrometria de Massas da Universidade de Stanford na Califórnia. Utilizando tubulina purificada bovina que foi fosforilada *in vitro* pela PKC β I. A figura 24 indica o espectro observado, onde o resíduo T253 sofre um aumento no peso molecular de ~ 80 Da (HPO₃) (Figura 24B).

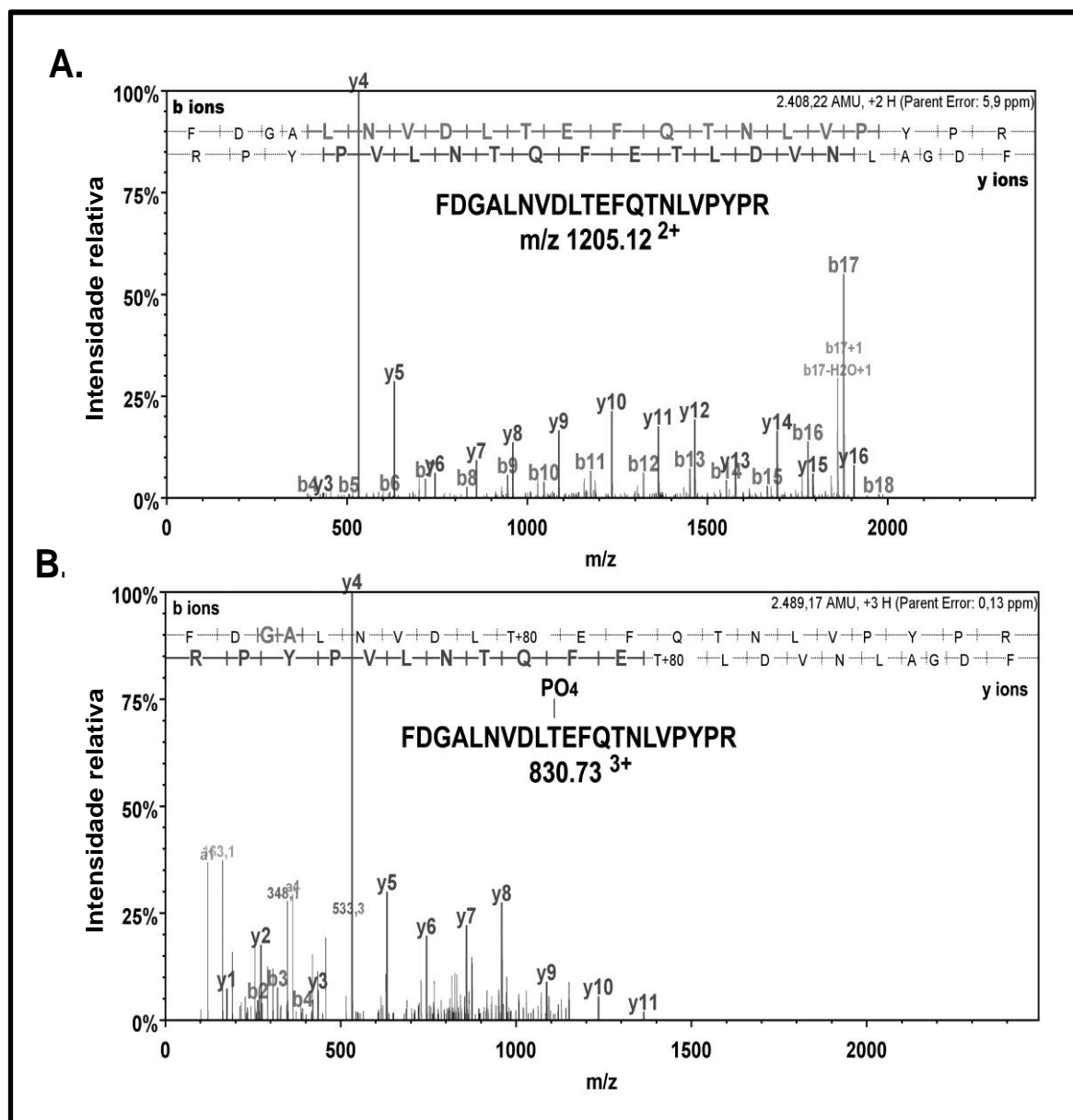


Figura 24: Identificação do sítio de fosforilação de α -tubulina pela PKC β I utilizando espectrometria de massas. α -tubulina purificada de cérebro bovino foi fosforilada *in vitro* pela PKC β I na presença dos ativadores fosfolípido e Ca $^{2+}$. α -tubulina digerida por tripsina e seus peptídeos foram submetidos a análise por LC/MS/MS. A) Amostra de α -tubulina não fosforilada, espectro MS/MS do peptídeo FDGALNVDLTEFQTNLVPYPR de α -tubulina (massa monoisotópica do peptídeo não protonado = 2408,22 Da). B) Amostra de α -tubulina fosforilada pela PKC β I, espectro MS/MS do mesmo peptídeo fosforilado na T253 (massa monoisotópica do peptídeo não protonado = 2489,17 Da).

4.2.2. T253 como um novo sítio consenso estrutural da PKC

Como apresentado na introdução, o ancoramento das PKCs ao seu substrato ocorre em regiões consenso formado pela seqüência R/R-R/K-X-S/T. Assim, o substrato precisa ter aminoácidos com carga positiva adjacentes ao seu sítio de fosforilação para ocorrer a interação com o sítio catalítico da quinase.

Surpreendentemente, os resíduos adjacentes a T253, (Figura 24), não são aminoácidos positivos que possibilitem o ancoramento da PKC β I. Entretanto ao avaliar a estrutura terciária da α -tubulina foi possível observar aminoácidos básicos (K163 e K164), linearmente distantes a T253, se aproxima deste sítio de fosforilação (Figura 25).

Como pode ser observado na figura 25, a T253 (magenta) está próxima dos aminoácidos K163 e K164, sendo a distância entre os C α (T253-K164) de 3.5 Å. Esta proximidade é similar à observada no peptídeo inibidor de PKC/A, (PKI), [PDB ID 1FMO Löwe J. *et al.*, 2001]. PKI pode ser considerado como um falso substrato atuando de maneira análoga ao pseudossustrato. Em sua seqüência, a presença da alanina substitui os resíduos de serina e treonina dos substratos das quinases e permite que o peptídeo iniba competitivamente sua atividade. Como falso substrato, PKI contém uma Arginina a 3.0 Å da Alanina, C α de 3 Å (R19-A16), indicado na parte superior da figura 25.

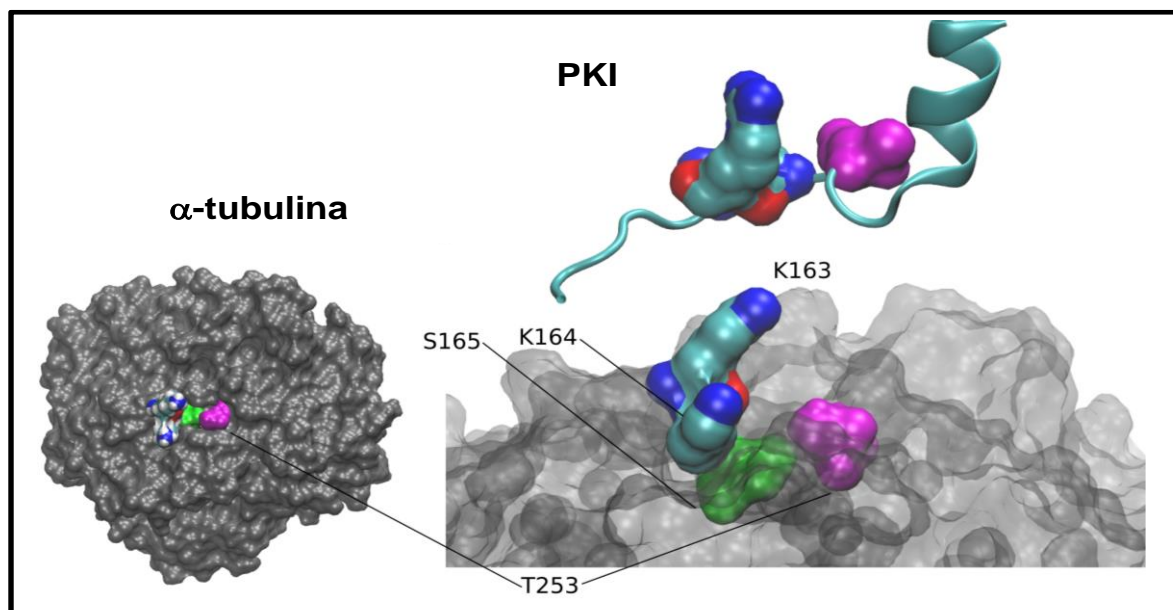


Figura 25: Localização da T253 na estrutura terciária de α -tubulina. Utilizando informações contidas no PDB [ID: 1JFF (Löwe J. *et al.*, 2001)] foi determinada a localização de T253 na estrutura terciária de α -tubulina. Na parte inferior direita da figura está a visão detalhada dos aminoácidos adjacentes ao sítio de fosforilação T253. Em verde S165 descrita por Abeyweera T.P. e colaboradores como um putativo sítio de fosforilação (Abeyweera T.P. *et al.*, 2009), T253 em magenta e K163 e K164 estão em destaque na figura. Na parte superior direita, a organização estrutural de PKI, um peptídeo inibidor das PKA/C [PDB ID 1FMO (Löwe J. *et al.*, 2001)] que apresenta uma alanina (magenta), como substituinte ao sítio de fosforilação a uma distância muito similar a T253.

A similaridade na distância entre os $C\alpha$ da PKI (R19-A16) e da α -tubulina (K163-T253) permite concluir que K164 pode atuar como R/K na sequência consenso linear de PKC, possibilitando o ancoramento de α -tubulina ao seu sítio catalítico. Esses resultados indicam pela primeira vez que sequências consenso da PKC podem ser formados também a partir da estrutura terciária das proteínas, portando considerar a forma terciária dos substratos como uma das alternativas de predição do sítio de fosforilação pode ser importante.

4.2.3. Estudos de dinâmica molecular indicam a importância da fosforilação de T253

Ao realizar a análise de modelagem molecular utilizando a estrutura do heterodímero α - β -tubulina foi possível observar que T253 está localizado na face de crescimento do polímero, próximo a troca GDP/GTP em β -tubulina (Figura 26). Cabe destacar, que é nesta região, a face positiva de crescimento do polímero, que ocorre a adição dos heterodímeros de tubulina (Wang H.W. & Nogales E., 2005) e a conversão do GTP em GDP, um dos mecanismos responsáveis pela desestabilização do microtúbulo (Valiron O. *et al.*, 2010). Considerando que a fosforilação do resíduo T253 de α -tubulina possa ser capaz de interagir com a interface entre α - e β -tubulina (Figura 26), e que estudos anteriores sinalizavam a importância de modificações pós-traducional como importantes reguladores da dinâmica e estabilidade do polímero (Westermann S. & Weber K., 2003), a investigação da fosforilação deste resíduo tornou-se um foco desta tese.

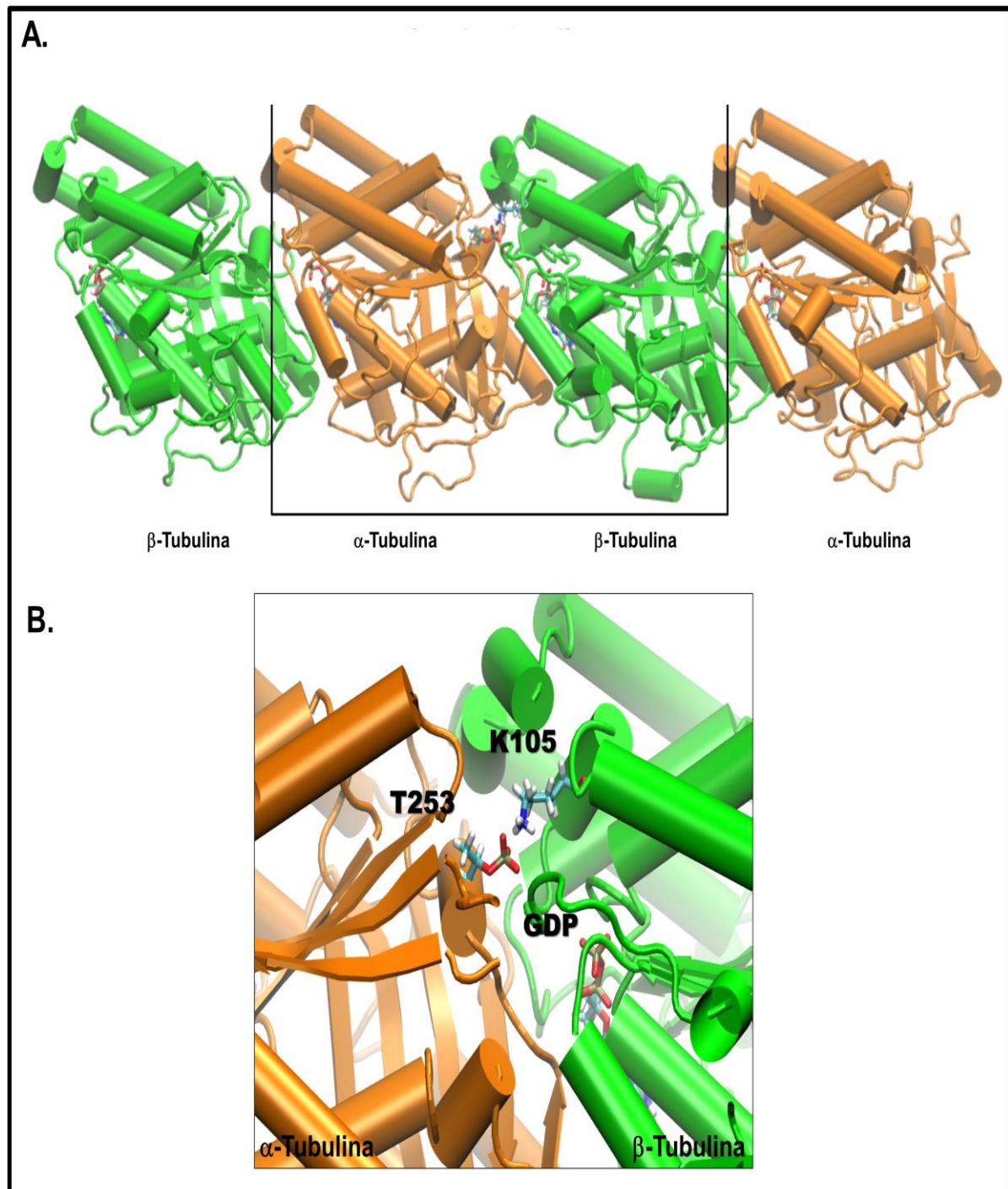


Figura 26: T253 de α -tubulina está localizada na interface de interação entre α - e β -tubulina. A) Utilizando informações contidas no PDB [ID: 1JFF (Löwe J. *et al.*, 2001)] e ferramentas de modelagem molecular foi possível identificar a localização de T253 na estrutura terciária de α -tubulina e observar a interação desta com β -tubulina. B) Visão detalhada da interface de interação destacando T253 em α -tubulina, GDP e K105 da β -tubulina.

Como próxima etapa, estudos de dinâmica molecular foram realizados com o intuito de investigar se a fosforilação de T253 seria importante para a interação da α -tubulina com a β -tubulina, visto que, como dito anteriormente, esta fosforilação encontra-se na interface entre as duas proteínas. Como primeiro resultado dessa análise, foi possível observar que T253 da α -tubulina fosforilada, é capaz de interagir com K105 da β -tubulina (Figura 26B). K105 é altamente conservado em diferentes espécies (Figura 27), indicando possivelmente a sua relevância para a estabilização do microtúbulo.

K105 de β -tubulina		beta-tubulina	
seq5	-----FVFGQSGAGNNWAKGHYTEGAELVDSVLDL-	30	
61	PRAILVDLEPGTMDSVRSRSGPFGQIFRPDNFVFGQSGAGNNWAKGHYTEGAELVDSVLDVV	120	Q13885 TBB2A_HUMAN
61	PRAILVDLEPGTMDSVRSRSGPFGQIFRPDNFVFGQSGAGNNWAKGHYTEGAELVDSVLDVV	120	Q7TMM9 TBB2A_MOUSE
61	PRAILVDLEPGTMDSVRSRSGPFGQIFRPDNFVFGQSGAGNNWAKGHYTEGAELVDSVLDVV	120	D0VWY9 D0VWY9_SHEEP
61	PRAILVDLEPGTMDSVRSRSGPFGQIFRPDNFVFGQSGAGNNWAKGHYTEGAELVDSVLDVV	120	P02554 TBB_PIG
61	PRAILVDLEPGTMDSVRSRSGPFGQIFRPDNFVFGQSGAGNNWAKGHYTEGAELVDSVLDVV	120	P09203 TBB1_CHICK
61	PRAVLVDLEPGTMDSVRSRSGPFGQIFRPDNFVFGQSGAGNNWAKGHYTEGAELVDSVLDVV	120	Q6P5M9 Q6P5M9_DANRE
61	PRSINVLDLEPGTIDAVRNSAIGNLFRPDNYIFGQSSAGNVWAKGHYTEGAELVDSVMDVI	120	P02557 TBB_YEAST
	: :****.*** *****		

Figura 27: K105 de β -tubulina é conservado em várias espécies. O alinhamento de β -tubulina em várias espécies indica o alto grau de conservação do resíduo K105.

Através da simulação por dinâmica molecular também foi possível observar que a fosforilação de T253 pode influenciar a polimerização da α/β tubulina (Figura 28). A análise da energia de ligação utilizando 150 conformações estruturais dos polímeros de tubulina contendo GDP indicou que a entalpia de interação foi de 668 kcal/mol para o heterodímeros contendo α -tubulina selvagem (Figura 28 - histograma azul) e 763 kcal/mol para os polímeros contendo a fosforilação em T253 de α -tubulina (Figura 28 - histograma vermelho). Estes resultados sugerem que um aumento de ~100 kcal/mol na interface de crescimento do polímero pode ocorrer devido a esta modificação pós-traducional.

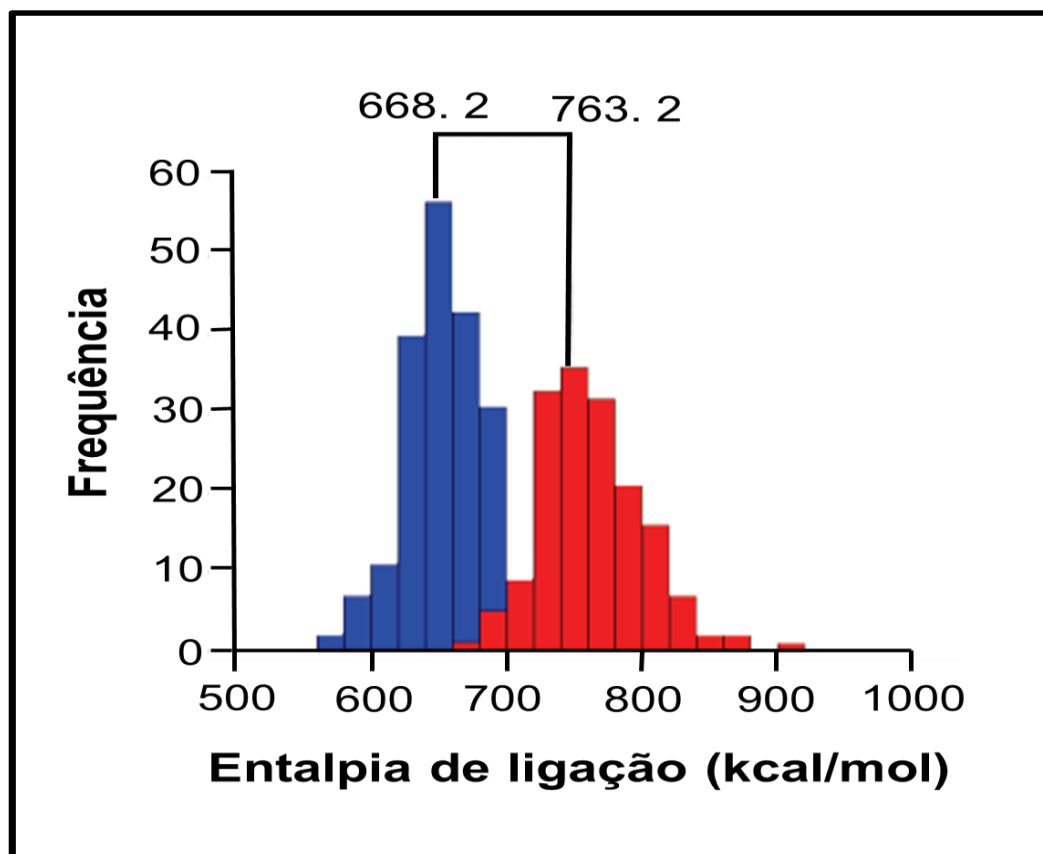


Figura 28: A fosforilação de T253E é capaz de aumentar a entalpia de ligação do polímero. Utilizando um estudo de dinâmica molecular e análise da energia de ligação foi demonstrado que quando T253 é fosforilada há um aumento da interação entre α - e β -tubulinas (histograma em vermelho), quando comparada a entalpia de ligação entre α - e β tubulina quando α -tubulina não é fosforilada (histograma em azul). Os números indicam a média dos valores da entalpia de ligação de cada modelo em kcal/mol (p value $< 2.2 \times 10^{-16}$).

4.2.4. A importância da fosforilação de α -tubulina pela PKC β I na cinética de polimerização do microtúbulo

Como próxima etapa do desenvolvimento desta tese, foi observado o efeito dessa modificação pós-traducional na dinâmica de polimerização do microtúbulo. Tubulina purificada de cérebro bovino foi fosforilada pela PKC β I, na presença e ausência de seus co-fatores, e sua cinética de polimerização foi avaliada.

Como pode ser observado na Figura 29, no intervalo de tempo de 0 a 500 segundos, a inclinação da curva de polimerização de tubulina foi maior na presença

de PKC β I ativa, quando comparada a tubulina sozinha ou na presença de PKC β I inativa.

