

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

**DARLENE APARECIDA PENA**

**Anticorpos conformacionais para PKCs clássicas e  
suas aplicações**

**Versão da Tese corrigida**

São Paulo

Data do Depósito na SPG:  
**04/02/2016**

DARLENE APARECIDA PENA

**Anticorpos conformacionais para PKCs clássicas e  
suas aplicações**

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

*Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra<sup>a</sup>. Deborah Schechtman*

São Paulo  
2016



***Ao meu companheiro desta vida e anjo da guarda, Klaus  
dedico...***

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pela proteção e por me dar coragem para enfrentar os momentos firmes ou trêmulos,

À Universidade de São Paulo e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica do Instituto de Química,

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (processo 2011/10321-3 e 2014/16037-3) pelo apoio financeiro para o desenvolvimento desta tese,

À minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Deborah Schechtman pela orientação, comprometimento e por ter sempre acreditado em mim, mesmo quando eu não acreditava. Obrigada pelas oportunidades que me transformaram como ser humano e mudaram minha vida para sempre. Serei eternamente grata...

Ao prof. Walter Colli pelo exemplo de profissional e pelas inúmeras conversas de incentivo e motivação, as quais foram muito importantes para superação dos momentos de angústia e incertezas,

Ao amigo prof. Ivan Schumacher pela amizade e conversas descontraídas no laboratório e na mesa do bar. Como esta convivência me fez crescer...

À prof<sup>a</sup>. Maria Júlia Manso Alves pela orientação e pelas sugestões imprescindíveis ao longo do desenvolvimento deste trabalho,

Ao professor Ricardo pela convivência e sugestões, ao prof. Victor Piana de Andrade e José Ivanildo do Hospital AC. Camargo pela execução dos experimentos de TMA com amostras de tumores de câncer de mama, ao Dr. Paulo do LNBio pela realização do modelo da PKC e ao prof. Dr. Isaias Glezer da Universidade Federal de São Paulo pelas sugestões nos experimentos com puromicina,

Aos técnicos da Central Analítica, em especial ao Emerson, pelas análises de espectrometria de massas,

Agradeço também todos os professores do Instituto de Química, em especial aos professores Bayardo, Maurício Baptista e Walter Terra por terem me ensinado com maestria que ser professor é mais do que transferir o conhecimento, mas sim estimular a construção deste,

Ao meu Klaus, noivo-marido-amigo, pelo amor sem medidas, por ser meu porto seguro aonde quer que eu esteja, por ser tão compreensivo com a distância e situações estressantes. Deus não poderia ter sido mais misericordioso ao colocar você em minha vida. Como o seu carinho e palavras de afeto aliviaram meu cansaço e me fortaleceram... Saiba que você também é responsável por esta conquista!!!

Aos meus pais Maria e Domingos (*in memoriam*) e aos meus irmãos pelo apoio e esforço para me ajudar. Agradeço a minha cunhada Elizeth por ter me dado os meus sobrinhos, Mariana e Pedro Augusto, os quais me proporcionam momentos de mais absoluta alegria,

À minha segunda família, mãe-Nata, pai-Zé e irmã-Nayra pela amizade, incentivo, conversas motivadoras e momentos de descontração. Vocês não fazem idéia de como foram importantes durante esta trajetória. Amo vocês!

À minha querida tia Rose e família por tornar meus dias mais leves, pelas longas conversas que sempre me dão tanta força para vencer qualquer desafio. Por ser o exemplo de pessoa, por dedicar tanto amor e carinho a mim. Agradeço também a toda minha família de Diadema! Ter vocês por perto me deu muito mais tranquilidade para encarar esta batalha,

Ao meu grande amigo Matheus Bonatto pela amizade, pela parceria e agradável convivência. Foram inúmeros os momentos tensos que foram transformados em piada e risadas. Você será para sempre o irmão que a vida me deu...

À minha amiga Ancély pelo companherismo, dias de turismo gastronômico, pelas comilanças e convivência mais que agradável,

Ao casal de amigos Leila e Laszlo pelos momentos únicos, boas risadas e trocas de experiências. Espero ter para sempre a amizade de vocês,

À Laura e sua linda família pelos momentos de alegria e amizade,

À minha aluna de iniciação científica e amiga Gabi. Agradeço você e sua família por terem me adotado, pela amizade, por ouvir meus desabafos e pelas orações,

À Maria Luiza pelas risadas, boas conversas durante os cafezinhos e apoio na condução dos experimentos,

Ao Robertinho pelas deliciosas conversas e por ser este exemplo de pessoa alegre e de bem com a vida. "Tamo junto", sempre!