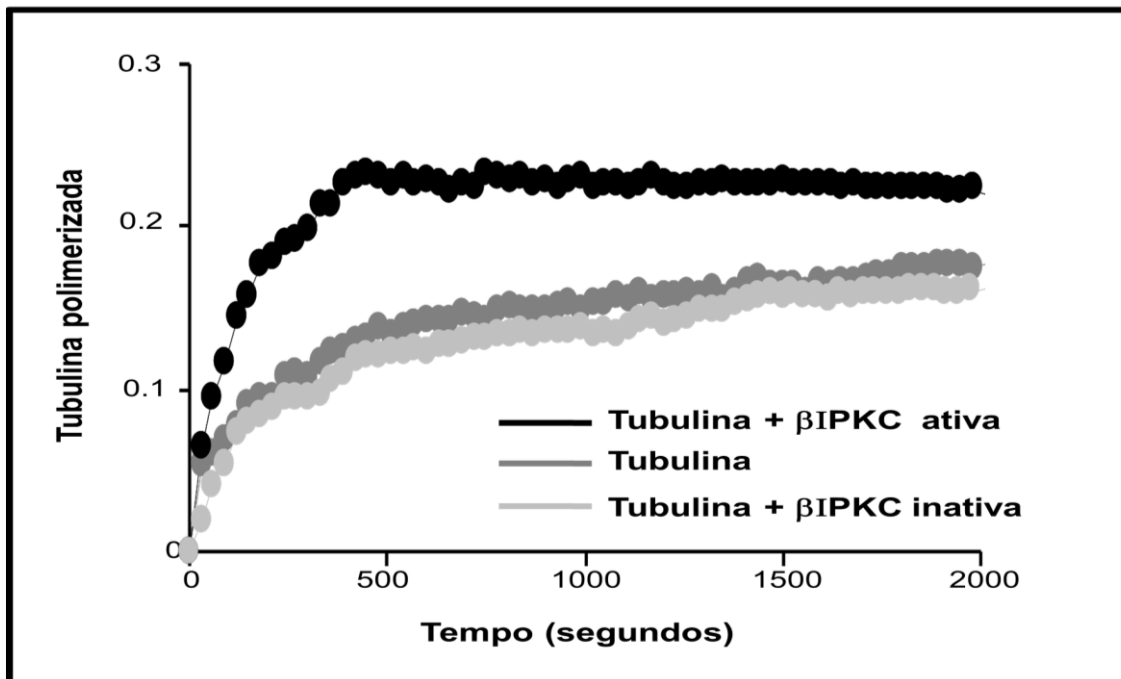


Figura 29: A fosforilação de α -tubulina aumenta a sua taxa de polimerização *in vitro*. Tubulina purificada de cérebro bovino foi utilizada para o ensaio de polimerização do microtúbulo *in vitro*, na presença e na ausência dos ativadores da PKC β I (fosfolipídeos e Ca²⁺). A mudança na absorbância, 340 nm, (correspondente a polimerização da tubulina) foi monitorada por 30 minutos a 37°C. Dado representativo de três experimentos independentes.

Os resultados expostos acima indicam que a fosforilação da tubulina pela PKC β I foi capaz de aumentar a taxa de polimerização da tubulina *in vitro*. Como alternativa para observar se a taxa de polimerização de tubulina em células pode ser dependente da fosforilação mediada pela PKC β I, foi avaliado o efeito da repolimerização de tubulina após o tratamento com nocodazol. Cabe destacar que o nocodazol é um quimioterápico capaz de estimular a hidrólise do GTP, levando conseqüentemente à desestabilização do microtúbulo (Vasquez R.J. *et al.*, 1997).

Para a realização deste experimento, CTE E14TG2A foram tratadas com peptídeo inibidor β IV-5 por 15 minutos e, em seguida, adicionado 500 nM de nocodazol. Após 30 minutos, o meio foi removido rapidamente lavado com PBS e adicionado meio novo, a temperatura ambiente. Após um, três, cinco e dez minutos da adição de meio novo, as células foram fixadas e a re-polimerização da tubulina avaliada por imunofluorescência corando para anti α -tubulina (Figura 30).

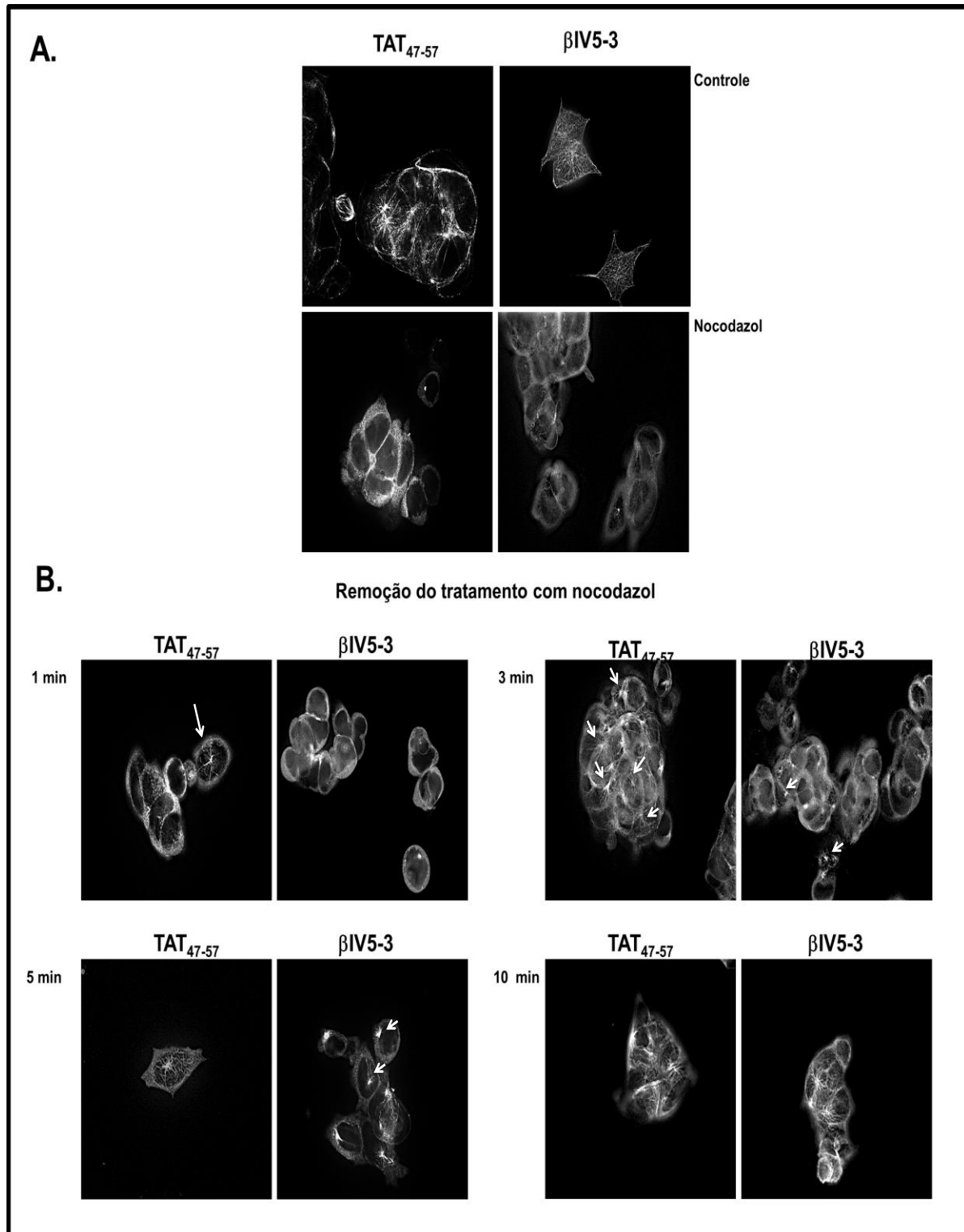


Figura 30: α -tubulina repolimeriza mais lentamente após inibição da PKC β I. A linhagem celular E14TG2A foi tratada previamente com peptídeo β IV1-5 e TAT₄₇₋₅₇, em seguida nocodazol foi adicionado por 30 minutos. A repolimerização da α -tubulina foi observada após a adição de meio novo, as células foram fixadas (PFA 4%) após os intervalos de tempo de três, cinco e dez minutos. α -tubulina endógena foi detectada após imunofluorescência utilizando anti- α -tubulina e *anti-mouse* Alexa 555 em vermelho. Os pontos de início da polimerização da α -tubulina estão indicados pelas setas brancas. As imagens foram obtidas pelo microscópio Nikon Eclipse E600, no aumento de 100X, em seguida foram processadas e deconvolvidas utilizando o programa Huygens Essential.

Os resultados obtidos a partir da figura 30 corroboram com os ensaios de polimerização *in vitro*. Após um minuto de adição de meio novo já é possível observar pontos de nucleação de α -tubulina na condição cuja fosforilação da PKC β I não foi inibida, ou seja, nas células E14TG2A tratadas com o peptídeo carreador controle, TAT₄₇₋₅₇. Ao passo que, nas células tratadas com β IV5-3, inibidor da PKC β I, esses pontos são somente observados a partir de três minutos.

4.2.5. O efeito da fosforilação T253 de α -tubulina na estabilização do polímero

Considerando que resultados de dinâmica molecular indicam que a fosforilação do resíduo T253 de α -tubulina auxilia a estabilização do polímero de tubulina contendo GDP e que o tratamento com nocodazol, descrito acima, induz a hidrólise do GTP e consequente desestabilização do microtúbulo (Vasquez *et al.*, 1997). O efeito da estabilidade do polímero de tubulina foi avaliado a partir do fracionamento celular, separando tubulina solúvel e polimerizada, após o tratamento com nocodazol (Figura 31).

Como indicado na figura 31A e B, a taxa de despolimerização da α -tubulina, observada após o tratamento com nocodazol, foi mais evidenciada na linhagem E14TG2A que apresentou a fosforilação da PKC β I inibida.

Entretanto a inibição da PKC β I não tem somente como alvo direto a α -tubulina, sendo possível que a inibição desta quinase possa gerar consequências adjuvantes à fosforilação de α -tubulina. Dessa maneira, a fim de confirmar os dados obtidos, mutações sítio dirigidas foram realizadas. Dois mutantes de α -tubulina-GFP: T253A (remove o sítio de fosforilação) e T253E (mimetiza a carga negativa conferida pela fosforilação, mutação fosfomimética) foram desenvolvidos, assim como uma

construção contendo a forma selvagem da α -tubulina acoplado ao GFP. A linhagem HEK 293T foi transfectada com esses diferentes mutantes e o tratamento com nocodazol, seguido do fracionamento celular, separando tubulina solúvel e polimerizada, foi realizado, tal como realizado na Figura 31A.

Como pode ser observado no gráfico da figura 31D, o tratamento com nocodazol reduziu a quantidade de tubulina polimerizada de forma diferente entre os mutantes. Na construção contendo a mutação T253E a razão da concentração de tubulina polimerizada após o tratamento com nocodazol pelo controle foi aproximadamente duas vezes maior que dos outros mutantes, indicando possivelmente que o mutante fosfomimético auxilia a estabilização do polímero de tubulina GDP formado pelo nocodazol. Estes dados corroboram os resultados obtidos a partir do tratamento com o peptídeo β I V5-3, na linhagem CTE E14TG2A (Figura 31A), e os estudos de dinâmica molecular (Figura 28).

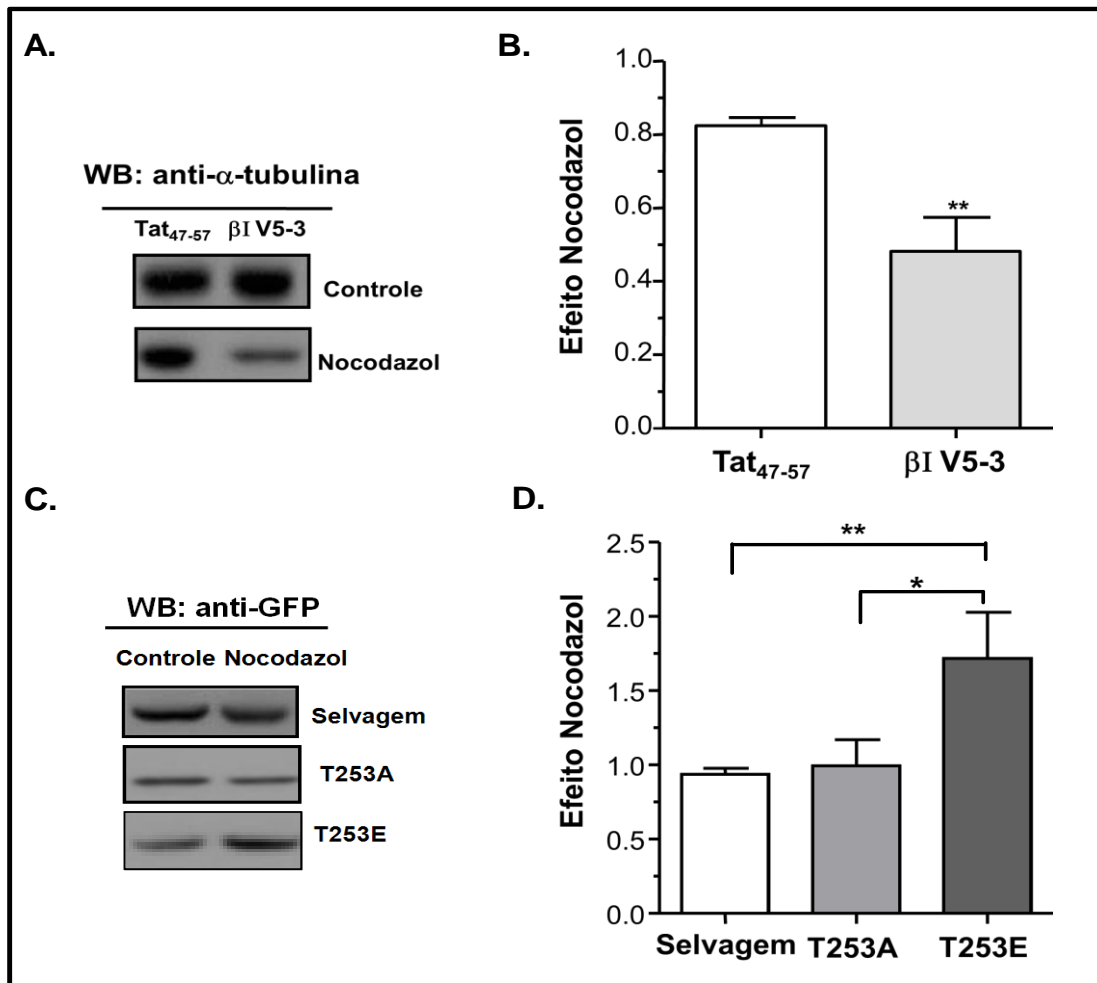


Figura 31: Fosforilação de α -tubulina induz estabilização do polímero. A) CTE E14TG2A foi tratada com o peptídeo inibidor da PKC β I, β I V5-3, e o peptídeo carreador controle, TAT₄₇₋₅₇, por 15 minutos, após este intervalo de tempo adicionou-se nocodazol (500 nM), por 30 minutos. A fração de tubulina polimerizada foi obtida após fracionamento celular e observada por Western blott usando anti- α -tubulina. B) Densitometria das bandas, cálculo da razão entre a quantidade de α -tubulina polimerizada presente após o tratamento com nocodazol pelo controle. C) A linhagem celular HEK 293T foi transfectada com três diferentes construtos para α -tubulina-GFP: selvagem, T253A e T253E. As células foram tratadas com nocodazol e a fração contendo tubulina polimerizada foi submetida ao imunoblotting com anti-GFP. D) Densitometria das bandas, razão entre a quantidade de α -tubulina-GFP polimerizada após o tratamento com nocodazol pelo controle (sem tratamento). Média de cinco experimentos independentes (* *p* value < 0.05; ** *p* value < 0.005).

4.2.6. A fosforilação de α -tubulina durante a divisão celular

Considerando que a PKC β I se co-localiza majoritariamente com α -tubulina na divisão celular (Figura 21 e 22), como etapa final dessa tese foi observado a taxa de incorporação dos diferentes mutantes de α -tubulina-GFP durante a metáfase. Para isso, a linhagem celular HEK 293T foi transfectada com quantidades iguais de α -tubulina-GFP selvagem, o fosfomimético GFP- α -tubulina T253E e o mutante α -tubulina-GFP T253A, como pode ser observado no *imunoblotting* anti- α -tubulina (Figura 32 C).

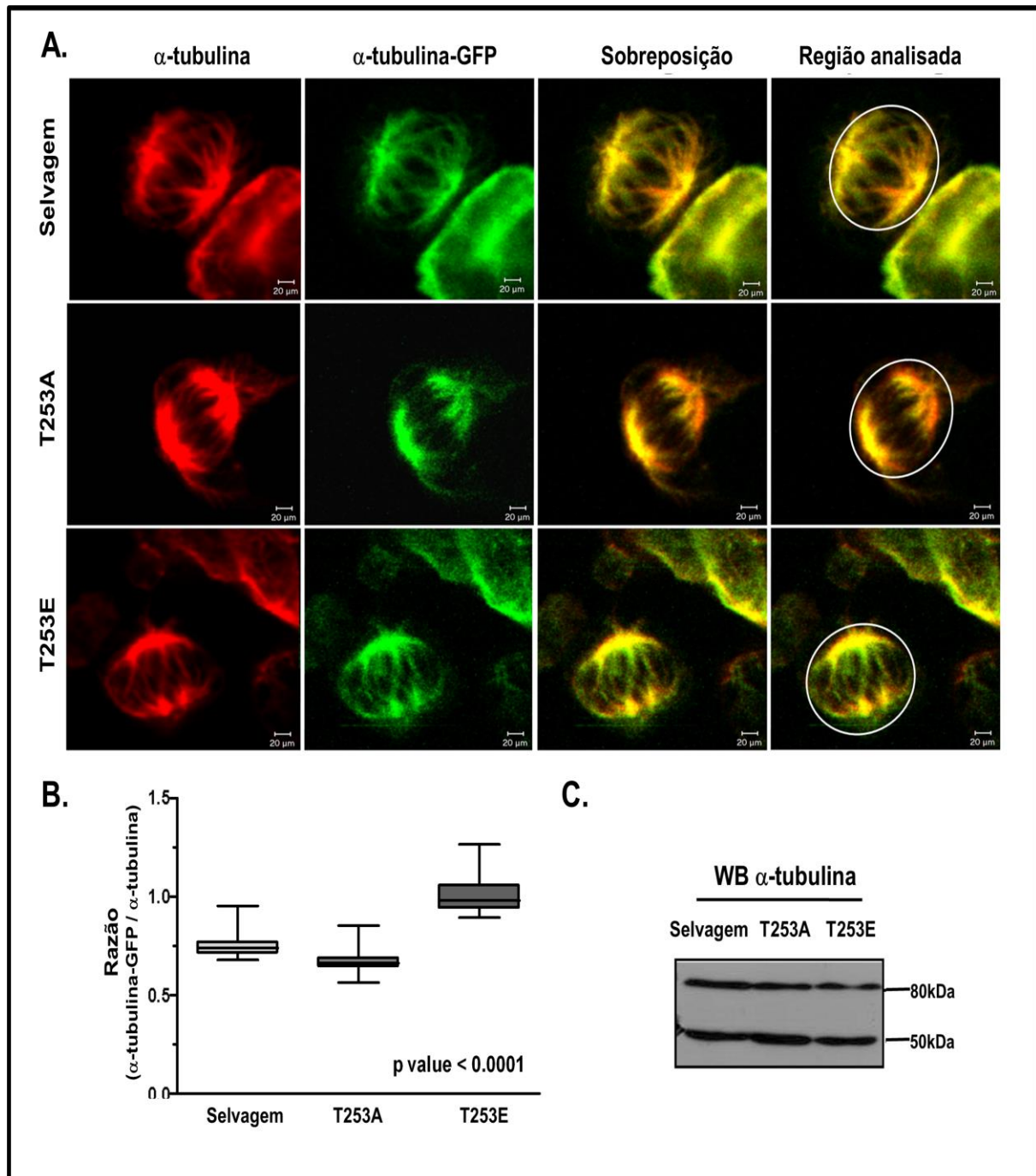


Figura 282: Mutações sítio dirigidas de T253 da α -tubulina alteram a incorporação de α -tubulina no fuso mitótico. A linhagem celular HEK 293T foi transfectada com as diferentes mutantes de α -tubulina-GFP (Selvagem, T253A e T253E). α -tubulina endógena foi detectada após imunofluorescência utilizando anti- α -tubulina e anti-mouse Alexa 555 em vermelho e analisada por microscopia confocal. A) O círculo indicado nas imagens representa a região analisada. Imagem representativa. B) Gráfico de dispersão da razão de incorporação de α -tubulina (α -tubulina-GFP/ α -tubulina endógena), foram analisadas pelo menos sete imagens de células em metáfase, de cada mutante. Para determinar a diferença estatística entre a incorporação dos diferentes mutantes de α -tubulina foi realizado o teste ANOVA ($p \text{ value} < 0,0001$, análise obtida a partir de nonoplicata experimental). C) A eficiência de transfecção foi determinada por imunoblotting anti- α -tubulina (imunoblot representativo).

A relação da incorporação da α -tubulina mutada com relação a α -tubulina endógena foi realizada a partir da razão entre as intensidades de fluorescência da α -tubulina-GFP pela α -tubulina total (em vermelho). Como pode ser observado pelas imagens representativas (figura 34A) e pela quantificação no gráfico (Figura 34B), o mutante fosfomimético, α -tubulina-GFP T253E é mais incorporado ao fuso mitótico que a α -tubulina-GFP selvagem. Ao passo que, as células transfectadas com o mutante α -tubulina-GFP T253A apresentam uma maior incorporação da α -tubulina endógena. Ainda é possível observar que os mutantes de α -tubulina GFP selvagem e T253E se encontram dispersos ao longo de todo o microtúbulo, enquanto que α -tubulina-GFP T253A está localizada somente em regiões específicas, sugerindo que a fosforilação de tubulina é essencial para a estabilização em pontos específicos do fuso mitótico.

Assim, os dados apresentados nessa parte da tese suportam a hipótese que sítios consensos estruturais podem ser formados. A análise estrutural do substrato deve ser considerada como um novo mecanismo de predição de sítios de fosforilação das PKCs e plataformas que predizem estes sítios devem ser desenvolvidas. Em adição, a fosforilação de α -tubulina no resíduo T253 é capaz de estabilizar o polímero de tubulina, sendo esta modificação pós-traducional importante para dinâmica de polimerização do microtúbulo durante a divisão celular.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Uma das principais características das CTE é a capacidade de se auto-renovar, ou seja, de proliferar mantendo a habilidade de se diferenciar em diversos tipos celulares (Strulovici Y. *et al.* 2007; Gokhale P.J. *et al.*, 2012). Elucidar os mecanismos que regem esta propriedade é fundamental, para a compreensão do desenvolvimento humano (Zhu Z. *et al.* 2013), e para a aplicação das CTE na medicina regenerativa (Ren G. *et al.*, 2012; Auletta J.J. *et al.*, 2012). Dentre as vias de sinalização que se destacam, nesse modelo de estudo, a família das PKCs tem sido descrita por apresentar um papel importante no controle das propriedades das CTE (Kinehara M. *et al.*, 2013; Song B.W. *et al.*, 2012). Nosso grupo observou que uma linhagem de CTE murina indiferenciada (E14TG2A) apresenta expressa as PKCs α , β I, β II, δ , ε e ζ/λ (Costa-Junior H.M. *et al.*, 2010). Sendo esta uma das motivações para investigar o papel das aPKCs nessa tese.

O estudo de fosfoproteômica é uma ferramenta utilizada em outros projetos do laboratório e a modulação de diferentes isoformas das PKCs culminaram em respostas biológicas distintas, em CTE indiferenciada. Por exemplo, a utilização de um ativador da PKC δ induziu a fosforilação de proteínas envolvidas em proliferação celular, e de fato essa resposta biológica foi observada (Garavello N. *et al.*, submetido), ao passo que, o inibidor da PKC β I, reduziu a fosforilação de proteínas nucleares envolvidas na regulação transcricional, de proteínas reguladoras da divisão e diferenciação celular e de fatores de *splicing* e remodelamento de cromatina (Costa-Junior H.M. *et al.*, 2010). Não se pode deixar de destacar que para uma efetiva compreensão das vias de sinalização mediadas pelas PKCs em CTE

indiferenciada é fundamental avaliar a importância funcional da fosforilação dos alvos protéicos identificados.

Dessa maneira, o objetivo geral dessa tese foi compreender a importância funcional da fosforilação mediada pelas aPKCs e validar um substrato da PKC β I, em célula tronco indiferenciada. Para isso, dividimos esta tese em dois objetivos distintos: 1) Utilizando fosfoproteômica, e um peptídeo inibidor específico das aPKCs, compreendemos a relevância desta subfamília das PKCs no cenário das CTE indiferenciadas. 2) Investigamos a importância da fosforilação de α -tubulina, pela PKC β I.

5.1. A importância das aPKCs em CTEs indiferenciadas

Trabalhos anteriores demonstraram que as aPKCs, essenciais para o desenvolvimento (Liu H. *et al.*, 2013; Dard N. *et al.*, 2009), e estão envolvidas em importantes processos biológicos, como a captação de glicose dependente de insulina (Farese R.V. & Sajan M..P., 2012; Bandyopadhyay G. *et al.*, 2004), no controle da adesão (Iden S. *et al.*, 2012; Ishiuchi T *et al.*, 2011) e polarização celular (Chen J. *et al.*, 2013).

Nessa tese foi investigado o papel específico das aPKCs em CTE indiferenciada utilizando abordagens de fosfoproteômica e um peptídeo inibidor específico das aPKCs que compete com o substrato (peptídeo pseudosubstrato, aPKC- ψ S). A maioria das proteínas cuja fosforilação foi reduzida na presença deste inibidor pode ser agrupada em dois grupos principais: i) proteínas envolvidas em vias metabólicas, como glicólise, metabolismo de lipídeos, via das pentoses e produção de aminoácidos; ii) proteínas envolvidas na manutenção do citoesqueleto, adesão celular e transporte de proteínas.

Considerando que aproximadamente um terço das proteínas cuja fosforilação foi reduzida após inibição das aPKCs estão envolvidas no metabolismo (27%), o papel das aPKCs no metabolismo das CTE indiferenciadas foi explorado como um dos objetivos dessa tese.

5.1.1. O controle metabólico em CTE

O equilíbrio entre a manutenção do estado indiferenciado, auto-renovação, e a diferenciação celular é regulado por diversos fatores (Yu Z. *et al.*, 2012; Kshitiz *et al.*, 2012). Trabalhos recentes indicam que durante a diferenciação celular, há uma mudança metabólica (Vacanti N.M. *et al.*, 2013; Forristal C.E. *et al.*, 2013). Uma vez que as CTE indiferenciadas, que realizam preferencialmente um metabolismo fermentativo, ao se diferenciarem, se tornam mais oxidativas (Folmes C.D. *et al.*, 2011).

Muitos trabalhos observam estas mudanças metabólicas das CTE. Por exemplo, a inibição da via das pentoses foi capaz de induzir a diferenciação celular (Manganelli G. *et al.*, 2012). A indução da formação de iPSC foi acompanhada por um aumento na produção de lactato e consumo de glicose (Folmes *et al.*, 2011). Recentemente observou-se que a inibição das aPKCs aumenta a diferenciação de CTE em cardiomiócitos (Zhou X., *et al.*, 2003), apesar de não se ter avaliado o perfil metabólico das células nesse trabalho, sabe-se que a diferenciação de CTE em cardiomiócitos requer uma reestruturação das mitocôndrias e uma mudança de metabolismo glicolítico para fosforilação oxidativa (Lopaschuk *et al.*, 2010; Chung S. *et al.*, 2007). Até o presente momento nenhum trabalho, porém, foi capaz de conectar todas as peças desse quebra-cabeça, investigando os mecanismos regulatórios que mantém os processos metabólicos característicos das CTE

indiferenciadas e as mudanças metabólicas que ocorrem durante a diferenciação das CTE.

A modulação do consumo de glicose, da produção de lactato, da atividade da via glicolítica, da via das pentoses e do consumo de oxigênio, são orquestrados de maneira complexa e intrigante, e o controle dessas vias contribuem para o metabolismo anaeróbico celular (Folmes C.D. *et al.*, 2011). Acredita-se que o estudo dos mecanismos de regulação destes eventos poderá auxiliar a compreender os fatores que coordenam a auto-renovação, bem como os que levam à diferenciação das CTE (Madonna R. *et al.*, 2013).

Os resultados obtidos nessa tese permitiram observar que as aPKCs são peças fundamentais no controle metabólico das CTE. A inibição da atividade dessas enzimas levou a redução da fosforilação de importantes enzimas metabólicas, possivelmente regulando a atividade das mesmas, além de alterar a captação de glicose, produção de lactato e a atividade da cadeia respiratória mitocondrial. Dessa maneira, a inibição das aPKCs diminuiu a fermentação nas CTE indiferenciadas, processo metabólico encontrado preferencialmente nestas células. A seguir, os alvos das aPKCs encontrados e o efeito que a fosforilação dos mesmos pode ter no metabolismo das CTE indiferenciadas serão discutidos.

5.1.1.1. Alvos das aPKCs identificados envolvidos na via glicolítica

Uma grande maioria das proteínas identificadas no estudo de fosfoproteômica, que tiveram sua fosforilação reduzida após o tratamento com o peptídeo pseudossustrato das aPKCs, são proteínas envolvidas no metabolismo da glicose (22%). Dentre elas destaca-se a **Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH)**; **α -enolase (EnoA)**, **Piruvato Quinase M2 (PKM2)** e a **Lactato**

Desidrogenase B (LDHB), que serão discutidas no contexto das CTE indiferenciadas e podem ser observadas na Figura 9.

A **GAPDH** catalisa a sexta reação da glicólise, que consiste na oxidação do glicerol-3-fosfato em dihidroxiacetona fosfato acompanhada da redução do NAD^+ (Sirover M.A., 1999). Trabalhos anteriores descrevem que esta enzima glicolítica é substrato direto da $\text{PKC}\lambda$ e interage com o domínio regulatório dessa quinase (Tisdale E.J., 2002). Estes resultados validam nossa estratégia para detectar substratos das aPKCs. Porém, no trabalho desenvolvido por Tisdale E.J. (2002) não foi investigado o efeito da fosforilação de GAPDH na sua atividade glicolítica. Futuros estudos são necessários para investigar o mesmo. Chung e colaboradores, em 2010, observaram que durante o processo de diferenciação das CTE para cardiomiócitos não ocorre uma alteração na expressão total de GAPDH, entretanto há um possível aumento de sua fosforilação, verificada pela redução do ponto isoelétrico dessa proteína. Neste mesmo trabalho foi observado um aumento da atividade glicolítica de GAPDH, apesar da redução do metabolismo fermentativo celular observado através da produção de lactato sugerindo que a fosforilação de fato pode regular a atividade de GAPDH (Chung S. *et al.*, 2010).

A **Enolase** catalisa a reação de desidratação do 2-fosfoglicerato em fosfoenolpiruvato, um composto altamente energético e a sua reação reversa (Díaz-Ramos A. *et al.*, 2012). Através dos dados de fosfoproteômica realizado com lisados de células CTE da linhagem E14TG2A indiferenciadas, observamos uma redução da fosforilação da enolase A (EnoA) após o tratamento com o peptídeo inibidor das aPKCs, entretanto, através do ensaio de fosforilação *in vitro*, verificamos que esta enzima provavelmente não é um substrato direto dessa subfamília das PKCs. Cabe

destacar, que um aumento da expressão de EnoA e de GAPDH foram observados em células iPSCs (Foles *et al.*, 2011).

A **Piruvato Quinase M2**, outro alvo das aPKCs indentificado nessa tese, catalisa a reação irreversível de conversão de fosfoenolpiruvato em piruvato com a formação de ATP, uma das etapas limitantes da via glicolítica (Gupta V. & Bamezai R.N., 2010). A PKM2 apresenta duas formas de oligomerização, uma dimérica e uma tetramérica (Mazurek S., 2011). A forma tetramérica tem uma afinidade maior pelo fosfoenolpiruvato quando comparada à forma dimérica sendo, portanto, encontrada nos complexos glicolíticos (Tamada M. *et al.*, 2012).

Nessa tese observou-se que as aPKCs fosforilam a PKM, entretanto essa fosforilação não foi capaz de alterar a atividade dessa enzima em CTE E14TG2A indiferenciada. A PKC δ também se mostrou capaz de fosforilar a PKM2 e, tal como as aPKCs, não modulou a atividade da enzima (Siwko e Monchely-Rosen *et al.*, 2007). A fosforilação possivelmente induz a estabilização da forma dimérica da PKM2 ou a sua interação com outras proteínas. A utilização de técnicas de *cross-linking* (ligação cruzada), seguida da análise por *immunoblotting*, ou mesmo análise por gel filtração poderão verificar se a fosforilação da PKM2 pelas aPKCs altera o equilíbrio entre dímeros e tetrâmeros ou ainda a ligação de outras proteínas que podem vir a estabilizar as diferentes forma de oligomerização da PKM2.

A expressão da PKM2 está associada a células com alta capacidade de auto-renovação, como as células tronco embrionárias e adultas (Tamada M. *et al.*, 2012). O aumento da expressão da PKM2 foi observado durante a tumorigênese (Wong *et al.*, 2013) e em pacientes com câncer gástrico com mal prognóstico (Lin J.Y. *et al.*, 2012). Em células tumorais, altamente indiferenciadas, a forma dimérica da PKM2 é majoritariamente expressa (Eigenbrodt E. *et al.*, 1997; Yang W. *et al.*,

2012). Como esta forma da enzima tem uma afinidade menor pelo fosfoenolpiruvato, há um acúmulo intracelular dos metabólitos glicolíticos formados anteriormente ao fosfoenolpiruvato, que podem ser utilizados por outras vias metabólicas, como a via das pentoses. (Redel B.K. *et al.*, 2012).

Além da atividade da PKM2 na via glicolítica não se pode deixar de destacar as outras funções intrigantes desta enzima. A PKM2 é capaz de se ligar ao CD44, uma das principais moléculas de adesão celular, altamente expressa em célula tronco (Tamada M. *et al.*, 2012). Esta enzima também é capaz de translocar para o núcleo e através do seu C-terminal (resíduos 307-531) interagir com o fator de transcrição Oct4, aumentando a sua atividade transcricional, fundamental para o controle da auto-renovação das CTEs (Lee J. *et al.*, 2008). Em adição, os dímeros da PKM2 funcionam como uma quinase também sendo capazes de fosforilar Stat3 no resíduo Y705 e também aumentando a sua atividade transcricional (Gao X. *et al.*, 2012).

A maior parte das aPKCs não está localizada no núcleo (Costa-Junior H.M. *et al.*, 2010) de forma que a interação das aPKCs com a PKM2 deve ocorrer no citoplasma, todavia a fosforilação poderá modular a translocação da PKM2 para o núcleo, o que deve ser investigado em estudos posteriores. Não se pode deixar de destacar que, a inibição da fosforilação da PKM2, pelas aPKCs, não alterou sua atividade, será interessante avaliar se as aPKCs regulam a nova função quinásica da PKM2, bem como o estado de oligomerização da PKM2, como mencionado anteriormente. Em adição, a identificação do sítio fosforilado pelas aPKCs poderá auxiliar na avaliação do efeito da fosforilação na enzima

Alguns estudos ressaltam que a PKM2 é uma das enzimas fundamentais no controle do *Efeito Warburg* (Bayley J.P. & Devilee P., 2012). Esse efeito, também

conhecido como glicólise aeróbica, foi inicialmente descrito em 1926, onde Otto Warburg observou que em células tumorais ocorre um aumento no consumo de glicose e produção de lactato, ou seja, na taxa de fermentação mesmo em um ambiente aeróbico (Warburg O., 1956). Um dos exemplos da aplicação desse modelo está no diagnóstico de pacientes com câncer, observados por tomografia por emissão de pósitron (PET). Neste exame observa-se a região do corpo do paciente com alto consumo de glicose (marcada com elemento radioativo). Esses locais de alto consumo de glicose são considerados como possíveis focos tumorais (Bensinger S.J. & Christofk H.R, 2012).

Além da glicólise aeróbica, importante nos processos de síntese de ATP pela via glicolítica, também são observadas significativas alterações na biossíntese de macromoléculas e no controle redox, em células tumorais (Bensinger S.J. & Christofk H.R, 2012). A alta taxa glicolítica das células tumorais é diretamente proporcional ao seu perfil de indiferenciação e a conseqüente alta agressividade tumoral. Muitos autores consideram que a alta atividade glicolítica observada em células tronco indiferenciadas e nas iPSCs pode ser classificada como um efeito *Warburg-like*. (Vazquez-Martin, et al., 2013; Hsu & Sabatini, 2008).

A conversão do piruvato a lactato e conseqüente oxidação do NADH é mediada pela **Lactato Desidrogenase** (LDH), identificada, nessa tese, como um outro substrato direto das aPKCs. A enzima catalisadora da conversão de piruvato em lactato com a concomitante oxidação do NADH e da reação oposta é considerada a principal responsável por determinar a rota anaeróbica da glicólise (Bayley JP, Devilee P, 2012). Existem evidências que as proteína quinases, da PKA e PKCs, estão envolvidas na regulação da expressão da LDH. Em linhagens celulares de glioma C6, ativadores dessas quinases, AMPc e TPA, foram capazes

de aumentar a estabilidade do RNAm de LDH (Short S. *et al.*, 2000). As PKCs são importantes também por induzirem o aumento da atividade de LDH e a consequente produção de lactato, em neurônios corticais hipóxicos (Hong S.S *et al.*, 2004). Nesses dois trabalhos não foram investigados qual das isoformas das PKCs que regula a atividade da LDH, nem se as PKCs são capazes de fosforilar diretamente esta enzima. Contudo, esses dados corroboram com os resultados dessa tese, visto que a inibição das aPKCs, levou a uma redução da atividade de LDH e dos níveis de lactato extracelular, embora a fosforilação direta da LDH não tenha sido observada.

Dessa maneira, o tratamento com o inibidor das aPKCs alterou o perfil de fosforilação de algumas proteínas glicolíticas, reduziu a atividade da lactato desidrogenase no sentido da produção de lactato e aumentou o consumo de glicose. Além da modulação de proteínas da via glicolítica, observamos, pela análise do fosfoproteoma, a redução da fosforilação das duas principais enzimas da via das pentoses, a **Glicose 6-fosfato Desidrogenase (G6PD)** e a **Transaldolase (TALDO)**. Essas duas rotas metabólicas, via glicolítica e das pentoses, estão intimamente ligadas, uma vez que compartilham alguns intermediários metabólicos (Feron O., 2009).

5.1.1.2. Alvos das aPKCs identificados envolvidos na via das pentoses

A via das pentoses fosfato é considerada o principal sistema de defesa anti-oxidante celular, sendo uma via importante para o balanço do potencial redutor e a produção de precursores nucleotídeos e coenzimas (Grant C.M., 2008). Atualmente, estudos relacionam essa cascata metabólica com importantes processos celulares, como ciclo celular (Zanuy M. *et al.*, 2012), apoptose (Riganti C. *et al.*, 2012),

diferenciação (Manganelli G. *et al.*, 2012), motilidade (Langbein S. *et al.*, 2006), angiogênese (Leopold J.A. *et al.*, 2003) e com a resposta terapêutica anti-tumoral (Estrela J.M *et al.*, 2006). Em células que estão se replicando rapidamente como é o caso de células tumorais e das CTE indiferenciadas que tem um ciclo celular mais curto há grande necessidade de síntese de nucleotídeos e dessa forma um aumento da atividade da via das pentoses (Vizán P. *at al.*, 2009; Riganti C. *et al*, 2012). Além disso, conforme discutido acima, como parte do efeito Warburg, a PKM2 na sua forma dimérica, por apresentar afinidade reduzida ao fosfoenolpiruvato, gera um acúmulo de intermediários a montante do piruvato e conseqüentemente pode levar à ativação da via das pentoses (Xu X. *et al.*, 2009), desta forma os alvos diretos e indiretos das aPKCs encontrados que participam da via das pentoses podem sofrer alterações de modo a acelerar esta via.

A via das pentoses pode ser dividida em duas etapas: a etapa oxidativa e a etapa não-oxidativa. A primeira etapa tem como objetivo principal a redução do NADP⁺ a NADPH, enquanto que a segunda etapa, não-oxidativa, é caracterizada por apresentar uma série de rearranjos moleculares que culminam na formação de açúcares, fundamentais para a homeostase celular (Redel B.K. *et al.*, 2012). *In vivo*, a Glicose 6-fosfato Desidrogenase (G6PD) forma um complexo com Transaldolase 1 (TALDO1) e com a 6-fosfogluconato Desidrogenase, regulando a atividade da via das pentoses (Huang J.B. *et al.*, 2005). Nos estudos de proteômica foram detectados alterações na fosforilação destas duas proteínas.

A **Glicose 6-fosfato Desidrogenase** (G6PD) está envolvida na primeira etapa da via das pentoses, fase oxidativa, sendo responsável por catalisar a oxidação da glicose-6 fosfato em glucolactona-6 fostato com concomitante redução de NADP⁺ (Ho H.Y. *et al.*, 2007). A atividade de G6PD apesar de ser dispensável

para a via das pentoses é essencial para proteger as células do estresse oxidativo (Cappellini M.D. & Fiorelli G., 2008). Trabalhos anteriores observaram que o ativador das PKCs clássicas e nóveis, éster de forbol, aumenta significativamente a fosforilação da G6PD e a sua atividade (Ata H. *et al.*, 2011). Mutações sítio dirigidas nos resíduos de aminoácidos presentes no sítio catalítico da enzima serina 210 e treonina 266 ambas para alanina, reduziram a fosforilação por PKC (PKC δ) e inibiram a atividade da enzima (Gupte R.S. *et al.*, 2011) demonstrando que PKCs podem ser importantes reguladores desta enzima. Resta investigar se as aPKCs apresentam função semelhante a PKC δ .

A **Transaldolase** (TALDO) é a enzima responsável pela etapa limitante da fase não-oxidativa da via das pentoses. Esta enzima catalisa a transferência reversível de três unidades de carbono (dihidroxiacetona) de um doador cetose para um acceptor aldose, formando um novo par cetose/ aldose, sendo a reação de conversão do gliceraldeído 3-fosfato (3C, aldose) e da sedoheptulose 5-fosfato (7C, cetose) em frutose 6-fosfato (6C, cetose) e eritrose 4-fosfato (4C, aldose), um dos exemplos de reação mediada por essa enzima (Samland A.K. & Sprenger G.A., 2009). TALDO está descrita na literatura por ligar a via das pentoses à via glicolítica (Samland A.K. *et al.*, 2011). Acredita-se que a fosforilação desta enzima é um dos mecanismos de modificação pós-traducional responsável por regular a atividade da TALDO, uma vez que, Lanchaise e colaboradores, observaram que o tratamento da TALDO1 e 2 com fosfatase reduziu a sua atividade enzimática (Lachaise F. *et al.*, 2001). A isoforma identificada no estudo de proteômica foi a TALDO1, esta isoforma encontra-se altamente expressa em diversos tipos de tumores e a sua alta atividade está associada a agressividade tumoral (Perl A *et al.*, 2011). Em estágios iniciais do

desenvolvimento do blastocisto, foi observado um aumento da expressão de TALDO1 em baixa concentração de O₂ (Redel B.K. *et al.*, 2012).

Estudos anteriores suportam a hipótese de que a fosforilação das proteínas G6PD e de TALDO possivelmente regulam positivamente a via das pentoses (Ata H. *et al.*, 2011; Zhang J. *et al.*, 2012). Ensaios futuros determinarão se as aPKCs regulam, direta ou indiretamente, a atividade destas enzimas e a consequência na via das pentoses. Conforme discutido acima, a via das pentoses encontra-se altamente ativa em diversos tipos de câncer e em CTE indiferenciadas. Muitos autores consideram a via das pentoses como um dos principais gatilhos metabólicos responsáveis por regular as características das CTEs (revisado por Zhang *et al.*, 2012) de fato a inibição desta via induziu a diferenciação celular de CTEs em endoderma (Manganelli *et al.*, 2012).

5.1.1.3. Alvos das aPKCs identificados envolvidos na biossíntese de serina

Além da modulação da fosforilação de proteínas regulatórias presentes na via glicolítica e na via das pentoses, o tratamento com o inibidor das aPKCs, induziu a redução da fosforilação das duas principais enzimas da biossíntese de serina: a **3-fosfoglicerato Desidrogenase** (PHGDH) e a **Fosfoserina Fosfatase** (PSP). A biossíntese de serina ocorre no citosol e apresenta como precursor o 3-fosfoglicerato, um dos intermediários da via glicolítica (Snell K. & Fell D.A., 1990). Dentre as inúmeras funções da serina, cabe sua função como um regulador alostérico positivo de PKM2 (Mazurek S., 2011).

A primeira etapa da biossíntese de serina, catalisada pela **PHGDH**, corresponde à oxidação do 3-fosfoglicerato a 3-fosfopiruvato e redução do NAD⁺ a

NADH (Snell K. & Fell D.A., 1990). Locosale e colaboradores, em 2011, demonstraram que a proliferação celular é severamente atenuada pela redução da atividade da PHGDH, em alguns tipos de câncer (Locosale J.W. & Cantley L.C., 2011).