À Celinha por toda a ajuda e ensinamentos durante o desenvolvimento dos anticorpos. Agradeço também pelos conselhos e conversas durante os deliciosos cafés no laboratório,

À querida Denise Viana agradável surpresa que encontrei como amiga. Obrigada pela amizade e leve convivência,

Aos amigos Chris, Orlando, Adriana, Maíra, Valquíria e Nacho pelas conversas inspiradoras sobre a vida,

Aos colegas de laboratório: Laura, Carlos, Jussara, Eliciane, Milton, André, Fenny, Alexandre, Leila, Denise Berti, Mariana, Nacho, Milton, Ana Zen, Denise Viana, Dimitrius e Estela pela troca de experiências e ajuda,

À prof. Lakshmi Devi pelos ensinamentos, por ter me aceitado em seu laboratório durante o meu estágio no exterior no Hospital Mount Sinai de Nova York (EUA) e por ter me permitido vivenciar a mais incrível experiência de minha vida. Agradeço aos colegas do laboratório: Ivone, Achla, Salvador, Andrei e em especial às amigas Erin e Jen por aliviarem minha solidão, pelas boas risadas e por serem tão amigas. Agradeço também à Elaine Flâmia pelos momentos especiais e por ter me ensinado a dar os primeiros passos em Nova York. O meu muito obrigada às minhas colegas do *Mount Sinai housing*: Sanaa, Aurore, Purva, Selina, Niamh e Jéssica, pelo intercâmbio cultural, por terem me ensinado inglês pacientemente e pelos momentos memoráveis em Nova York,

Aos inestimáveis amigos Zé Maria, Tarciane, Danila, Priscilla Barrios, Anna Luiza, Viviany, Renata, Natália, Letícia, Alexander e Daniela. Para os que estão longe, digo que a distância nunca será suficiente para separar nossa amizade, vocês estarão sempre presentes no meu coração!

À todos os professores cujos ensinamentos foram essenciais em minha formação,

À todos aqueles, que mesmo não mencionados, estiveram ao meu lado, contribuindo para a minha formação e para a realização deste estudo, o meu mais sincero muito obrigada!!!

***“Eu decidi ficar com o amor.  
O ódio é um fardo muito  
grande pra suportar.”***

***Martin Luther King Jr.***



## RESUMO

Pena, D.A. **Anticorpos conformacionais para PKCs clássicas e suas aplicações.** 2016. 145 p. Tese - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A família proteína quinases C (PKC) é composta por dez isoenzimas, as quais são capazes de fosforilar resíduos de serina e treonina. A ativação dessas quinases envolve mudanças conformacionais, como a remoção do pseudo-substrato do sítio ativo e associação dessas enzimas com lipídeos em membranas biológicas. Além disso, três fosforilações são importantes para a maturação/ enovelamento da enzima e não estão associadas com o estado de ativação das cPKCs. Apesar dessas quinases estarem envolvidas em vários processos patológicos, como carcinogênese e doenças cardiovasculares, ainda não se estabeleceu a relação entre estado de ativação das PKCs com essas doenças. Isso se deve, em parte, à ausência de ferramentas que possibilitam a distinção das formas ativas e inativas das PKCs. Na presente tese, baseando-se em mudanças conformacionais sofridas pelas PKCs durante o processo de ativação, dois anticorpos contra cPKCs ativas foram racionalmente desenvolvidos, sendo um anticorpo policlonal (anti-C2Cat) e outro monoclonal (4.8E). O anticorpo anti-C2Cat foi desenvolvido a partir de imunização de coelhos com um peptídeo localizado na região de interação entre os domínios C2 e catalítico na PKC inativa. Já o anticorpo monoclonal 4.8E foi produzido após a imunização de camundongos Balb/ C com extrato de proteínas proveniente de células HEK293T superexpressando formas constitutivamente ativas da PKC $\beta$ I. A seletividade de anti-C2Cat e 4.8E por cPKCs ativas foi demonstrada por ensaios de ELISA e de imunoprecipitação, sendo que os anticorpos sempre apresentaram maior afinidade por cPKCs ativas purificadas, superexpressas ou mesmo as endógenas. O anticorpo anti-C2Cat foi capaz de monitorar a dinâmica espaço-temporal da ativação das cPKCs em linhagens de neuroblastoma (Neuro-2A e SK-N-SH) estimuladas com PMA, morfina, ATP ou glutamato por diferentes tempos. Ainda, um maior conteúdo de cPKCs ativas foi detectado por anti-C2Cat na linhagem de câncer de mama MDA-MB-231 (triplo-negativa) do que em células MCF-7 (ER<sup>+</sup>). Em acordo com esses dados, anti-C2Cat identificou uma maior ativação de cPKCs em tumores mais agressivos de câncer de mama (subtipo triplo-negativo) do que em tumores menos agressivos (ER<sup>+</sup>, subtipo luminal). Os anticorpos conformacionais anti-C2Cat e 4.8E foram aplicados para elucidar vias de sinalização que levam à carcinogênese em células MDA-MB-231, por meio da realização de ensaios de co-imunoprecipitação, seguida pela identificação das proteínas por espectrometria de massas. Usando essa abordagem, os resultados sugerem que as cPKCs ativas possam estar envolvidas com a tradução de proteínas envolvidas na migração celular, como actina. Em conjunto, os resultados obtidos na presente tese demonstram duas formas racionais de desenvolver anticorpos contra cPKCs ativas, sendo que algumas aplicações para estas ferramentas foram demonstradas. Estratégias baseadas em mudanças conformacionais, similares às apresentadas aqui,

poderão ser utilizadas para a produção racional de anticorpos contra outras quinases ou proteínas.