A **3-fosfoglicerato Desidrogenase** (PHGDH) já foi descrita anteriormente como um alvo da PKC ζ (Ma L. *et al.*, 2013), o fato de termos detectado esta proteína, confirma mais uma vez a eficiência da nossa estratégia para encontrar substratos das aPKCs. Ma e colaboradores, em 2013, observaram que PHGDH é fosforilada nos resíduos S55, T57 e T78 pela PKC ζ . A mutação desses três resíduos para E assim como a fosforilação *in vitro* de PHGDH mediada por PKC ζ inibiram a atividade enzimática de PHGDH o que levou a uma diminuição da proliferação (Ma L. *et al.*, 2013). Estes dados sugerem que PHGDH possa contribuir para o controle da taxa de proliferação, embora nenhum efeito na proliferação das CTE indiferenciadas tenha sido observado após a inibição da PKC ζ , nessa tese e outros dados do laboratório não publicados. Possivelmente, o controle da atividade de outras proteínas envolvidas em proliferação, também fosforiladas pelas aPKCs, pode contrabalançar o efeito da fosforilação da PHGDH na inibição da proliferação, sendo necessário um investigação mais detalhada.

A **Fosfoserina Fosfatase** (PSP) catalisa a conversão de fosfoserina em serina (Snell K. & Fell D.A., 1990). PSP encontra-se altamente expressa em células progenitoras neuronais, células tronco embrionárias e hematopoiéticas (Nakano I *et al.*, 2007). Assim como PHGDH, a superexpressão de PSP promove a proliferação celular. PSP apresenta sua atividade inibida através de fosforilação mediada por insulina e altos níveis de cálcio intracelular (Begum N. *et al.*, 1992). Os resultados obtidos nessa tese indicam pela primeira vez o envolvimento das aPKCs na

fosforilação da PSP, estudos posteriores determinarão se esta enzima é um substrato direto das aPKCs e qual o efeito da sua fosforilação na atividade da mesma.

A síntese de serina é fundamental para o desenvolvimento embrionário (Yoshida *et al.*, 2004). Ma L. e colaboradores observaram que a PKC ζ foi capaz de reprimir a expressão de PHGDH e PSAT1 (*Phosphoserine Transaminase*) outra enzima envolvida na biossíntese de serina, responsável por catalisar a conversão do 3-fosfo-hidroxipiruvato em fosfoserina. Nesse mesmo trabalho, a inibição dessa isoforma das aPKCs, em células tumorais de cólon, reduziu o consumo de glicose, a produção de lactato e induziu um aumento da proliferação celular (Ma L. *et al.*; 2013). Os autores acreditam que a PKC ζ pode regular vias de sinalização celular importantes na plasticidade metabólica em células tumorais e o bloqueio desta pode auxiliar por inibir o efeito Warburg (Feliciano P, 2013), o que corrobora os resultados em CTE, obtidos nessa tese.

5.1.1.4. Alvos das aPKCs identificados envolvidos no ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa

Em células tronco indiferenciada a atividade glicolítica é acentuada, assim como a taxa fermentativa (Vacanti N.M. & Metallo C.M., 2013). Durante a diferenciação celular observa-se um aumento do consumo de oxigênio e conseqüentemente na fosforilação oxidativa (Rehman J., 2010). A inibição das aPKCs também modulou negativamente a fosforilação de enzimas responsáveis por metabolizar intermediários do ciclo de Krebs, como a **Isocitrato Desidrogenase** (IDH1); além de enzimas envolvidas na atividade mitocondrial, como a **Glicerol 3-fosfato Desidrogenase** (GPD2) e a **ATP sintase**.

A família das isoenzimas da **Isocitrato Desidrogenase** (IDH) é composta por três membros, sendo estas responsáveis por catalisar a descarboxilação oxidativa do isocitrato produzindo α -cetoglutarato e CO₂. A descarboxilação do isocitrato é acompanhada pela redução do NAD⁺ pela isoforma IDH3 ou pela redução do NADP pelas isoformas IDH1 e IDH2. As enzimas IDH1 e IDH2 são homodiméricas atuando no citoplasma e na mitocôndria, respectivamente (Zheng J. *et al.*, 2012).

No presente estudo observamos uma diminuição na fosforilação da IDH1, forma citoplasmática, o que era de se esperar visto que as aPKCs são abundantes no citoplasma das CTE indiferenciadas (Costa-Junior *et al.*, 2010). Esta isoforma é importante por regular o equilíbrio redox celular e a síntese anabólica. Diversos estudos associam a alta expressão de IDH ao estadiamento avançado de gliomas (Kin W & Liau L.M., 2012) e a pacientes com leucemia mielóide aguda (Rakheja D. *et al.*, 2012). A mutação nessa enzima, somada a interação com seu alelo correspondente selvagem, induz uma nova propriedade enzimática, sendo capaz de converter o α -cetoglutarato a 2-hidroxi-glutarato (2HG) (Ward P.S. *et al.*, 2013). Este metabólito vem sendo considerado um potente biomarcador tumoral (Yen K.E., *et al.*, 2010) e a sua alta concentração celular foi capaz de inibir demetilação de histona e bloquear a diferenciação celular em células não transformadas (Lu C. *et al.*, 2012). Até o presente não foi evidenciado nenhum trabalho que correlacione a atividade dessa enzima ou a presença de 2HG intracelular, com a fosforilação mediada por proteínas quinases. Em procariotos, a atividade dessa enzima é regulada por fosforilação, mediada pela enzima Isocitrato desidrogenase quinase/fosfatase (AceK) e IDH, quando fosforilada, apresenta menos afinidade com os intermediários do ciclo de Krebs (Zheng J. *et al.*, 2012). Mais estudos são necessários para

investigar se esta enzima é um substrato direto ou indireto das aPKCs. Podemos hipotetizar que a fosforilação mediada (direta ou indiretamente) por essa quinase pode induzir a inibição do ciclo de Krebs aumentando o metabolismo fermentativo das CTE indiferenciada.

A fosforilação da **Glicerol 3-fosfato Desidrogenase** (GPD2), foi reduzida após o tratamento com o peptídeo pseudossustrato das aPKCs. Essa enzima participa da reação de redução da dihidroxi-acetona em glicerol 3-fosfato, a partir da oxidação do NADH, além de oxidar o glicerol 3-fosfato a dihidroxiacetona fosfato, a partir da redução do FAD (Kota V. *et al.*, 2010). Localizada na membrana mitocondrial, esta enzima trabalha em conjunto com a lançadeira malato-aspartato e ambas são fundamentais para o balanço redox entre a mitocôndria e o citoplasma, além de fornecer o principal agente da fosforilação oxidativa (Mráček T *et al.*, 2013). GPD2 também está envolvida na geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) em tecido adiposo, na placenta humana e em células tumorais de próstata (Chowdhury S.K. *et al.*, 2007). A fosforilação de GPD2 por *AMP-activated protein kinase*, reduz sua atividade enzimática (Lee Y.J. *et al.*, 2012), induzindo possivelmente uma diminuição da atividade da cadeia respiratória e um consequente aumento do metabolismo fermentativo. Mais estudos são necessários para avaliar se esta enzima é substrato direto das aPKCs e qual efeito esta fosforilação teria na atividade enzimática da enzima.

A **ATP sintase** catalisa a etapa final da fosforilação oxidativa e é responsável pela produção de 90% do ATP celular. Essa enzima é formada por dois domínios; F₁, presente na matriz mitocondrial, e F₀, que corresponde ao canal de prótons presente na porção transmembranar da mitocôndria. O domínio F₁ é constituído por três subunidades α , três β e as subunidades γ , δ e ϵ (Cheng Z. &

Ristow M., 2013). Nesta tese foi observado que a inibição das aPKCs reduziu a fosforilação da subunidade α da ATPsintase. Nguyen e colaboradores, em 2010, observaram, em cardiomiócitos, que a PKC δ é capaz de interagir com a subunidade δ da ATP sintase e a fosforilação deste domínio inibiu a produção de ATP. Nesse mesmo trabalho foi observado que a PKC ζ não é capaz de interagir e fosforilar com a subunidade δ (Nguyen T.T. *et al.*, 2010), sendo necessários mais estudos para avaliar se esta quinase é capaz de fosforilar a subunidade α da ATP sintase, identificada pelo fosfoproteoma. Recentemente observou-se que a reprogramação de células somáticas para iPSC envolve a alteração da expressão e atividade da ATP sintase o que levaria a um aumento do metabolismo fermentativo (Vazquez-Martin A. *et al.*, 2013).

Nessa tese, observou-se um aumento da capacidade respiratória total das CTEs indiferenciadas após o tratamento com o peptídeo inibidor pseudosubstrato das aPKCs. Observou-se um aumento do consumo basal de oxigênio após a adição do peptídeo. Também observamos e, um aumento significativo no consumo de oxigênio em células tratadas com o inibidor das aPKCs após a adição do inibidor da ATPsintase (oligomicina) e do desacoplador (FCCP) permitindo inferir que o aumento do consumo de O₂ é devido ao aumento da atividade mitocondrial destas células. Ensaios futuros irão determinar se esse aumento da fosforilação oxidativa é devido à alteração da eficiência mitocondrial ou do número de mitocôndrias.

5.1.1.5. O efeito da inibição das aPKCs no perfil bioenergético das CTEs indiferenciadas

Conforme discutido acima, os resultados obtidos nessa tese sugerem que as aPKCs modulam a atividade glicolítica das CTE e a sua taxa de fermentação. De

fato, a inibição das aPKCs causou uma redução na captação de glicose e na produção de lactato, medido por diversas técnicas. Somado à análise do consumo de oxigênio, esses dados indicam que a inibição das aPKCs foi capaz de reduzir o perfil fermentativo das CTE indiferenciadas.

Dessa maneira, o presente trabalho ressalta a importância das aPKCs, às quais atribuímos novas funções em CTE indiferenciadas. Estudos anteriores com CTE indiferenciadas descreveram uma alta expressão dessa subfamília das PKCs (Kinehara M. *et al.*, 2013; Song B.W. *et al.*, 2012; Costa-Junior *et al.*, 2010), bem como o envolvimento destas quinases na captação de glicose insulina dependente. Os dados obtidos nessa tese demonstram que além da captação de glicose, as aPKCs estão envolvidas no controle do balanço fermentação versus oxidação celular, (figura 33) contribuindo para o estado indiferenciado e a auto-renovação das CTE.

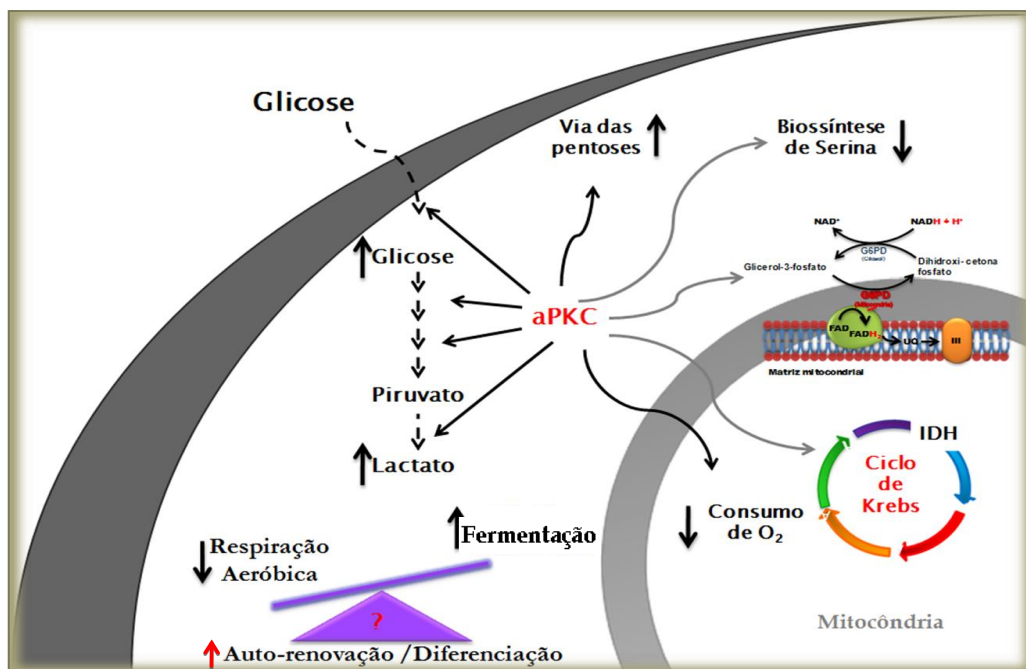


Figura 293: Modelo indicando o envolvimento das aPKCs na modulação das principais proteínas metabólicas identificadas no fosfoproteoma. As setas em preto indicam as vias e alterações metabólicas diretamente relacionadas ao controle da auto-renovação e diferenciação das CTE. As setas em cinza indicam as vias metabólicas que ainda não possuem correlação diretamente descrita com o controle das características das CTE. (Figura adaptada de Vacanti N.M. & Metallo C.M., 2013).

Além do papel no controle do metabolismo das CTE, diversos estudos demonstram que as aPKCs estão envolvidas em processos de adesão célula-célula, polarização celular e no remodelamento do citoesqueleto (Ishiuchi T *et al.*, 2011; Iden S *et al.*, 2012). De fato a adesão célula-célula é um evento essencial para a manutenção do estado indiferenciado das CTE (Chen S. *et al.*, 2013), e as aPKCs participam deste processo (Marthiens V. & ffrench-Constant C., 2009). As proteínas presentes no citoesqueleto e em processos de adesão célula-célula identificadas no estudo de proteômica desta tese serão discutidas a seguir.

5.1.2. O controle do citoesqueleto, polarização e adesão celular em CTE

A inibição da atividade das aPKCs, em CTE indiferenciadas, além de modular proteínas envolvidas no controle metabólico, reduziu a fosforilação de 22% de proteínas envolvidas na dinâmica do citoesqueleto, polaridade celular e chaperonas. Estudos anteriores indicam que as aPKCs controlam a organização do microtúbulo, a simetria das junções aderentes e a polaridade celular, funções estas essenciais ao desenvolvimento embrionário.(Harris T.J. *et al.*, 2007; Liu H. *et al.*, 2013). Dessa maneira, esse grupo de proteínas identificadas no fosfoproteoma, confirmam que a função das aPKCs não reside apenas no controle do metabolismo, como também em outros processos reportados anteriormente (Marthiens V. & ffrench-Constant C., 2009; Wang G. *et al.*, 2009). Estes dados fortalecem a confiabilidade dos resultados gerados nessa tese.

5.1.2.1. Alvos das aPKCs identificados: Chaperonas e proteínas reguladoras da dinâmica do citoesqueleto

As chaperonas moleculares e as co-chaperonas, especialmente as Heat Shock Proteins (HSP) são fundamentais para regular o enovelamento de proteínas e a formação de complexos protéicos (Fan G.C., 2012). Apesar das chaperonas serem proteínas abundantes na célula, as chaperonas identificadas nesse estudo estão envolvidas diretamente com metabolismo, adesão célula-célula, divisão e polarização celular. Estes dados são coerentes com as funções atribuídas para as aPKCs por outros pesquisadores (Harris T.J. et al., 2007; Liu H. et al, 2013) e pelos outros resultados obtidos no presente estudo. De fato, a partir da análise de interactoma, feita pelo programa Strings, utilizando algumas proteínas identificadas que sofreram redução da fosforilação após inibição das aPKCs, foi possível observar que as aPKCs estão envolvidas na interação com algumas proteínas de citoesqueleto, membros da família das Rho-GTPases e algumas chaperonas. Apesar de algumas interações já terem sido descritas, outras interações diretas com as aPKCs deverão ser investigadas.

A importância das HSPs, associada à resposta ao estresse, é bem caracterizada em células somáticas, entretanto esse grupo de proteínas vem sendo progressivamente estudado em célula tronco (revisado por Fan G.C., 2012). A tolerância ao estresse das CTEs é superior quando comparada a célula diferenciada (Prinsloo E. et al., 2009), e uma alta expressão destas proteínas é observada nesse modelo celular (Puente L. et al., 2006). Membros das famílias das HSP90, das *small* Hsp (sHSP) e das HSP70 apresentaram uma diminuição na sua fosforilação após o tratamento com o inibidor das aPKCs (Cheng M.B. et al., 2010).

A proteína **TNF receptor-associated protein 1** (TRAP1), ou HSP75 é membro da família das HSP90, encontradas predominantemente na mitocôndria (Altieri D.C. *et al.*, 2012). Estudos sugerem o seu envolvimento na proteção ao estresse oxidativo, uma vez que são capazes de tamponar espécies reativas de oxigênio (Montesano Gesualdi N *et al.*, 2007). Células HeLa que super-expressam TRAP1 tem uma menor produção de ROS (Hua G., *et al.*, 2007) acompanhada de um aumento da transcrição de genes de receptores acoplados a proteína G e de genes envolvidos na adesão celular, bem como genes associados a família das Rho-GTPases (Liu D., *et al.*, 2010).

A perda da atividade de TRAP1 resultou no aumento do consumo de oxigênio, elevação dos intermediários do ciclo de Krebs e aumento dos níveis de ROS além de suprimir a glicólise aeróbica, correlacionando, assim, esta proteína com um metabolismo fermentativo. Atualmente essa chaperona é considerada como um dos reguladores do *switch* metabólico entre a respiração mitocondrial e a glicólise aeróbica (Yoshida *et al.*, 2013). Desta forma, parece ser coerente que ela seja um alvo (direto ou indireto) das aPKCs, uma vez que a partir dos dados obtidos nessa tese foi possível observar que as aPKCs também estão envolvidas no controle do metabolismo fermentativo versus oxidativo das CTEs. Estudos por Gould e colaboradores observaram, em células tumorais, que de fato a PKC ζ é capaz de interagir com a Hsp90 e a inibição da expressão dessa chaperona foi acompanhada pela degradação da quinase (Gould *et al.*, 2009) sugerindo que ela atue para estabilizar a PKC ζ .

Estudos posteriores irão investigar a interação da TRAP1 com as aPKCs e a consequência da fosforilação da mesma no metabolismo, assim como investigar o efeito da fosforilação dessa chaperona.

Outra chaperona identificada por ter a sua fosforilação reduzida após a inibição das aPKCs foi a **HSP27**. Esta proteína é membro da família das *small* HSP (Ghayour-Mobarhan *et al.*, 2012) e está envolvida no controle da dinâmica do citoesqueleto, embriogênese e diferenciação celular (Mehlen P. *et al.*, 1997). A fosforilação de Hsp27 está associada ao remodelamento de actina e alteração da morfologia celular, sendo esta modificação pós-traducional dependente de PKC (Dokas L.A. *et al.*, 2011).

Dentre os membros da família das chaperonas HSP70, as **HSC70** e **HSC70-interacting protein** foram identificadas por sofrerem uma redução da fosforilação na presença do inibidor das aPKCs. A Hsc70 é uma co-chaperona constitutivamente expressa e está envolvida no controle do ciclo celular, diferenciação e nos estágios iniciais da embriogênese (Liu T. *et al.*, 2012). O tratamento com o PMA, ativador das PKCs clássicas e nóveis, foi capaz de aumentar a expressão da HSC70 através da estabilização do seu mRNA (jacquier-Sarkin M.R. *et al.*, 1995). A expressão da **Hsc70-interacting protein**, responsável por mediar a associação molecular entre as chaperonas Hsc70 e Hsp90, aumentou durante a diferenciação de células de carcinoma embrionário de camundongo induzida por ácido retinóico (Jiao R.Q. *et al.*, 2012). Estudos indicam que a porção carboxi-terminal dessa proteína é capaz de interagir com a PKC ζ durante a ativação da via mediada pelos receptores envolvidos na resposta imune inata e adaptativa (Yang M. *et al.*, 2011).

Dentre as proteínas envolvidas no controle da citocinese, a **Septina-2** e a proteína de cinetocoro **Spc24**, associada ao complexo NDC80, foram identificadas como possíveis alvos das aPKCs. A Septina-2 tem um aumento de expressão durante a formação do anel contrátil durante a progressão da mitose de anáfase para telófase (Silió V. *et al.*, 2007). Esta proteína também está envolvida no

processo de polarização celular, uma vez que a associação entre tubulina e septina facilita o transporte de vesículas através da estabilização da tubulina poliglutamilada, o que leva ao bloqueio da ligação das proteínas associadas ao microtúbulo (MAP4) (Spiliotis E.T. *et al.*, 2008). Atualmente não existem relatos que correlacionem a regulação da atividade de Septina-2 com a sua fosforilação mediada pelas aPKCs. Contudo, como as aPKCs estão envolvidas em dinâmica do citoesqueleto e com polarização é coerente termos encontrado esta proteína no nosso estudo.

Diversos trabalhos demonstram uma interação das aPKCs com o complexo Par (*Partitioning defective complex*), fundamental na interação célula-célula, no controle da polarização celular, divisão assimétrica e regulação da auto-renovação (Wang H. *et al.*, 2006). As Ras-GTPases interagem com o complexo Par (Donninger H. *et al.*, 2010) e juntos estão envolvidas em processos de adesão celular. De fato foram identificadas proteínas moduladoras de GTPases que tem um papel central neste processo e outras envolvendo o remodelamento do citoesqueleto (Baum B & Georgiou M., 2011) como alvos das aPKCs.

5.1.2.2. Proteínas que interagem com a família das Ras-GTPases

A família das proteínas Ras-GTPases estão envolvidas em processos biológicos como adesão célula-célula, polarização celular, transporte de proteínas, vesicular e manutenção do citoesqueleto (Joprdaan S.N. & Canman J.C., 2012). A inibição da fosforilação das proteínas regulatórias Rho-GDI e Rab-GDI foi observada, além da fosforilação da proteína Ran-GTP o que indica a importância funcional dessa subfamília das PKCs na dinâmica do citoesqueleto, fundamental para a manutenção das características das CTE (Costa P. *et al.*, 2012).

Duas enzimas responsáveis por controlar a atividade de proteínas da superfamília Ras-GTPases foram identificadas por sofrerem redução da fosforilação após inibição das CTEs com o peptídeo inibidor das aPKCs: **Rab-GDI β** e **Rho-GDI α** . Estas duas GDIs, apesar de serem estruturalmente diferentes, apresentam similaridade em suas funções biológicas, sendo ambas fundamentais na regulação da atividade das Rho-GTPases (Seabra M.C. & Wasmeier C., 2004). As GDIs são responsáveis por inibir a dissociação do GDP das proteínas Rho; além de se associar com as Rho-GTPases na presença de GTP, e inibindo a atividade GTPase das mesmas bloqueando a interação destas GTPases com seus alvos.

As Rab-GTPases são fundamentais para o controle do transporte de vesículas e sua atividade oscila entre seu estado inativo e ativo, acompanhado pela sua localização citoplasmática e membranar (Pfeffer S.R., 2013). A associação com Rab-GDI mantém essa GTPase em seu estado inativo (Seabra M.C. & Wasmeier C., 2004). Mais estudos são necessários para investigar se Rab-GDI é substrato direto das aPKCs e qual a importância funcional dessa modulação em CTE.

Em contrapartida, Kuribayashi e colaboradores descreveram em 2007 que a PKC ζ é capaz de fosforilar a Rho-GDI, o que reduziu a interação da mesma com a RhoGTPase. A consequente ativação da Rho GTPase levou à polarização celular e o remodelamento do citoesqueleto permitindo também o aumento da motilidade celular em células humanas de carcinoma epidermoide (Kuribayashi K *et al.*, 2007).

5.1.2.3. Proteínas do citoesqueleto

O citoesqueleto, composto por actina, filamentos intermediários e microtúbulos, é responsável pela organização celular interna, morfologia, motilidade e ciclo celular das células eucarióticas (Wickstead B & Gull K, 2011). Dentre as

proteínas do citoesqueleto que sofreram redução da fosforilação após o tratamento com o inibidor das aPKCs, se destacam as isoformas α/β **tubulina**, além das proteínas **TCP-1 β** (*T-complex protein 1 subunit beta*) e da proteína **β -centractina**.

Muitos trabalhos descrevem a importância do complexo protéico mediado pela interação entre a família de proteínas Par e as aPKCs, como o principal mecanismo para o controle da polarização celular e divisão assimétrica (Hao Y. *et al.*, 2010; Galli M *et al.*, 2011; Williams S.E. *et al.*, 2011). Esse controle está diretamente relacionado ao remodelamento do citoesqueleto e polimerização do microtúbulo (Patalano S. *et al.*, 2006; Chabu C. *et al.*, 2009; Mori D. *et al.*, 2010). Entretanto, nenhum trabalho indica que a fosforilação direta das α/β -tubulina são fundamentais para esse processo.

A partir dos resultados obtidos nessa tese foi observado que ocorre uma co-localização entre as aPKCs e α/β -tubulina majoritariamente em células na interfase. Supreendentemente, a co-localização de α -tubulina com outra isoforma das PKCs, a PKC β I, só foi observada em células mitóticas. Estudos anteriores do nosso laboratório haviam detectado a α -tubulina como um alvo da PKC β I (Costa-Junior *et al.*, 2010). Além disso, o sítio referente a essa fosforilação foi identificado com auxílio da *facility* de espectrometria de massa da Stanford University demonstrando que a α -tubulina é um alvo direto da PKC β I. Desta forma investigamos o papel desta fosforilação na dinâmica de polimerização da α -tubulina e em estudos posteriores verificaremos se as aPKCs tem semelhante papel porém durante a interfase. O próximo capítulo da discussão está relacionado à importância funcional da fosforilação de α -tubulina pela PKC β I.

5.2. A importância da PKC β I na fosforilação de α -tubulina

Estudos anteriores do nosso grupo, observaram que o tratamento de CTE com o peptídeo inibidor da PKC β I diminuiu a fosforilação da α - (Costa-Junior *et al.*, 2010). Como apresentamos nos resultados dessa tese, a α -tubulina é um substrato direto da PKC β I, e que dentre outros sítios a PKC β I fosforila a T253 da α -tubulina. T253 não está em uma seqüência consenso linear da PKC e sim conformacional. Através de estudos de dinâmica molecular observamos que T253 quando fosforilada interage com K105 da β -tubulina. Possivelmente, essa modificação pós-traducional auxilia na estabilidade do dímero α - β -tubulina na direção do crescimento do microtúbulo, em eventos celulares onde o controle dinâmico do crescimento do microtúbulo é essencial, como a divisão celular.

As modificações pós-traducionais (PTM) mais bem descritas no microtúbulo são acetilação, detironização, glicilação e glutamilação. Verhey e Gartig acreditam que as diversas PTM observadas na tubulina, podem ser lidas como um código por proteínas que interagem com o microtúbulo. Sendo esse modelo análogo ao observado na cromatina, onde as modificações pós-traducionais em histonas ativam fatores de transcrição específicos para a expressão de determinados genes (Verhey KJ & Gaertig J, 2007).

A fosforilação não é comumente observada em tubulinas, tal como descrito no capítulo anterior, estudos indicam que essa PTM está freqüentemente relacionada à regulação de proteínas associadas ao microtúbulo, MAPS (Janke C. & Bulinski J.C., 2011). Alguns autores hipotetizam que a fosforilação das tubulinas não é importante, uma vez que essa família de proteínas são altamente aniônicas e a introdução de uma carga negativa, oriunda do grupo fosforila, não seria suficiente para modificar a estrutura das mesmas, e por esse motivo novas variantes de PTM,

tais como a glutamilação e poliglicinação, surgiram durante a evolução, onde a introdução de cadeias laterais volumosas e múltiplos resíduos carregados proporcionam mudanças estruturais suficiente para induzir vias de sinalização a partir do microtúbulo (Westermann S. & Weber K, 2003). Entretanto, os resultados obtidos nessa tese e alguns trabalhos discutidos a seguir refutam essa hipótese e sugerem que a fosforilação das tubulinas pode sim ter um efeito na dinâmica dos microtúbulos a estabilidade dos mesmos e conseqüentemente alterar a ligação de outras proteínas ou mesmo das outras PTM.

O primeiro trabalho a descrever a fosforilação de tubulina foi publicado em 1985, onde Gard e Kirschner observaram que a fosforilação de β -tubulina acompanha a diferenciação da linhagem celular de neuroblastoma N115, sendo o primeiro grupo a sinalizar a importância dessa PTM na dinâmica de polimerização do microtúbulo (Gard D.L. *et al.*, 1985). Nessa mesma década, o grupo chefiado por Jesús Avila observou que a fosforilação de tubulina pode ser mediada por uma proteína quinase dependente de calmodulina (Wandosell F. *et al.*, 1987). Além de observar que a fosforilação de α -tubulina, no resíduo de tirosina presente na porção carboxi-terminal, bloqueia a sua incorporação no microtúbulo esta PTM é mediada por uma proteína quinase insulina dependente (Serrano L. *et al.*, 1984). A Syk-quinase também é capaz de fosforilar α -tubulina e aparentemente o efeito desta fosforilação é significativo somente na dinâmica de incorporação do polímero *in vitro* (Faruki S. *et al.*, 2000).

Recentemente, observou-se que Cdk1 é capaz de fosforilar β -tubulina *in vitro* e que esta fosforilação bloqueou a incorporação da β -tubulina ao microtúbulo (Fourest-Lieuvain *et al.*, 2006). Nesta tese, observamos que a fosforilação de α -tubulina pela PKC β I aumenta a sua taxa de polimerização, *in vitro*, além de reduzir a

velocidade de repolimerização do microtúbulo na linhagem CTE E14TG2A, tratada com o peptídeo β IV5-3, inibidor da PKC β I.

5.2.1. A dinâmica do microtúbulo

“Os microtúbulos desempenham um papel essencial na organização de toda a célula eucariótica. Eles são tubos protéicos longos e ocos relativamente rígidos que podem rapidamente sofrer dissociação em um determinado local e reassociação em outro”. (retirado do livro Fundamentos da Biologia Celular, Alberts e colaboradores, página 563, 3 edição, 2011).

Os microtúbulos são formados por estruturas heterodiméricas de α/β -tubulina. Tanto α -tubulina quanto β -tubulina apresentam o nucleotídeo GTP em sua estrutura e o crescimento do polímero ocorre na face positiva do microtúbulo, caracterizada pela alta concentração de tubulina-GTP. A regulação da hidrólise desse nucleotídeo é o principal mecanismo que rege a instabilidade dinâmica do microtúbulo (Wang H.W. & Nogales E., 2005).

Um microtúbulo em crescimento necessita que suas duas extremidades estejam protegidas da despolimerização, onde a face negativa do polímero geralmente está protegida por centros organizadores (centrossomos) e a face positiva é formada pelo CAP de GTP, que é caracterizada pela alta concentração dos heterodímeros de tubulina-GTP. A conformação estrutural da face positiva favorece a adição de novos heterodímeros de tubulina-GTP. Em contrapartida, o processo de despolimerização do microtúbulo ocorre quando a dinâmica de adição dos heterodímeros se torna mais lenta e há hidrólise da tubulina-GTP presente no polímero. A hidrólise do GTP altera a estrutura do polímero levando a sua

desestabilização e conseqüente despolimerização do mesmo. Assim, a dinâmica de polimerização do microtúbulo está intimamente relacionada à estabilidade do polímero (Jonathon H. & Hyman A.A., 2009).

Algumas proteínas e PTM são responsáveis por regular a dinâmica de polimerização/despolimerização dos microtúbulos (Westermann S. & Weber K, 2003). A partir dos dados obtidos nessa tese, somado a alguns trabalhos da literatura, se torna evidente que a fosforilação de tubulina auxilia no controle da estabilidade e dinâmica do microtúbulo.

O resíduo T253 de α -tubulina foi identificado como sendo fosforilado pela PKC β I, este encontra-se na interface entre a α -tubulina e a β -tubulina, na região positiva de crescimento do polímero próximo ao sítio de ligação do GDP/GTP. Estudos de dinâmica molecular demonstraram que a T253 fosforilado interage com K105 de β -tubulina, aumentando a entalpia de ligação entre α - e β -tubulina, em presença de GDP. Dessa maneira, a fosforilação poderia ajudar a estabilizar a ligação GDP ao polímero. Em adição, o mutante fosfomimético GFP- α -tubulina-T253E foi mais incorporado no fuso mitótico quando comparado à tubulina selvagem (GFP-- α -tubulina- Selvagem) e ao mutante GFP- α -tubulina-T253A. Enquanto o mutante GFP- α -tubulina-T253A foi menos incorporado do que GFP- α -tubulina-selvagem, sustentando a hipótese que a fosforilação de T253 contribui para a estabilização de dímeros α/β -tubulina na face de crescimento do microtúbulo.

Considerando que a dinâmica do microtúbulo está intrinsicamente correlacionada à hidrólise do GTP (Jonathon H. & Hyman A.A., 2009), uma das alternativas para induzir a despolimerização do microtúbulo é através do tratamento com nocodazol. O nocodazol, um importante agente antineoplásico, é capaz de interagir com o dímero de tubulina e induzir a hidrólise do GTP (Vasquez R.J. *et al.*,

1997). Dessa maneira, a despolimerização do microtubulo é uma consequência gerada pela desestabilidade do polímero de tubulina-GDP. Os mutantes de GFP- α -tubulina tratados com nocodazol, apresentaram diferentes taxas de despolimerização. O mutante contendo GFP- α -tubulina-T253A apresentou uma taxa de despolimerização semelhante ao da construção GFP- α -tubulina-Selvagem, ao passo que, o mutante fosfomimético GFP- α -tubulina-T253E apresentou uma menor taxa de despolimerização. Esses resultados corroboram os dados discutidos anteriormente que indicam que a fosforilação do resíduo T253 é importante para estabilizar o polímero de tubulina-GDP.

5.2.2. O conceito de um sítio consenso para a PKC estruturalmente formado

Poucos substratos das PKCs têm sido identificados e as estratégias comumente exploradas procuram seqüências consenso lineares reconhecidas pela PKC para esse propósito (Brinkworth R. *et al.*, 2003). Knighton D.R. e colaboradores foi o primeiro grupo a observar que o sítio catalítico das PKCs apresentam uma maior afinidade para resíduos de aminoácidos básicos próximos à serina/treonina fosforilada (Knighton D.R. *et al.*, 1991). Nesta tese foi identificado um novo sítio de fosforilação da PKC β I na α -tubulina, a T253. Supreendentemente, este sítio não está localizado em uma seqüência linear consenso da PKC, na verdade, aminoácidos básicos são encontrados adjacentes a T253.

A análise da estrutura terciária da α -tubulina demonstrou que resíduos básicos (K163/K164) se aproximam da T253, formando um consenso estrutural, muito semelhante ao peptídeo linear inibidor da PKA, denominado de PKI, que contém um motivo consenso linear para PKA/C (Brinkworth R. *et al.*, 2003; Souujon

M. *et al.*, 1998). Os resultados obtidos nessa tese foram os primeiros a demonstrar que a estrutura terciária deve ser considerada quando analisamos potenciais sítios de fosforilação das quinase.

Sítios putativos de fosforilação, contendo motivos consenso, devem ser avaliados com relação a sua posição na estrutura terciária da proteína. Dentre os exemplos que merecem destaque, Abeyweera e colaboradores, em 2009, exploraram um sítio de fosforilação putativo da PKC α em α -tubulina, a S165 (Abeyweera T.P. *et al.*, 2009). Essa serina encontra-se em uma região consenso de fosforilação para PKC e a mutação de S165 por um ácido aspártico D, fosfomimético, induziu um aumento da motilidade em células de tumores de mama, o que foi justificado por um aumento na dinâmica de polimerização do microtúbulo, ao passo que, a mutação S165N teve o efeito contrário. Entretanto, ao avaliar a posição de S165 na α -tubulina, é possível observar que esta serina não está acessível à interação com a PKC, na estrutura terciária sendo dificilmente passível de fosforilação. Nestes estudos, não foi detectada a fosforilação deste resíduo, sendo considerado somente um efeito do fosfomimético na dinâmica da motilidade celular (Abeyweera T.P. *et al.*, 2009). Estudos de dinâmica molecular realizados por nossos colaboradores demonstram que uma alteração de carga neste resíduo, pela adição de um ácido aspártico, por exemplo, levaria a uma desestabilização do microtúbulo, o que pode ter possivelmente, acarretado um aumento na migração celular. Desta forma, nossas análises sugerem que apesar de conter uma sequência consenso para as PKCs, a S165 não seria um sítio de fosforilação da PKC na α -tubulina e sim a T253 um sítio consenso formado estruturalmente.

Outras proteínas podem ser passíveis de formarem sítios estruturais consenso de fosforilação. Estudos anteriores demonstraram que a

acetilcolinesterase, um substrato da PKA, tem um sítio de fosforilação consenso para a PKA, entretanto a mutação deste sítio consenso não impediu a fosforilação acetilcolinesterase pela PKA (Grifman M. *et al.*, 1997). Cabe destacar, que diversos sítios consensos para a PKA formados estruturalmente foram encontrados na acetilcolinesterase o que justificaria uma continuada fosforilação da mesma pela PKA, apesar da mutação do sítio consenso linear (Grifman M. *et al.*, 1997). Nessa tese, a identificação do sítio de fosforilação foi obtido a partir da fosforilação de α -tubulina pela PKC β I *in vitro*, infelizmente a identificação desse resíduo fosforilado *in vivo* ainda não foi possível, como uma das abordagens foi utilizado técnicas de imunoprecipitação de α -tubulina em células super-expressando PKC β I, seguida da análise em espectrometria de massas utilizando o equipamento orbitrap.

Os dados gerados nessa tese sugerem que a fosforilação do resíduo T253 é um dos mecanismos que a célula eucariótica encontra de controlar a dinâmica e estabilidade de microtubulo. A ocorrência dessa fosforilação durante a divisão celular reforça nossa hipótese, uma vez que é durante a mitose que o ajuste fino da dinâmica do microtúbulo se faz importante.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

A identificação de alvos das PKCs, utilizando moduladores específicos para as diferentes isoenzimas, bem como a caracterização dos sítios de fosforilação dos mesmos, no modelo de célula tronco indiferenciada, são fundamentais para compreender melhor os mecanismos que regem as características das CTE. Além de técnicas exploratórias, como o fosfoproteoma, capaz de gerar um grande número de informações a respeito das diferentes vias de sinalização reguladas a partir de uma modulação específica, se faz mister investigar os substratos identificados.

Os resultados obtidos na primeira parte desta tese indicam a importância das aPKCs em vias metabólicas que vem sendo descritas como fundamentais para a manutenção da auto-renovação e diferenciação celular. Através do estudo desenvolvido na segunda parte desta tese foi possível concluir que a identificação de novos sítios de fosforilação modulados pelas PKCs são fundamentais para o entendimento da dinâmica funcional dos substratos.

Dessa maneira os resultados expostos anteriormente podem ser resumidamente concluídos nos seguintes tópicos:

1. A modulação das aPKCs induziu a redução da fosforilação de dois importantes grupos de proteínas responsáveis por regular a auto-renovação das CTE: (i) proteínas envolvidas no metabolismo celular, como proteínas da via glicolítica, via das pentoses, biossíntese de serina, ciclo de Krebs e atividade mitocondrial; (ii) proteínas envolvidas na manutenção do citoesqueleto, polarização e adesão celular.

2. A inibição das aPKCs induziu uma redução no consumo de glicose e na produção de lactato aumentou o consumo de oxigênio e a capacidade respiratória total.

3. A co-localização da α -tubulina e da PKC β I ocorre majoritariamente em células em mitose e a fosforilação do resíduo T253 da α -tubulina auxilia a estabilidade e a dinâmica de polimerização do microtúbulo.

4. A fosforilação de α -tubulina pela PKC β I ocorre em um sítio consenso estrutural, ressaltando a importância da análise da estrutura terciária das proteínas, frequentemente ignorada, na predição dos sítios de fosforilação.

Como perspectivas futuras, os resultados gerados nesta tese permitem inferir que a investigação exploratória das vias de sinalização geram um leque de dados que serão consolidados por estudos aprofundados caracterizando cada substrato encontrado .

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

- Abeyweera TP, Chen X, Rotenberg SA. Phosphorylation of alpha6-tubulin by protein kinase Calpha activates motility of human breast cells. *J Biol Chem*. 2009 Jun 26;284(26):17648-56
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science; 2002.
- Alberts, B. *Fundamentos da biologia celular*. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011
- Altieri DC, Stein GS, Lian JB, Languino LR. TRAP-1, the mitochondrial Hsp90. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Mar;1823(3):767-73. doi: 10.1016/j.bbamcr.2011.08.007. Epub 2011 Aug 22.
- Anastasea-Vlachou C., Cassimos C., Messaritakis J., Papadaki E. A case of stem cell leukemia occurring in an infant 38 days old. *Ann Paediatr*. 1961;196:310-5. No abstract available.
- Anlyan A.J. Beta-Glucuronidase studies in stem-cell leukemias. *Cancer*. 1954 Mar;7(2):391-3. No abstract available.
- Annas GJ, Caplan A, Elias S. Stem cell politics, ethics and medical progress. *Nat Med*. 1999 Dec;5(12):1339-41.
- Ata H, Rawat DK, Lincoln T, Gupte SA. Mechanism of glucose-6-phosphate dehydrogenase-mediated regulation of coronary artery contractility. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011 Jun;300(6):H2054-63.
- Auletta JJ, Bartholomew AM, Maziarz RT, Deans RJ, Miller RH, Lazarus HM, Cohen JA. The potential of mesenchymal stromal cells as a novel cellular therapy for multiple sclerosis. *Immunotherapy*. 2012 May;4(5):529-47.

- Ausubal F M, Brent R, Kingston R E, et al., editors. John Wiley & Sons; New York, NY: 1994. p. 10.6.3. Current Protocols in Molecular Biology .
- Banan A, Zhang LJ, Farhadi A, Fields JZ, Shaikh M, Forsyth CB, Choudhary S, Keshavarzian A. Critical role of the atypical $\{\lambda\}$ isoform of protein kinase C (PKC- $\{\lambda\}$) in oxidant-induced disruption of the microtubule cytoskeleton and barrier function of intestinal epithelium. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005 Feb;312(2):458-71. Epub 2004 Sep 3.
- Bandyopadhyay G, Standaert ML, Sajan MP, Kanoh Y, Miura A, Braun U, Kruse F, Leitges M, Farese RV. Protein kinase C-lambda knockout in embryonic stem cells and adipocytes impairs insulin-stimulated glucose transport *Mol Endocrinol.* 2004 Feb;18(2):373-83.
- Baum B, Georgiou M. Dynamics of adherens junctions in epithelial establishment, maintenance, and remodeling. *J Cell Biol.* 2011 Mar 21;192(6):907-17. doi: 10.1083/jcb.201009141.
- Bayley JP, Devilee P. The Warburg effect in 2012. *Curr Opin Oncol.* 2012 Jan;24(1):62-7.
- Beale MH, Ward JL, Baker JM. Establishing substantial equivalence: metabolomics. *Methods Mol Biol.* 2009;478:289-303.
- Begum N, Sussman KE, Draznin B. Calcium-induced inhibition of phosphoserine phosphatase in insulin target cells is mediated by the phosphorylation and activation of inhibitor 1. *J Biol Chem.* 1992 Mar 25;267(9):5959-63.
- Bellin M, Marchetto MC, Gage FH, Mummery CL. Induced pluripotent stem cells: the new patient? *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012 Nov;13(11):713-26.
- Bensinger SJ, Christofk HR. New aspects of the Warburg effect in cancer cell biology. *Semin Cell Dev Biol.* 2012 Jun;23(4):352-61

- Berra, E., et al. Evidence for a role of MEK and MAPK during signal transduction by protein kinase C. *EMBO J.* 1995. (14): 6157–63
- Binétruy B, Heasley L, Bost F, Caron L, Aouadi M. Concise review: regulation of embryonic stem cell lineage commitment by mitogen-activated protein kinases. *Stem Cells.* 2007 May;25(5):1090-5.
- Black MM, Keyser P. Acetylation of alpha-tubulin in cultured neurons and the induction of alpha-tubulin acetylation in PC12 cells by treatment with nerve growth factor. *J Neurosci.* 1987 Jun;7(6):1833-42.
- Boeckmann B, Blatter MC, Famiglietti L, Hinz U, Lane L, Roechert B, Bairoch A. Protein variety and functional diversity: Swiss-Prot annotation in its biological context. *C R Biol.* 2005 Oct-Nov;328(10-11):882-99.
- Bracha AL, Ramanathan A, Huang S, Ingber DE, Schreiber SL. Carbon metabolism-mediated myogenic differentiation. *Nat Chem Biol.* 2010 Mar;6(3):202-204.
- Brien P, Pugazhendhi D, Woodhouse S, Oxley D, Pell JM. P38 α MAPK Regulates Adult Muscle Stem Cell Fate By Restricting Progenitor Proliferation During Postnatal Growth And Repair. *Stem Cells.* 2013 Apr 17.
- Briest F, Berndt A, Clement J, Junker K, Eggeling Fv, Grimm S, Friedrich K. Tumor-stroma interactions in tumorigenesis: lessons from stem cell biology. *Front Biosci (Elite Ed).* 2012 Jan 1;4:1871-87.
- Brinkworth RI, Breinl RA, Kobe B. Structural basis and prediction of substrate specificity in protein serine/threonine kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Jan 7;100(1):74-9.
- Campbell CS, Caperuto LC, Hirata AE, Araujo EP, Velloso LA, Saad MJ, Carvalho CR. The phosphatidylinositol/AKT/atypical PKC pathway is involved in the

improved insulin sensitivity by DHEA in muscle and liver of rats in vivo. *Life Sci.* 2004 Nov 19;76(1):57-70.

- Cappellini MD, Fiorelli G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Lancet.* 2008 Jan 5;371(9606):64-74. doi: 10.1016/S0140-6736(08)60073-2.

- Cartwright P, McLean C, Sheppard A, Rivett D, Jones K, Dalton S. LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. *Development.* 2005 Mar;132(5):885-96. Epub 2005 Jan 26.

- Cervera RP, Stojkovic M. Developments and challenges in human embryonic stem cell research in Spain. *Stem Cell Rev.* 2009 Dec;5(4):334-9. doi: 10.1007/s12015-009-9093-x.

- Chabu C, Doe CQ. Twins/PP2A regulates aPKC to control neuroblast cell polarity and self-renewal. *Dev Biol.* 2009 Jun 15;330(2):399-405. doi: 10.1016/j.ydbio.2009.04.014.

- Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, Smith A. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell.* 2003 May 30;113(5):643-55.

- Chance B, Williams G.R The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Adv Enzymol Relat Subj Biochem.* 1956;17:65-134.

- Chen J, Zhang M. The Par3/Par6/aPKC complex and epithelial cell polarity. *Exp Cell Res.* 2013 Mar 25. pii: S0014-4827(13)00129-8

- Chen L, Annis I, Barany G. Disulfide bond formation in peptides. *Curr Protoc Protein Sci.* 2001 May;Chapter 18:Unit18.6.

- Chen L, Hahn H, Wu G, Chen CH, Liron T, Schechtman D, Cavallaro G, Banci L, Guo Y, Bolli R, Dorn GW 2nd, Mochly-Rosen D. Opposing cardioprotective

actions and parallel hypertrophic effects of delta PKC and epsilon PKC. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Sep 25;98(20):11114-9.

- Chen S, Lewallen M, Xie T. Adhesion in the stem cell niche: biological roles and regulation. *Development*. 2013 Jan 15;140(2):255-65.

- Chen X, Xu H, Yuan P, Fang F, Huss M, Vega VB, Wong E, Orlov YL, Zhang W, Jiang J, Loh YH, Yeo HC, Yeo ZX, Narang V, Govindarajan KR, Leong B, Shahab A, Ruan Y, Bourque G, Sung WK, Clarke ND, Wei CL, Ng HH. Integration of external signaling pathways with the core transcriptional network in embryonic stem cells. *Cell*. 2008 Jun 13;133(6):1106-17.

- Cheng MB, Zhang Y, Zhong X, Sutter B, Cao CY, Chen XS, Cheng XK, Zhang Y, Xiao L, Shen YF. Stat1 mediates an auto-regulation of hsp90beta gene in heat shock response. *Cell Signal*. 2010 Aug;22(8):1206-13.

- Cheng Z, Ristow M. Mitochondria and Metabolic Homeostasis. *Antioxid Redox Signal*. 2013 Mar 28.

- Chihara-Nakashima M, Hashimoto E, Nishizuka Y. Intrinsic activity of guanosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase similar to adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase. II. Phosphorylation of ribosomal proteins. *J Biochem*. 1977 Jun;81(6):1863-7.

- Cho YM, Kwon S, Pak YK, Seol HW, Choi YM, Park do J, Park KS, Lee HK. Dynamic changes in mitochondrial biogenesis and antioxidant enzymes during the spontaneous differentiation of human embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Oct 6;348(4):1472-8.

- Choi SW, Gerencser AA, Nicholls DG. Bioenergetic analysis of isolated cerebrocortical nerve terminals on a microgram scale: spare respiratory capacity and stochastic mitochondrial failure. *J Neurochem*. 2009 May;109(4):1179-91.

- Chowdhury SK, Raha S, Tarnopolsky MA, Singh G. Increased expression of mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase and antioxidant enzymes in prostate cancer cell lines/cancer. *Free Radic Res.* 2007 Oct;41(10):1116-24.
- Chung S, Arrell DK, Faustino RS, Terzic A, Dzeja PP. Glycolytic network restructuring integral to the energetics of embryonic stem cell cardiac differentiation. *J Mol Cell Cardiol.* 2010 Apr;48(4):725-34.
- Chung S, Dzeja PP, Faustino RS, Perez-Terzic C, Behfar A, Terzic A. Mitochondrial oxidative metabolism is required for the cardiac differentiation of stem cells. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2007 Feb;4 Suppl 1:S60-7.
- Cohen P. The role of protein phosphorylation in human health and disease. The Sir Hans Krebs Medal Lecture. *Eur J Biochem.* 2001 Oct;268(19):5001-10.
- Costa P, Almeida FV, Connelly JT. Biophysical signals controlling cell fate decisions: how do stem cells really feel? *Int J Biochem Cell Biol.* 2012 Dec;44(12):2233-7.
- Costa-Junior HM, Garavello NM, Duarte ML, Berti DA, Glaser T, de Andrade A, Labate CA, Ferreira AT, Perales JE, Xavier-Neto J, Krieger JE, Schechtman D. Phosphoproteomics profiling suggests a role for nuclear β IPKC in transcription processes of undifferentiated murine embryonic stem cells. *J Proteome Res.* 2010 Dec 3;9(12):6191-206.
- Costa-Junior HM, Suetsugu MJ, Krieger JE, Schechtman D. Specific modulation of protein kinase activity via small peptides. *Regul Pept.* 2009 Feb 25;153(1-3):11-8.
- Dard N, Le T, Maro B, Louvet-Vallée S. Inactivation of aPKC λ reveals a context dependent allocation of cell lineages in preimplantation mouse embryos. *PLoS One.* 2009 Sep 21;4(9):e7117

- DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab.* 2008 Jan;7(1):11-20.
- Dehghani H, Hahnel AC. Expression profile of protein kinase C isozymes in preimplantation mouse development. *Reproduction.* 2005 Oct;130(4):441-51.
- Derfus GE, Abramzon D, Tung M, Chang D, Kiss R, Amanullah A. Cell culture monitoring via an auto-sampler and an integrated multi-functional off-line analyzer. *Biotechnol Prog.* 2010 Jan-Feb;26(1):284-92.
- Deshayes S, Morris MC, Divita G, Heitz F. Cell-penetrating peptides: tools for intracellular delivery of therapeutics. *Cell Mol Life Sci.* 2005 Aug;62(16):1839-49.
- Díaz-Ramos A, Roig-Borrellas A, García-Melero A, López-Alemanly R. α -Enolase, a multifunctional protein: its role on pathophysiological situations. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012:156795
- Dokas LA, Malone AM, Williams FE, Nauli SM, Messer WS Jr. Multiple protein kinases determine the phosphorylated state of the small heat shock protein, HSP27, in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *europarmacology.* 2011 Jul-Aug;61(1-2):12-24.
- Donninger H, Hesson L, Vos M, Beebe K, Gordon L, Sidransky D, Liu JW, Schlegel T, Payne S, Hartmann A, Latif F, Clark GJ. The Ras effector RASSF2 controls the PAR-4 tumor suppressor. *Mol Cell Biol.* 2010 Jun;30(11):2608-20.
- Durek P, Schudoma C, Weckwerth W, Selbig J, Walther D. Detection and characterization of 3D-signature phosphorylation site motifs and their contribution towards improved phosphorylation site prediction in proteins. *BMC Bioinformatics.* 2009 Apr 21;10:117.

- Düvel K, Yecies JL, Menon S, Raman P, Lipovsky AI, Souza AL, Triantafellow E, Ma Q, Gorski R, Cleaver S, Vander Heiden MG, MacKeigan JP, Finan PM, Clish CB, Murphy LO, Manning BD. Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. *Mol Cell*. 2010 Jul 30;39(2):171-83.
- Eder AM, Sui X, Rosen DG, Nolden LK, Cheng KW, Lahad JP, Kango-Singh M, Lu KH, Warneke CL, Atkinson EN, Bedrosian I, Keyomarsi K, Kuo WL, Gray JW, Yin JC, Liu J, Halder G, Mills GB. Atypical PKC α contributes to poor prognosis through loss of apical-basal polarity and cyclin E overexpression in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Aug 30;102(35):12519-24
- Eigenbrodt E, Basenau D, Holthusen S, Mazurek S, Fischer G. Quantification of tumor type M2 pyruvate kinase (Tu M2-PK) in human carcinomas. *Anticancer Res*. 1997 Jul-Aug;17(4B):3153-6.
- Emily M, Mailund T, Hein J, Schausser L, Schierup MH. Using biological networks to search for interacting loci in genome-wide association studies. *Eur J Hum Genet*. 2009 Oct;17(10):1231-40.
- Estrela JM, Ortega A, Obrador E. Glutathione in cancer biology and therapy. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2006;43(2):143-81.
- Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981 Jul 9;292(5819):154-6.
- Fan GC. Role of heat shock proteins in stem cell behavior. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2012;111:305-22.
- Farese RV, Sajan MP. Atypical protein kinase C in cardiometabolic abnormalities. *Curr Opin Lipidol*. 2012 Jun;23(3):175-81

- Faruki S, Geahlen RL, Asai DJ. Syk-dependent phosphorylation of microtubules in activated B-lymphocytes. *J Cell Sci.* 2000 Jul;113 (Pt 14):2557-65.
- Feliciano P. PKC ζ is a metabolic tumor suppressor. *Nature* 2013 Mar; 45 (3): 233
- Feron O. Pyruvate into lactate and back: from the Warburg effect to symbiotic energy fuel exchange in cancer cells. *Radiother Oncol.* 2009 Sep;92(3):329-33
- Folmes CD, Nelson TJ, Martinez-Fernandez A, Arrell DK, Lindor JZ, Dzeja PP, Ikeda Y, Perez-Terzic C, Terzic A. Somatic oxidative bioenergetics transitions into pluripotency-dependent glycolysis to facilitate nuclear reprogramming. *Cell Metab.* 2011 Aug 3;14(2):264-71
- Folmes CD, Nelson TJ, Terzic A. Energy metabolism in nuclear reprogramming. *Biomark Med.* 2011 Dec;5(6):715-29.
- Fornazari M, Nascimento IC, Nery AA, da Silva CC, Kowaltowski AJ, Ulrich H. Neuronal differentiation involves a shift from glucose oxidation to fermentation. *J Bioenerg Biomembr.* 2011 Oct;43(5):531-9.
- Forristal CE, Christensen DR, Chinnery FE, Petruzzelli R, Parry KL, Sanchez-Elsner T, Houghton FD. Environmental oxygen tension regulates the energy metabolism and self-renewal of human embryonic stem cells. *PLoS One.* 2013 May 6;8(5):e62507.
- Fourest-Lieuvin A, Peris L, Gache V, Garcia-Saez I, Juillan-Binard C, Lantéz V, Job D. Microtubule regulation in mitosis: tubulin phosphorylation by the cyclin-dependent kinase Cdk1. *Mol Biol Cell.* 2006 Mar;17(3):1041-50.

- Franquesa M, Hoogduijn MJ, Baan CC. The impact of mesenchymal stem cell therapy in transplant rejection and tolerance. *Curr Opin Organ Transplant*. 2012 Aug;17(4):355-61.
- Fukushima N, Furuta D, Hidaka Y, Moriyama R, Tsujiuchi T. Post-translational modifications of tubulin in the nervous system. *J Neurochem*. 2009 May;109(3):683-93
- Galli M, Muñoz J, Portegijs V, Boxem M, Grill SW, Heck AJ, van den Heuvel S. aPKC phosphorylates NuMA-related LIN-5 to position the mitotic spindle during asymmetric division. *Nat Cell Biol*. 2011 Aug 21;13(9):1132-8. doi: 10.1038/ncb2315.
- Gao X, Wang H, Yang JJ, Liu X, Liu ZR Pyruvate kinase M2 regulates gene transcription by acting as a protein kinase. *Mol Cell*. 2012 Mar 9;45(5):598-609.
- García-Rocha M, Avila J, Lozano J. The zeta isozyme of protein kinase C binds to tubulin through the pseudosubstrate domain. *Exp Cell Res*. 1997 Jan 10;230(1):1-8.
- Gard DL, Kirschner MW. A polymer-dependent increase in phosphorylation of beta-tubulin accompanies differentiation of a mouse neuroblastoma cell line. *J Cell Biol*. 1985 Mar;100(3):764-74.
- Gardner RL, Edwards RG. Control of the sex ratio at full term in the rabbit by transferring sexed blastocysts. *Nature*. 1968 Apr 27;218(5139):346-9.
- Geraldès P, King GL. Activation of protein kinase C isoforms and its impact on diabetic complications. *Circ Res*. 2010 Apr 30;106(8):1319-31.
- Gerhartz C, Heesel B, Sasse J, Hemmann U, Landgraf C, Schneider-Mergener J, Horn F, Heinrich PC, Graeve L. Differential activation of acute phase response factor/STAT3 and STAT1 via the cytoplasmic domain of the interleukin 6

signal transducer gp130. I. Definition of a novel phosphotyrosine motif mediating STAT1 activation. *J Biol Chem.* 1996 May 31;271(22):12991-8.

- Ghayour-Mobarhan M, Saber H, Ferns GA. The potential role of heat shock protein 27 in cardiovascular disease. *Clin Chim Acta.* 2012 Jan 18;413(1-2):15-24.

- Gokhale PJ, Andrews PW. The development of pluripotent stem cells. *Curr Opin Genet Dev.* 2012 Oct;22(5):403-8.

- Gould CM, Kannan N, Taylor SS, Newton AC. The chaperones Hsp90 and Cdc37 mediate the maturation and stabilization of protein kinase C through a conserved PXXP motif in the C-terminal tail. *J Biol Chem.* 2009 Feb 20;284(8):4921-35.

- Grant CM. Metabolic reconfiguration is a regulated response to oxidative stress. *J Biol.* 2008;7(1):1

- Grifman M, Arbel A, Ginzberg D, Glick D, Elgavish S, Shaanan B, Soreq H. In vitro phosphorylation of acetylcholinesterase at non-consensus protein kinase A sites enhances the rate of acetylcholine hydrolysis. *Brain Res Mol Brain Res.* 1997 Nov;51(1-2):179-87.

- Gupta V, Bamezai RN. Human pyruvate kinase M2: a multifunctional protein. *Protein Sci.* 2010 Nov;19(11):2031-44

- Gupte RS, Ata H, Rawat D, Abe M, Taylor MS, Ochi R, Gupte SA. Glucose-6-phosphate dehydrogenase is a regulator of vascular smooth muscle contraction. *Antioxid Redox Signal.* 2011 Feb 15;14(4):543-58.

- Hao Y, Du Q, Chen X, Zheng Z, Balsbaugh JL, Maitra S, Shabanowitz J, Hunt DF, Macara IG. Par3 controls epithelial spindle orientation by aPKC-mediated phosphorylation of apical Pins. *Curr Biol.* 2010 Oct 26;20(20):1809-18.

- Harris TJ, Peifer M. aPKC controls microtubule organization to balance adherens junction symmetry and planar polarity during development. *Dev Cell*. 2007 May;12(5):727-38.
- Hashemi A, Roohvand F, Ghahremani MH, Aghasadeghi MR, Vahabpour R, Motevau F, Memarnejadian A. Optimization of transfection methods for Huh-7 and Vero cells: comparative study. *Tsitol Genet*. 2012 Nov-Dec;46(6):19-27.
- Heo JS, Lee MY, Han HJ. Sonic hedgehog stimulates mouse embryonic stem cell proliferation by cooperation of Ca²⁺/protein kinase C and epidermal growth factor receptor as well as Gli1 activation. *Stem Cells*. 2007 Dec;25(12):3069-80.
- Ho HY, Cheng ML, Chiu DT. Glucose-6-phosphate dehydrogenase--from oxidative stress to cellular functions and degenerative diseases. *Redox Rep*. 2007;12(3):109-18.
- Hong SS, Gibney GT, Esquilin M, Yu J, Xia Y. Effect of protein kinases on lactate dehydrogenase activity in cortical neurons during hypoxia. *Brain Res*. 2004 May 29;1009(1-2):195-202.
- Howard J, Hyman AA. Growth, fluctuation and switching at microtubule plus ends. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009 Aug;10(8):569-74.
- Hsu PP, Sabatini DM. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell*. 2008 Sep 5;134(5):703-7
- Hua G, Zhang Q, Fan Z. Heat shock protein 75 (TRAP1) antagonizes reactive oxygen species generation and protects cells from granzyme M-mediated apoptosis. *J Biol Chem*. 2007 Jul 13;282(28):20553-60.
- Huang JB, Espinoza J, Romero R, Petty HR. Transaldolase is part of a supramolecular complex containing glucose-6-phosphate dehydrogenase in human

neutrophils that undergoes retrograde trafficking during pregnancy. *Metabolism*. 2005 Aug;54(8):1027-33.

- Hutchins AP, Robson P. Unraveling the human embryonic stem cell phosphoproteome. *Cell Stem Cell*. 2009 Aug 7;5(2):126-8.

- Iden S, Misselwitz S, Peddibhotla SS, Tuncay H, Rehder D, Gerke V, Robenek H, Suzuki A, Ebnet K. aPKC phosphorylates JAM-A at Ser285 to promote cell contact maturation and tight junction formation. *J Cell Biol*. 2012 Mar 5;196(5):623-39

- Iglesias-García O, Pelacho B, Prósper F. Induced pluripotent stem cells as a new strategy for cardiac regeneration and disease modeling. *J Mol Cell Cardiol*. 2013 Apr 30. pii: S0022-2828(13)00153-3.

- Ishiuchi T, Takeichi M. Willin and Par3 cooperatively regulate epithelial apical constriction through aPKC-mediated ROCK phosphorylation *Nat Cell Biol*. 2011 Jun 19;13(7):860-6.

- Isobe K, Cheng Z, Ito S, Nishio N. Aging in the mouse and perspectives of rejuvenation through induced pluripotent stem cells (iPSCs). *Results Probl Cell Differ*. 2012;55:413-27.

- Jacquier-Sarlin MR, Jornot L, Polla BS. Differential expression and regulation of hsp70 and hsp90 by phorbol esters and heat shock. *J Biol Chem*. 1995 Jun 9;270(23):14094-9.

- Janke C, Bulinski JC. Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: mechanisms and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011 Nov 16;12(12):773-86.

- Janke C, Bulinski JC. Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: mechanisms and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011 Nov 16;12(12):773-86.
- Jiao RQ, Li G, Chiu JF. Comparative proteomic analysis of differentiation of mouse F9 embryonic carcinoma cells induced by retinoic acid. *J Cell Biochem.* 2012 Jun;113(6):1811-9.
- Jordan SN, Canman JC. Rho GTPases in animal cell cytokinesis: an occupation by the one percent. *Cytoskeleton (Hoboken).* 2012 Nov;69(11):919-30.
- Kanehisa M, Goto S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* 2000 Jan 1;28(1):27-30.
- Kemp BE, Pearson RB. Intrasteric regulation of protein kinases and phosphatases. *Biochim Biophys Acta.* 1991 Aug 13;1094(1):67-76.
- Kim W, Liao LM. IDH mutations in human glioma. *Neurosurg Clin N Am.* 2012 Jul;23(3):471-80.
- Kinehara M, Kawamura S, Tateyama D, Suga M, Matsumura H, Mimura S, Hirayama N, Hirata M, Uchio-Yamada K, Kohara A, Yanagihara K, Furue MK. Protein kinase C regulates human pluripotent stem cell self-renewal. *PLoS One.* 2013;8(1):e54122
- Kirby LA, Schott JT, Noble BL, Mendez DC, Caseley PS, Peterson SC, Routledge TJ, Patel NV. Glycogen synthase kinase 3 (GSK3) inhibitor, SB-216763, promotes pluripotency in mouse embryonic stem cells. *PLoS One.* 2012;7(6):e39329.
- Kisseleva T, Bhattacharya S, Braunstein J, Schindler CW. Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene.* 2002 Feb 20;285(1-2):1-24.

- Knighton DR, Zheng JH, Ten Eyck LF, Xuong NH, Taylor SS, Sowadski JM. Structure of a peptide inhibitor bound to the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science*. 1991 Jul 26;253(5018):414-20.

- Kondo T, Asai M, Tsukita K, Kutoku Y, Ohsawa Y, Sunada Y, Imamura K, Egawa N, Yahata N, Okita K, Takahashi K, Asaka I, Aoi T, Watanabe A, Watanabe K, Kadoya C, Nakano R, Watanabe D, Maruyama K, Hori O, Hibino S, Choshi T, Nakahata T, Hioki H, Kaneko T, Naitoh M, Yoshikawa K, Yamawaki S, Suzuki S, Hata R, Ueno S, Seki T, Kobayashi K, Toda T, Murakami K, Irie K, Klein WL, Mori H, Asada T, Takahashi R, Iwata N, Yamanaka S, Inoue H. Modeling Alzheimer's disease with iPSCs reveals stress phenotypes associated with intracellular A β and differential drug responsiveness. *Cell Stem Cell*. 2013 Apr 4;12(4):487-96.

- Kondoh H, Leonart ME, Bernard D, Gil J. Protection from oxidative stress by enhanced glycolysis; a possible mechanism of cellular immortalization. *Histol Histopathol*. 2007 Jan;22(1):85-90.

- Korur S, Huber RM, Sivasankaran B, Petrich M, Morin P Jr, Hemmings BA, Merlo A, Lino MM. GSK3beta regulates differentiation and growth arrest in glioblastoma. *PLoS One*. 2009 Oct 13;4(10):e7443.

- Kosaka Y, Ogita K, Ase K, Nomura H, Kikkawa U, Nishizuka Y. The heterogeneity of protein kinase C in various rat tissues. *Biochem Biophys Res Commun*. 1988 Mar 30;151(3):973-81.

- Kota V, Rai P, Weitzel JM, Middendorff R, Bhande SS, Shivaji S. Role of glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2 in mouse sperm capacitation. *Mol Reprod Dev*. 2010 Sep;77(9):773-83.

- Kshitiz, Park J, Kim P, Helen W, Engler AJ, Levchenko A, Kim DH. Control of stem cell fate and function by engineering physical microenvironments. *Integr Biol (Camb)*. 2012 Sep;4(9):1008-18.

- Kuribayashi K, Nakamura K, Tanaka M, Sato T, Kato J, Sasaki K, Takimoto R, Kogawa K, Terui T, Takayama T, Onuma T, Matsunaga T, Niitsu Y. Essential role of protein kinase C zeta in transducing a motility signal induced by superoxide and a chemotactic peptide, fMLP. *J Cell Biol*. 2007 Mar 26;176(7):1049-60.

- Lachaise F, Martin G, Drougard C, Perl A, Vuillaume M, Wegnez M, Sarasin A, Daya-Grosjean L. Relationship between posttranslational modification of transaldolase and catalase deficiency in UV-sensitive repair-deficient xeroderma pigmentosum fibroblasts and SV40-transformed human cells. *Free Radic Biol Med*. 2001 Jun 15;30(12):1365-73.

- Langbein S, Zerilli M, Zur Hausen A, Staiger W, Rensch-Boschert K, Lukan N, Popa J, Ternullo MP, Steidler A, Weiss C, Grobholz R, Willeke F, Alken P, Stassi G, Schubert P, Coy JF. Expression of transketolase TKTL1 predicts colon and urothelial cancer patient survival: Warburg effect reinterpreted. *Br J Cancer*. 2006 Feb 27;94(4):578-85.

- Laudanna C, Mochly-Rosen D, Liron T, et al. Evidence of zeta protein kinase C involvement in polymorphonuclear neutrophil integrin-dependent adhesion and chemotaxis. *J Biol Chem*. 1998 273 (46): p.30306-15.

- Lee CY, Robinson KJ, Doe CQ. Lgl, Pins and aPKC regulate neuroblast self-renewal versus differentiation. *Nature*. 2006 Feb 2;439(7076):594-8.

- Lee J, Kim HK, Han YM, Kim J. Pyruvate kinase isozyme type M2 (PKM2) interacts and cooperates with Oct-4 in regulating transcription. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008;40(5):1043-54.

- Lee YJ, Jeschke GR, Roelants FM, Thorner J, Turk BE. Reciprocal phosphorylation of yeast glycerol-3-phosphate dehydrogenases in adaptation to distinct types of stress. *Mol Cell Biol.* 2012 Nov;32(22):4705-17.
- Leitges, M., et al. Targeted disruption of the PKC gene results in the impairment of the NF- κ B pathway. *Mol. Cell* 2001.(8):771–80
- Leopold JA, Walker J, Scribner AW, Voetsch B, Zhang YY, Loscalzo AJ, Stanton RC, Loscalzo J. Glucose-6-phosphate dehydrogenase modulates vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis. *J Biol Chem.* 2003 Aug 22;278(34):32100-6.
- Lepak J.A. Transmutation of a myeloid into a lymphatic leukemia or an early stem-cell undifferentiated leukemia; case report. *Minn Med.* 1948 Oct;31(10):1134-6.
- Levy DE, Darnell JE Jr. Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002 Sep;3(9):651-62.
- Li M, Ikehara S. Bone marrow stem cell as a potential treatment for diabetes. *J Diabetes Res.* 2013;2013:329596.
- Lim JY, Yoon SO, Seol SY, Hong SW, Kim JW, Choi SH, Cho JY. Overexpression of the M2 isoform of pyruvate kinase is an adverse prognostic factor for signet ring cell gastric cancer. *World J Gastroenterol.* 2012 Aug 14;18(30):4037-43
- Ling LS, Voskas D, Woodgett JR. Activation of PDK-1 maintains mouse embryonic stem cell self-renewal in a PKB-dependent manner. *Oncogene.* 2013 Mar 4. doi: 10.1038/onc.2013.44. [Epub ahead of print]
- Liu D, Hu J, Agorreta J, Cesario A, Zhang Y, Harris AL, Gatter K, Pezzella F. Tumor necrosis factor receptor-associated protein 1 (TRAP1) regulates genes involved in cell cycle and metastases. *Cancer Lett.* 2010 Oct 28;296(2):194-205.

- Liu H, Wu Z, Shi X, Li W, Liu C, Wang D, Ye X, Liu L, Na J, Cheng H, Chen L. Atypical PKC, regulated by Rho GTPases and Mek/Erk, phosphorylates Ezrin during eight-cell embryocompaction. *Dev Biol.* 2013 Mar 1;375(1):13-22.
- Liu L, McBride KM, Reich NC. STAT3 nuclear import is independent of tyrosine phosphorylation and mediated by importin-alpha3. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Jun 7;102(23):8150-5
- Liu T, Daniels CK, Cao S. Comprehensive review on the HSC70 functions, interactions with related molecules and involvement in clinical diseases and therapeutic potential. *Pharmacol Ther.* 2012 Dec;136(3):354-74.
- Liu W, Butts S, Kim H, Frenz DA. Negative regulation of otic capsule chondrogenesis: it can make you Smad. *Ann N Y Acad Sci.* 2007 Nov;1116:141-8.
- Locasale JW, Cantley LC. Genetic selection for enhanced serine metabolism in cancer development. *Cell Cycle.* 2011 Nov 15;10(22):3812-3. doi: 10.4161/cc.10.22.18224. Epub 2011 Nov 15.
- Lopaschuk GD, Jaswal JS. Energy metabolic phenotype of the cardiomyocyte during development, differentiation, and postnatal maturation. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2010 Aug;56(2):130-40.
- Löwe J, Li H, Downing KH, Nogales E. Refined structure of alpha beta-tubulin at 3.5 Å resolution. *J Mol Biol.* 2001 Nov 9;313(5):1045-57.
- Lu C, Ward PS, Kapoor GS, Rohle D, Turcan S, Abdel-Wahab O, Edwards CR, Khanin R, Figueroa ME, Melnick A, Wellen KE, O'Rourke DM, Berger SL, Chan TA, Levine RL, Mellinghoff IK, Thompson CB. IDH mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation. *Nature.* 2012 Feb 15;483(7390):474-8

- Ma L, Tao Y, Duran A, Llado V, Galvez A, Barger JF, Castilla EA, Chen J, Yajima T, Porollo A, Medvedovic M, Brill LM, Plas DR, Riedl SJ, Leitges M, Diaz-Meco MT, Richardson AD, Moscat J. Control of nutrient stress-induced metabolic reprogramming by PKC ζ in tumorigenesis. *Cell*. 2013 Jan 31;152(3):599-611.
- Madonna R, Görbe A, Ferdinandy P, De Caterina R. Glucose Metabolism, Hyperosmotic Stress, and Reprogramming of Somatic Cells. *Mol Biotechnol*. 2013 May 9
- Mandana MB, Maryam M, Ali SM, Mahboubeh Y, Aida A, Ali F, Behrooz N. Evaluation of Cytokines in Multiple Sclerosis Patients Treated with Mesenchymal Stem Cells. *Arch Med Res*. 2013 May 14. pii: S0188-4409(13)00109-4.
- Manganelli G, Fico A, Masullo U, Pizzolongo F, Cimmino A, Filosa S. Modulation of the pentose phosphate pathway induces endodermal differentiation in embryonic stem cells. *PLoS One*. 2012;7(1):e29321
- Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. The protein kinase complement of the human genome. *Science*. 2002 Dec 6;298(5600):1912-34.
- Marondedze C, Lilley K, Thomas L. Comparative gel-based phosphoproteomics in response to signaling molecules. *Methods Mol Biol*. 2013;1016:139-54.
- Marthiens V, French-Constant C. Adherens junction domains are split by asymmetric division of embryonic neural stem cells. *EMBO Rep*. 2009 May;10(5):515-20.
- Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981 Dec;78(12):7634-8.

- Martínez-Morales PL, Revilla A, Ocaña I, González C, Sainz P, McGuire D, Liste I. Progress in Stem Cell Therapy for Major Human Neurological Disorders. *Stem Cell Rev.* 2013 May 17
- Matsuda T, Nakamura T, Nakao K, Arai T, Katsuki M, Heike T, Yokota T. STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *EMBO J.* 1999 Aug 2;18(15):4261-9.
- Mazurek S. Pyruvate kinase type M2: a key regulator of the metabolic budget system in tumor cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2011 Jul;43(7):969-80
- Mehlen P, Mehlen A, Godet J, Arrigo AP. hsp27 as a switch between differentiation and apoptosis in murine embryonic stem cells. *J Biol Chem.* 1997 Dec 12;272(50):31657-65.
- Miao B, Skidan I, Yang J, Lugovskoy A, Reibarkh M, Long K, Brazell T, Durugkar KA, Maki J, Ramana CV, Schaffhausen B, Wagner G, Torchilin V, Yuan J, Degtarev A. Small molecule inhibition of phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP3) binding to pleckstrin homology domains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Nov 16;107(46):20126-31.
- Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, Maruyama M, Maeda M, Yamanaka S. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell.* 2003 May 30;113(5):631-42.
- Mochly-Rosen D, Das K, Grimes KV. Protein kinase C, an elusive therapeutic target? *Nat Rev Drug Discov.* 2012 Dec;11(12):937-57. doi: 10.1038/nrd3871.

- Mochly-Rosen D, Khaner H, Lopez J. Identification of intracellular receptor proteins for activated protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 May 1;88(9):3997-4000.
- Montesano Gesualdi N, Chirico G, Pirozzi G, Costantino E, Landriscina M, Esposito F. Tumor necrosis factor-associated protein 1 (TRAP-1) protects cells from oxidative stress and apoptosis. *Stress*. 2007 Nov;10(4):342-50.
- Moon RT, Kohn AD, De Ferrari GV, Kaykas A. WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies. *Nat Rev Genet*. 2004 Sep;5(9):691-701.
- Mori D, Yamada M, Mimori-Kiyosue Y, Shirai Y, Suzuki A, Ohno S, Saya H, Wynshaw-Boris A, Hirotsune S. An essential role of the aPKC-Aurora A-NDEL1 pathway in neurite elongation by modulation of microtubule dynamics. *Nat Cell Biol*. 2009 Sep;11(9):1057-68.
- Morrish F, Isern N, Sadilek M, Jeffrey M, Hockenbery DM. c-Myc activates multiple metabolic networks to generate substrates for cell-cycle entry. *Oncogene*. 2009 Jul 9;28(27):2485-91. doi: 10.1038/onc.2009.112. Epub 2009 May 18.
- Morrison GM, Brickman JM. Conserved roles for Oct4 homologues in maintaining multipotency during early vertebrate development. *Development*. 2006 May;133(10):2011-22.
- Moscat J, Diaz-Meco MT, Albert A, Campuzano S. Cell signaling and function organized by PB1 domain interactions. *Mol Cell*. 2006 Sep 1;23(5):631-40.
- Moscat J, Diaz-Meco MT, Wooten MW. Of the atypical PKCs, Par-4 and p62: recent understandings of the biology and pathology of a PB1-dominated complex. *Cell Death Differ*. 2009 Nov;16(11):1426-37.

- Mráček T, Drahotka Z, Houštěk J. The function and the role of the mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase in mammalian tissues. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Mar;1827(3):401-10.
- Murray PJ. The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. *J Immunol*. 2007 Mar 1;178(5):2623-9.
- Nakano I, Dougherty JD, Kim K, Klement I, Geschwind DH, Kornblum HI. Phosphoserine phosphatase is expressed in the neural stem cell niche and regulates neural stem and progenitor cell proliferation. *Stem Cells*. 2007 Aug;25(8):1975-84. Epub 2007 May 10.
- Navarro P, Festuccia N, Colby D, Gagliardi A, Mullin NP, Zhang W, Karwacki-Neisius V, Osorno R, Kelly D, Robertson M, Chambers I. OCT4/SOX2-independent Nanog autorepression modulates heterogeneous Nanog gene expression in mouse ES cells. *EMBO J*. 2012 Dec 12;31(24):4547-62.
- Newton, A.C. Protein kinase C: structure, function, and regulation. *J Biol Chem*, 1995. 270(48): p. 28495-8
- Nguyen TT, Oghi M, Yu Q, Johnson JA. Attenuation of the hypoxia-induced protein kinase Cdelta interaction with the 'd' subunit of F1Fo-ATP synthase in neonatal cardiac myocytes: implications for energy preservation and survival. *Biochem J*. 2010 Jul 15;429(2):335-45.
- Nishikawa K, Toker A, Johannes FJ, Songyang Z, Cantley LC. Determination of the specific substrate sequence motifs of protein kinase C isozymes. *J Biol Chem*. 1997 Jan 10;272(2):952-60
- Nishizuka Y. The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature*. 1988 Aug 25;334(6184):661-5.

- Obenauer JC, Cantley LC, Yaffe MB. Scansite 2.0: Proteome-wide prediction of cell signaling interactions using short sequence motifs. *Nucleic Acids Res.* 2003 Jul 1;31(13):3635-41.
- Ono Y, Kikkawa U, Ogita K, Fujii T, Kurokawa T, Asaoka Y, Sekiguchi K, Ase K, Igarashi K, Nishizuka Y. Expression and properties of two types of protein kinase C: alternative splicing from a single gene. *Science.* 1987 May 29;236(4805):1116-20.
- Paling NR, Wheadon H, Bone HK, Welham MJ. Regulation of embryonic stem cell self-renewal by phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling. *J Biol Chem.* 2004 Nov 12;279(46):48063-70. Epub 2004 Aug 24.
- Palmqvist L, Glover CH, Hsu L, Lu M, Bossen B, Piret JM, Humphries RK, Helgason CD. Correlation of murine embryonic stem cell gene expression profiles with functional measures of pluripotency. *Stem Cells.* 2005 May;23(5):663-80.
- Pan G, Thomson JA. Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency. *Cell Res.* 2007 Jan;17(1):42-9.
- Patalano S, Prulière G, Prodon F, Paix A, Dru P, Sardet C, Chenevert J. The aPKC-PAR-6-PAR-3 cell polarity complex localizes to the centrosome attracting body, a macroscopic cortical structure responsible for asymmetric divisions in the early ascidian embryo. *J Cell Sci.* 2006 Apr 15;119(Pt 8):1592-603.
- Pears C, Schaap D, Parker PJ. The regulatory domain of protein kinase C-epsilon restricts the catalytic-domain-specificity. *Biochem J.* 1991 May 15;276 (Pt 1):257-60.
- Pearson RB, Kemp BE. Protein kinase phosphorylation site sequences and consensus specificity motifs: tabulations. *Methods Enzymol.* 1991;200:62-81.

- Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell JS. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*. 1999 Dec;20(18):3551-67.
- Perl A, Hanczko R, Talarico T, Oaks Z, Landas S. Oxidative stress, inflammation and carcinogenesis are controlled through the pentose phosphate pathway by transaldolase. *Trends Mol Med*. 2011 Jul;17(7):395-403.
- Pfeffer SR. Rab GTPase regulation of membrane identity. *Curr Opin Cell Biol*. 2013 Apr 29. pii: S0955-0674(13)00065-3.
- Plewczynski D, Jaroszewski L, Godzik A, Kloczkowski A, Rychlewski L. Molecular modeling of phosphorylation sites in proteins using a database of local structure segments. *J Mol Model*. 2005 Nov;11(6):431-8.
- Ponting CP, Ito T, Moscat J, Diaz-Meco MT, Inagaki F, Sumimoto H. OPR, PC and AID: all in the PB1 family. *Trends Biochem Sci*. 2002 Jan;27(1):10.
- Prabakaran S, Lippens G, Steen H, Gunawardena J. Post-translational modification: nature's escape from genetic imprisonment and the basis for dynamic information encoding. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2012 Nov-Dec;4(6):565-83.
- Prinsloo E, Setati MM, Longshaw VM, Blatch GL. Chaperoning stem cells: a role for heat shock proteins in the modulation of stem cell self-renewal and differentiation? *Bioessays*. 2009 Apr;31(4):370-7
- Puente LG, Borris DJ, Carrière JF, Kelly JF, Megeney LA. Identification of candidate regulators of embryonic stem cell differentiation by comparative phosphoprotein affinity profiling. *Mol Cell Proteomics*. 2006 Jan;5(1):57-67.

- Quinlan, L.R., S. Faherty, and M.T. Kane, Phospholipase C and protein kinase C involvement in mouse embryonic stem-cell proliferation and apoptosis. *Reproduction*, 2003. 126(1): p. 121-31.
- Rakheja D, Konoplev S, Medeiros LJ, Chen W. IDH mutations in acute myeloid leukemia. *Hum Pathol.* 2012 Oct;43(10):1541-51. doi: 10.1016/j.humpath.2012.05.003. Epub 2012 Aug 20.
- Redel BK, Brown AN, Spate LD, Whitworth KM, Green JA, Prather RS. Glycolysis in preimplantation development is partially controlled by the Warburg Effect. *Mol Reprod Dev.* 2012 Apr;79(4):262-71
- Regala RP, Weems C, Jamieson L, Khor A, Edell ES, Lohse CM, Fields AP Atypical protein kinase C iota is an oncogene in human non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 2005 Oct 1;65(19):8905-11.
- Rehman J. Empowering self-renewal and differentiation: the role of mitochondria in stem cells. *J Mol Med (Berl).* 2010 Oct;88(10):981-6.
- Reich NC, Liu L. Tracking STAT nuclear traffic. *Nat Rev Immunol.* 2006 Aug;6(8):602-12.
- Ren G, Chen X, Dong F, Li W, Ren X, Zhang Y, Shi Y. Concise review: mesenchymal stem cells and translational medicine: emerging issues. *Stem Cells Transl Med.* 2012 Jan;1(1):51-8.
- Riganti C, Gazzano E, Polimeni M, Aldieri E, Ghigo D. The pentose phosphate pathway: an antioxidant defense and a crossroad in tumor cell fate. *Free Radic Biol Med.* 2012 Aug 1;53(3):421-36.
- Rodriguez, M.M., et al. RACK1, a protein kinase C anchoring protein coordinates the binding of activated protein kinase C and select pleckstrin homology domains in vitro. *Biochemistry*, 1999. 38(42): p. 13787-94.

- Sabin FR, Doan CA, Forkner CE. The production of osteogenic sarcomata and the effects on lymph nodes and bone marrow of intravenous injections of radium chloride and sesothrium in rabbits. *J Exp Med.* 1932 Jul 31;56(2):267-89.
- Sajjan MP, Rivas J, Li P, Standaert ML, Farese RV. Repletion of atypical protein kinase C following RNA interference-mediated depletion restores insulin-stimulated glucose transport. *J Biol Chem.* 2006 Jun 23;281(25):17466-73.
- Samland AK, Rale M, Sprenger GA, Fessner WD. The transaldolase family: new synthetic opportunities from an ancient enzyme scaffold. *Chembiochem.* 2011 Jul 4;12(10):1454-74.
- Samland AK, Rale M, Sprenger GA, Fessner WD. The transaldolase family: new synthetic opportunities from an ancient enzyme scaffold. *Chembiochem.* 2011 Jul 4;12(10):1454-74. doi: 10.1002/cbic.201100072. Epub 2011 May 13.
- Samuels IS, Seibenhener ML, Neidigh KB, Wooten MW. Nerve growth factor stimulates the interaction of ZIP/p62 with atypical protein kinase C and targets endosomal localization: evidence for regulation of nerve growth factor-induced differentiation. *J Cell Biochem.* 2001;82(3):452-66.
- Schechtman D, Craske ML, Kheifets V, Meyer T, Schechtman J, Mochly-Rosen D. A critical intramolecular interaction for protein kinase Cepsilon translocation. *J Biol Chem.* 2004 Apr 16;279(16):15831-40.
- Schechtman D, Mochly-Rosen D. Adaptor proteins in protein kinase C-mediated signal transduction. *Oncogene.* 2001 Oct 1;20(44):6339-47.
- Schechtman D, Murriel C, Bright R, Mochly-Rosen D. Overlay method for detecting protein-protein interactions. *Methods Mol Biol.* 2003;233:351-7.
- Schechtman, D. & Mochly-Rosen, D. Isozyme-specific inhibitors and activators of protein kinase C. *Methods Enzymol*, 2002. 345: p. 470.

- Seabra MC, Wasmeier C. Controlling the location and activation of Rab GTPases. *Curr Opin Cell Biol.* 2004 Aug;16(4):451-7.
- Serrano L, de la Torre J, Maccioni RB, Avila J. Involvement of the carboxyl-terminal domain of tubulin in the regulation of its assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984 Oct;81(19):5989-93.
- Shi H, Verma M, Zhang L, Dong C, Flavell RA, Bennett AM. Improved regenerative myogenesis and muscular dystrophy in mice lacking Mkp5. *J Clin Invest.* 2013 May 1;123(5):2064-77.
- Short S, Tian D, Short ML, Jungmann RA. Structural determinants for post-transcriptional stabilization of lactate dehydrogenase A mRNA by the protein kinase C signal pathway. *J Biol Chem.* 2000 Apr 28;275(17):12963-9.
- Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, Albanese C, D'Amico M, Pestell R, Ben-Ze'ev A. The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 May 11;96(10):5522-7.
- Silió V, Marqués M, Cortés I, Zuluaga S, Carrera AC. A cascade involving p85, Cdc42 and septin 2 regulates cytokinesis. *Biochem Soc Trans.* 2007 Apr;35(Pt 2):222-4.
- Simara P, Motl JA, Kaufman DS. Pluripotent stem cells and gene therapy. *Transl Res.* 2013 Apr;161(4):284-92. doi: 10.1016/j.trsl.2013.01.001. Epub 2013 Jan 23.
- Sirard C, de la Pompa JL, Elia A, Itie A, Mirtsos C, Cheung A, Hahn S, Wakeham A, Schwartz L, Kern SE, Rossant J, Mak TW. The tumor suppressor gene Smad4/Dpc4 is required for gastrulation and later for anterior development of the mouse embryo. *Genes Dev.* 1998 Jan 1;12(1):107-19.

- Sirover MA. New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta*. 1999 Jul 13;1432(2):159-84.
- Siwko S, Mochly-Rosen D. Use of a novel method to find substrates of protein kinase C delta identifies M2 pyruvate kinase. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(5):978-87.
- Smith KN, Singh AM, Dalton S. Myc represses primitive endoderm differentiation in pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 2010 Sep 3;7(3):343-54. doi: 10.1016/j.stem.2010.06.023.
- Snell K, Fell DA. Metabolic control analysis of mammalian serine metabolism. *Adv Enzyme Regul*. 1990;30:13-32.
- Song BW, Chang W, Hong BK, Kim IK, Cha MJ, Lim S, Choi EJ, Ham O, Lee SY, Lee CY, Park JH, Choi E, Song H, Jang Y, Hwang KC. Protein Kinase C Activation Stimulates Mesenchymal Stem Cell Adhesion through Activation of Focal Adhesion Kinase. *Cell Transplant*. 2012 Sep 21.
- Souroujon MC, Mochly-Rosen D. Peptide modulators of protein-protein interactions in intracellular signaling. *Nat Biotechnol*. 1998 Oct;16(10):919-24.
- Spiliotis ET, Hunt SJ, Hu Q, Kinoshita M, Nelson WJ. Epithelial polarity requires septin coupling of vesicle transport to polyglutamylated microtubules. *J Cell Biol*. 2008 Jan 28;180(2):295-303.
- Spradling A, Drummond-Barbosa D, Kai T. Stem cells find their niche. *Nature*. 2001 Nov 1;414(6859):98-104.
- St John JC, Ramalho-Santos J, Gray HL, Petrosko P, Rawe VY, Navara CS, Simerly CR, Schatten GP. The expression of mitochondrial DNA transcription

factors during early cardiomyocyte in vitro differentiation from human embryonic stem cells. *Cloning Stem Cells*. 2005;7(3):141-53.

- Standaert ML, Bandyopadhyay G, Kanoh Y, Sajan MP, Farese RV. Insulin and PIP3 activate PKC-zeta by mechanisms that are both dependent and independent of phosphorylation of activation loop (T410) and autophosphorylation (T560) sites. *Biochemistry*. 2001 Jan 9;40(1):249-55.

- Standaert ML, Galloway L, Karnam P, Bandyopadhyay G, Moscat J, Farese RV. Protein kinase C-zeta as a downstream effector of phosphatidylinositol 3-kinase during insulin stimulation in rat adipocytes. Potential role in glucose transport. *J Biol Chem*. 1997 Nov 28;272(48):30075-82.

- Standaert, M.L., Bandyopadhyay, G., Perez, L., et al.; Insulin activates protein kinases C- by an autophosphorylation-dependent mechanism and stimulates their translocation to GLUT4 vesicles and other membrane fractions in rat adipocytes. *J. Biol. Chem*. 1999. (274): 25308–16

- Starr R, Hilton DJ. Negative regulation of the JAK/STAT pathway. *Bioessays*. 1999 Jan;21(1):47-52.

- Stebbins EG, Mochly-Rosen D. Binding specificity for RACK1 resides in the V5 region of beta II protein kinase C. *JBiol Chem*. 2001 Aug 10;276(32):29644-50. Epub 2001 May 31.

- Steinberg SF. Structural basis of protein kinase C isoform function. *Physiol Rev*. 2008 Oct;88(4):1341-78. doi: 10.1152/physrev.00034.2007.

- Stice SL, Boyd NL, Dhara SK, Gerwe BA, Machacek DW, Shin S. Human embryonic stem cells: challenges and opportunities. *Reprod Fertil Dev*. 2006;18(8):839-46.

- Storm MP, Kumpfmüller B, Thompson B, Kolde R, Vilo J, Hummel O, Schulz H, Welham MJ. Characterization of the phosphoinositide 3-kinase-dependent transcriptome in murine embryonic stem cells: identification of novel regulators of pluripotency. *Stem Cells*. 2009 Apr;27(4):764-75. doi: 10.1002/stem.3.
- Strauss R, Hamerlik P, Lieber A, Bartek J. Regulation of stem cell plasticity: mechanisms and relevance to tissue biology and cancer. *Mol Ther*. 2012 May;20(5):887-97.
- Strulovici Y, Leopold PL, O'Connor TP, Pergolizzi RG, Crystal RG. Human embryonic stem cells and gene therapy. *Mol Ther*. 2007 May;15(5):850-66.
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007 Nov 30;131(5):861-72.
- Tamada M, Nagano O, Tateyama S, Ohmura M, Yae T, Ishimoto T, Sugihara E, Onishi N, Yamamoto T, Yanagawa H, Suematsu M, Saya H. Modulation of glucose metabolism by CD44 contributes to antioxidant status and drug resistance in cancer cells. *Cancer Res*. 2012 Mar 15;72(6):1438-48.
- Tamada M, Suematsu M, Saya H. Pyruvate kinase M2: multiple faces for conferring benefits on cancer cells. *Clin Cancer Res*. 2012 Oct 15;18(20):5554-61
- Tashiro T, Komiya Y. Stable and dynamic forms of cytoskeletal proteins in slow axonal transport. *J Neurosci*. 1989 Mar;9(3):760-8.
- Tagawa H, Koide M, Sato H, Cooper G. Cytoskeletal role in the contractile dysfunction of cardiocytes from hypertrophied and failing right ventricular myocardium. *Proc Assoc Am Physicians*. 1996 May;108(3):218-29.
- Till J.E., McCulloch E.A. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells *Radiat Res*. 1961 Feb;14:213-22.

- Tisdale EJ. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is phosphorylated by protein kinase Ciota /lambda and plays a role in microtubule dynamics in the early secretory pathway. *J Biol Chem.* 2002 Feb 1;277(5):3334-41.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979 Sep;76(9):4350-4.
- Vacanti NM, Metallo CM. Exploring metabolic pathways that contribute to the stem cell phenotype. *Biochim Biophys Acta.* 2013 Feb;1830(2):2361-9.
- Valiron O, Arnal I, Caudron N, Job D. GDP-tubulin incorporation into growing microtubules modulates polymer stability. *J Biol Chem.* 2010 Jun 4;285(23):17507-13.
- Van der Windt GJ, Pearce EL. Metabolic switching and fuel choice during T-cell differentiation and memory development. *Immunol Rev.* 2012 Sep;249(1):27-42
- Van Hoof D, Muñoz J, Braam SR, Pinkse MW, Linding R, Heck AJ, Mummery CL, Krijgsveld J. Phosphorylation dynamics during early differentiation of human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell.* 2009 Aug 7;5(2):214-26. doi: 10.1016/j.stem.2009.05.021.
- Vasquez RJ, Howell B, Yvon AM, Wadsworth P, Cassimeris L. Nanomolar concentrations of nocodazole alter microtubule dynamic instability in vivo and in vitro. *Mol Biol Cell.* 1997 Jun;8(6):973-85.
- Vats A, Tolley NS, Bishop AE, Polak JM. Embryonic stem cells and tissue engineering: delivering stem cells to the clinic. *J R Soc Med.* 2005 Aug;98(8):346-50.
- Vazquez-Martin A, Corominas-Faja B, Cufi S, Vellon L, Oliveras-Ferraros C, Menendez OJ, Joven J, Lupu R, Menendez JA. The mitochondrial H(+)-ATP synthase and the lipogenic switch: new core components of metabolic

reprogramming in induced pluripotent stem (iPS) cells. *Cell Cycle*. 2013 Jan 15;12(2):207-18

- Verfaillie C. Pluripotent stem cells. *Transfus Clin Biol*. 2009 May;16(2):65-9.

- Verhey KJ, Gaertig J. The tubulin code. *Cell Cycle*. 2007 Sep 1;6(17):2152-60.

- Vizán P, Alcarraz-Vizán G, Díaz-Moralli S, Solovjeva ON, Frederiks WM, Cascante M Modulation of pentose phosphate pathway during cell cycle progression in human colon adenocarcinoma cell line HT29. *Int J Cancer*. 2009 Jun 15;124(12):2789-96

- Wandosell F, Serrano L, Avila J. Phosphorylation of alpha-tubulin carboxyl-terminal tyrosine prevents its incorporation into microtubules. *J Biol Chem*. 1987 Jun 15;262(17):8268-73.

- Wang G, Krishnamurthy K, Umapathy NS, Verin AD, Bieberich E. The carboxyl-terminal domain of atypical protein kinase Czeta binds to ceramide and regulates junction formation in epithelial cells. *J Biol Chem*. 2009 May 22;284(21):14469-75. doi: 10.1074/jbc.M808909200. Epub 2009 Mar 20.

- Wang H, Somers GW, Bashirullah A, Heberlein U, Yu F, Chia W. Aurora-A acts as a tumor suppressor and regulates self-renewal of *Drosophila* neuroblasts. *Genes Dev*. 2006 Dec 15;20(24):3453-63.

- Wang HW, Nogales E. Nucleotide-dependent bending flexibility of tubulin regulates microtubule assembly. *Nature*. 2005 Jun 16;435(7044):911-5.

- Wang JM, Cieplak P, Kollman PA. How well does a restrained electrostatic potential (RESP) model perform in calculating conformational energies of organic and biological molecules? *J. Comput. Chem*. 2000;21:1049–1074.

- Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science*. 1956 Feb 24;123(3191):309-14.
- Ward PS, Lu C, Cross JR, Abdel-Wahab O, Levine RL, Schwartz GK, Thompson CB. The potential for isocitrate dehydrogenase mutations to produce 2-hydroxyglutarate depends on allele specificity and subcellular compartmentalization. *J Biol Chem*. 2013 Feb 8;288(6):3804-15.
- Westermann S, Weber K. Post-translational modifications regulate microtubule function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003 Dec;4(12):938-47.
- Wickstead B, Gull K. The evolution of the cytoskeleton. *J Cell Biol*. 2011 Aug 22;194(4):513-25. doi: 10.1083/jcb.201102065.
- Williams SE, Beronja S, Pasolli HA, Fuchs E. Asymmetric cell divisions promote Notch-dependent epidermal differentiation. *Nature*. 2011 Feb 17;470(7334):353-8.
- Wong N, De Melo J, Tang D. PKM2, a Central Point of Regulation in Cancer Metabolism. *Int J Cell Biol*. 2013;2013:242513
- Xu X, Zur Hausen A, Coy JF, Löchelt M. Transketolase-like protein 1 (TKTL1) is required for rapid cell growth and full viability of human tumor cells. *Int J Cancer*. 2009 Mar 15;124(6):1330-7
- Yang M, Wang C, Zhu X, Tang S, Shi L, Cao X, Chen T. E3 ubiquitin ligase CHIP facilitates Toll-like receptor signaling by recruiting and polyubiquitinating Src and atypical PKC{zeta}. *JExp Med*. 2011 Sep 26;208(10):2099-112. doi: 10.1084/jem.20102667. Epub 2011 Sep 12.
- Yang SM, Deng AC, Huang DL, Sun JH, Yang G, Yu YP, Hou ZH, Guo WW, Zhai SQ, He DZ, Han DY, Young WY, Yang X. The role of Smad4 in vestibular development in mice. *Int J Dev Neurosci*. 2011 Feb;29(1):15-23.

- Yang W, Xia Y, Cao Y, Zheng Y, Bu W, Zhang L, You MJ, Koh MY, Cote G, Aldape K, Li Y, Verma IM, Chiao PJ, Lu Z. EGFR-induced and PKC ϵ monoubiquitylation-dependent NF- κ B activation upregulates PKM2 expression and promotes tumorigenesis. *Mol Cell*. 2012 Dec 14;48(5):771-84
- Yang X, Li C, Xu X, Deng C. The tumor suppressor SMAD4/DPC4 is essential for epiblast proliferation and mesoderm induction in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Mar 31;95(7):3667-72.
- Yao J, Mu Y, Gage FH. Neural stem cells: mechanisms and modeling. *Protein Cell*. 2012 Apr;3(4):251-61.
- Yen KE, Bittinger MA, Su SM, Fantin VR. Cancer-associated IDH mutations: biomarker and therapeutic opportunities. *Oncogene*. 2010 Dec 9;29(49):6409-17. doi: 10.1038/onc.2010.444. Epub 2010 Oct 25.
- Ying QL, Nichols J, Chambers I, Smith A. BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell*. 2003 Oct 31;115(3):281-92.
- Yoshida K, Furuya S, Osuka S, Mitoma J, Shinoda Y, Watanabe M, Azuma N, Tanaka H, Hashikawa T, Itohara S, Hirabayashi Y. Targeted disruption of the mouse 3-phosphoglycerate dehydrogenase gene causes severe neurodevelopmental defects and results in embryonic lethality. *J Biol Chem*. 2004 Jan 30;279(5):3573-7.
- Yoshida S, Tsutsumi S, Muhlebach G, Sourbier C, Lee MJ, Lee S, Vartholomaiou E, Tatokoro M, Beebe K, Miyajima N, Mohnhey RP, Chen Y, Hasumi H, Xu W, Fukushima H, Nakamura K, Koga F, Kihara K, Trepel J, Picard D, Neckers L. Molecular chaperone TRAP1 regulates a metabolic switch between mitochondrial

respiration and aerobic glycolysis Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Apr 23;110(17):E1604-12.

- Yousefi M, Hajihoseini V, Jung W, Hosseinpour B, Rassouli H, Lee B, Baharvand H, Lee K, Salekdeh GH. Embryonic stem cell interactomics: the beginning of a long road to biological function. Stem Cell Rev. 2012 Dec;8(4):1138-54.

- Yu Z, Li Y, Fan H, Liu Z, Pestell RG. miRNAs regulate stem cell self-renewal and differentiation. Front Genet. 2012;3:191.

- Yuan ZL, Guan YJ, Chatterjee D, Chin YE. Stat3 dimerization regulated by reversible acetylation of a single lysine residue. Science. 2005 Jan 14;307(5707):269-73.

- Yun SP, Lee MY, Ryu JM, Han HJ. Interaction between PGE2 and EGF receptor through MAPKs in mouse embryonic stem cell proliferation. Cell Mol Life Sci. 2009 May;66(9):1603-16.

- Zanuy M, Ramos-Montoya A, Villacañas O, Canela N, Miranda A, Aguilar E, Agell N, Bachs O, Rubio-Martinez J, Pujol MD, Lee WN, Marin S, Cascante M. Cyclin-dependent kinases 4 and 6 control tumor progression and direct glucose oxidation in the pentose cycle Metabolomics. 2012 Jun 1;8(3):454-464.

- Zhang J, Nuebel E, Daley GQ, Koehler CM, Teitell MA. Metabolic Regulation in Pluripotent Stem Cells during Reprogramming and Self-Renewal Cell Stem Cell. 2012 Nov 2;11(5):589-95.

- Zhao W, Ji X, Zhang F, Li L, Ma L. Embryonic stem cell markers. Molecules. 2012 May 25;17(6):6196-236.

- Zheng J, Yates SP, Jia Z. Structural and mechanistic insights into the bifunctional enzyme isocitrate dehydrogenase kinase/phosphatase AceK. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2012 Sep 19;367(1602):2656-68.

- Zhou J, Su P, Wang L, Chen J, Zimmermann M, Genbacev O, Afonja O, Horne MC, Tanaka T, Duan E, Fisher SJ, Liao J, Chen J, Wang F. mTOR supports long-term self-renewal and suppresses mesoderm and endoderm activities of human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 May 12;106(19):7840-5.

- Zhou X, Quann E, Gallicano GI. Differentiation of nonbeating embryonic stem cells into beating cardiomyocytes is dependent on downregulation of PKC beta and zeta in concert with upregulation of PKC epsilon. *Dev Biol*. 2003 Mar 15;255(2):407-22.

- Zhu Z, Huangfu D. Human pluripotent stem cells: an emerging model in developmental biology. *Development*. 2013 Feb;140(4):705-17.

8. Anexo

Súmula Curricular

DADOS PESSOAIS

Nome: Mariana Lemos Duarte

Data de nascimento: 26 de novembro de 1983

Naturalidade: Niterói, Rio de Janeiro

FORMAÇÃO ACADÊMICA

2009 – Doutorado em Ciências (Bioquímica)
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
Título: Identificação e validação funcional de novos alvos das PKCs em célula tronco embrionária
Orientadora: Dra Deborah Schechtman
Bolsista da Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)

2007 – 2009: Mestrado em Ciências Biologia e Molecular.
Universidade do Estado do Rio de Janeiro, UERJ, Rio De Janeiro, Brasil
Título: Análise da indução de ciclooxigenase-2 após tratamento quimioterápico em câncer de pulmão NSCLC e sua correlação com a proteína supressora de tumor p53
Orientador: Dra Emanuela de Moraes Ribeiro Pinto
Bolsista do(a): Ministério da Saúde

2006 – 2007: Aperfeiçoamento em Pesquisa Oncológica.
Instituto Nacional de Câncer, INCA, Rio De Janeiro, Brasil
Título: Análise do efeito antiproliferativo e apoptótico de inibidores seletivos de COX-2 em células não pequenas de câncer de pulmão (NSCLC)
Orientador: Dr Carlos Gil Ferreira
Bolsista do(a): Ministério da Saúde

2002 – 2006: Graduação em Ciências Farmacêuticas.
Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Rio De Janeiro, Brasil

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

2010 – 2010: Curso de curta duração em System Biology; Universidade de São Paulo

2006-2006: Extensão universitária em Análises Clínicas. Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Rio De Janeiro, Brasil

2006 – 2006: Curso de curta duração em Cell Imagery: Advances in Fluorescence Microscopy. Sociedade Brasileira de Biologia Celular, SBBC, Sao Paulo, Brasil

PRÊMIOS E TÍTULOS

2012: Best Poster Award. The International Congress on Cell Biology

ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS

1. Costa-Junior, Helio Miranda ; Garavello, Nicole Milare ; Duarte, Mariana Lemos; Berti, Denise Aparecida ; Glaser, Talita ; Andrade, Alexander de ; Labate, Carlos A.; Ferreira, Andre Teixeira da Silva ; Perales, Jonas Enrique Aguilar ; Xavier-Neto, Jose; Krieger, Jose Eduardo; Schechtman, Deborah . Phosphoproteomics Profiling Suggests a Role for Nuclear PKC in Transcription Processes of Undifferentiated Murine Embryonic Stem Cells. Journal of Proteome Research (Print), v. 9, p. 6191-6206, 2010.

2. Duarte, M.L. ; Moraes, E.; Pontes, E. ; Schluckebier, L. ; Moraes, J. L.; Hainaut, P.; Ferreira, C. G. Role of p53 in the induction of cyclooxygenase-2 by cisplatin or paclitaxel in non-small cell lung cancer cell lines. Cancer Letters, 2009 Jun 28;279(1):57-64

3. Duarte, M.L. ; Pontes, Elizangela ; Moraes, J.L.M. ; Ferreira CG ; FERREIRA, C. G. ; MORAES, E. . Análise da Inibição de Ciclooxygenase-2, em combinação com o tratamento quimioterápico, em células tumorais de pulmão NSCLC. Revista Brasileira de Cancerologia, 2006, 01 jan.; 52, p. 280 - 280.

- Garavello, N.M.; Duarte M.L.; Pena A.D.; Costa-Junior H.M.; Forti F.L.; Bonatto J.M.C.; Schumacher R.I.; Schechtman D.; Activation of Protein Kinase C delta by ψ RACK peptide promotes embryonic stem cell proliferation through ERK 1/2; artigo submetido

- Duarte, M.L.; Berti, D.A.; Costa-Junior, H.M.; Ferreira, J.C.B.; Disatnik M.H.; Baqui M.M.A.; Mochly-Rosen D.; Xavier-Neto J.; Oliveira P.S.L.; Schechtman D. A novel structurally formed PKC phosphorylation site in α -tubulin affects subunit incorporation into microtubules; artigo em preparação.

- Duarte, M.L.; Zeri, A.; Kowaltowski A.; Schechtman D. F Atypical PKCs are involved in regulating undifferentiated embryonic stem cell aerobic metabolism; artigo em preparação.

RESUMOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSOS

1. DUARTE M.L.; BAQUI M.M.A.; COSTA-JUNIOR H.M.; BERTI D.A.; FERRERIA J.C.B.; SOBREIRA T.J.P.; DISTANIK M.H.; MOCHELY-ROSEN D.; OLIVEIRA P.S.L.; SCHECHTMAN D.; A new phosphorylation site in α -tubulin suggests that phosphorylation may be important to stabilize microtubules during cell division. In: 10th International Congress on Cell Biology, 2012, Rio de Janeiro, Brazil., 2012.

2. DUARTE M.L.; ZERI A.C.; KRIEGER J.E.; SCHECHTMAN D. Identifying targets and characterizing the role of aPKC in murine embryonic stem cells. In: Experimental Biology, 2012, San Diego, CA., USA 2012

3. SCHECHTMAN, D. ; COSTA-JUNIOR, H.M. ; GARAVELLO, N. M. ; DUARTE ML ; Berti DA ; BONATTO, J. M. C. ; KRIEGER J.E. ; Xavier-Neto J ; MOCHLY-ROSEN, D. Protein kinase C in murine embryonic stem cell self-renewal, proliferation and differentiation. In: Keystone meeting, The Evolution of Protein Phosphorylation, 2011, Keystone, Colorado. Keystone meeting, The Evolution of Protein Phosphorylation, 2011.

4. SCHECHTMAN, D. ; Costa-Junior, Helio Miranda ; Garavello, Nicole Milare ; DUARTE ML ; Berti DA ; BONATTO, J. M. C. ; Krieger JE ; Xavier-Neto J ; MOCHLY-ROSEN, D . Protein kinase C in murine embryonic ste, cell self renewal, proliferation and differentiation. In: The Evolution of Protein Phosphorylation, 2011, Keystone, Colorado. The Evolution of Protein Phosphorylation, 2011.

5. GARAVELLO, N. M. ; DUARTE ML ; COSTA-JUNIOR, H.M. ; SCHECHTMAN, D. Characterization of PKCs during embryonic stem cell proliferation and self-renewal. In: XV Congresso da Sociedade Brasileira de Biologia Celular., 2010, São Paulo. XV Congresso da Sociedade Brasileira de Biologia Celular., 2010.

6. GARAVELLO, N. M. ; COSTA-JUNIOR, H.M. ; DUARTE ML ; SCHECHTMAN, D. . Characterization of PKCs during embryonic stem cell proliferation. In: XXXIX Annual Meeting of the Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society,, 2010, Foz do Iguaçu. XXXIX Annual Meeting of the Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society, 2010.

7. DUARTE ML ; SCHECHTMAN, D. . Characterization of protein kinase C zeta in murine embryonic stem cells.. In: XXXIX Annual Meeting of the Brazilian

Biochemistry and Molecular Biology Society, 2010, Foz do Iguaçu. XXXIX Annual Meeting of the Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society, 2010.

8. DUARTE, M. L. ; Moraes, J.L. ; Schluckebier L.F. ; Caramuru H ; di Biasi P. ; Ferreira, C. G. ; Hainaut P. ; MORAES, E. . Correlation between COX-2 expression and TP53 mutations in non-small cell lung cancer (NSCLC). In: VIII Congresso Brasileiro de Mutagênese Carcinogênese e Teratogênese Ambiental, 2007, Angra dos Reis. Revista Brasileira de Toxicologia. São Paulo, 2007. v. 01. p. 124-124.

ORGANIZAÇÃO DE EVENTOS

1. XXIII Semana de Farmácia. 2005. Universidade Federal do Rio de Janeiro
2. XXII Semana de Farmácia. 2004. Universidade Federal do Rio de Janeiro
3. X Escola de Verão de Química Farmacêutica e Medicinal. 2004. Universidade Federal do Rio de Janeiro
4. IX Escola de Verão de Química Farmacêutica e Medicinal. 2003. Universidade Federal do Rio de Janeiro