**Palavras-chave:** Proteína Quinase C, mudanças conformacionais, anticorpos conformacionais, câncer de mama, neuroblastoma.

## ABSTRACT

Pena, D.A. **Conformational antibodies against classical PKCs and their applications**. 2016. 145 p. PhD Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The protein kinase C family (PKC) is composed of ten isoenzymes, which are capable of phosphorylating serine and threonine amino acid residues. PKC activation involves conformational changes, such as removing the pseudo-substrate from the active site and binding of the enzyme to lipids in biological membranes. In addition, PKC undergoes three phosphorylations that are important for the maturation/ folding of the enzyme and are not linked with activation status. Despite the fact that these kinases are involved in various pathological processes, such as carcinogenesis and cardiovascular disease, a relationship between PKC activation status with these diseases has not yet been established. This is partly due to the lack of tools to detect active PKC in tissue samples. In this thesis, based on conformational changes suffered by PKC during its activation, two antibodies against active cPKCs were rationally developed; a polyclonal antibody (anti-C2Cat) and a monoclonal (4.8E). Anti-C2Cat was produced after immunization of rabbits with a peptide located at the interface between the C2 and catalytic domains of cPKCs in an inactive PKC. The monoclonal antibody 4.8E was produced after immunization of Balb/C mice with total lysates from HEK293T cells overexpressing constitutively active forms of PKC $\beta$ I. The anti-C2Cat and 4.8E specificity by active cPKCs was demonstrated by ELISA and immunoprecipitation assays, where the antibodies always showed higher affinity to active cPKCs. Anti-C2Cat was able to detect the temporal and spatial dynamics of cPKC activation upon receptor (morphine, ATP or glutamate) or phorbol ester stimulation in neuroblastoma lines (Neuro-2A and SK-N-SH). Furthermore, anti-C2Cat is able to detect active PKC in human tissues. Higher levels of active cPKC were observed in the more aggressive triple negative breast cancer tumors as compared to the less aggressive estrogen receptor positive tumors. Also, both antibodies were applied to study signaling pathways that lead to carcinogenesis in MDA-MB-231 cells by performing co-immunoprecipitation and mass spectrometry. Using this approach, the results suggest that active cPKCs may be involved in translation of proteins involved in cell migration, such as actin. Taken together, the results obtained in this thesis showed two rational ways to develop antibodies against active cPKCs and some applications for these tools were demonstrated. Strategies based on conformational changes, similar to those presented herein may be used for rational production of antibodies against other kinases and proteins.

**Keywords:** Protein Kinase C, conformational changes, conformational antibodies, breast cancer, neuroblastoma.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT .....	11
1 INTRODUÇÃO .....	14
1.1 A família das Proteína Quinases C: Classificação e Estrutura.....	14
1.2 Mecanismos de ativação das PKCs.....	21
1.3 Métodos para mensurar a atividade das PKCs .....	32
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>37</b>
<b>3. MATERIAL &amp; MÉTODOS .....</b>	<b>38</b>
3.1 Linhagens celulares .....	38
3.2 Plasmídeos e construções .....	39
3.3 Expressão e purificação do domínio C2 da PKC $\beta$ acoplado ao GST.....	40
3.4 Western blot.....	42
3.5 Transfecção de células HEK293T com diferentes construções da PKC $\beta$ I.....	44
3.6 Fracionamento subcelular .....	45
3.7 Geração do modelo da PKC $\beta$ inativa .....	45
3.8 Produção de anticorpos policlonais anti-C2Cat.....	46
3.8.1 Conjugação de peptídeos com KLH e BSA .....	47
3.8.2 Imunizações de coelhos .....	47
3.8.3 ELISA para titulação dos anticorpos anti-C2-Cat.....	49
3.8.4 ELISA para determinar se o anti-C2Cat reconhece o domínio C2.....	50
3.8.5 ELISA para determinação da especificidade dos anticorpos produzidos.....	50
3.8.6 ELISA para análise da ativação das cPKCs .....	51
3.9 Produção de anticorpos monoclonais .....	52
3.9.1 Imunizações dos camundongos.....	52
3.9.2 Obtenção de hibridomas secretores de anticorpos.....	54
3.9.3 Triagem de hibridomas secretores de anticorpos anti-PKC $\beta$ I por ELISA.....	56
3.9.4 Clonagem do hibridoma 4.8E por diluição limitante .....	58
3.10 Ligação covalente de anticorpos aos <i>beads</i> de proteína G ou L.....	60
3.11 Ensaio de imunoprecipita�o .....	61

3.12 Espectrometria de massa.....	63
3.13 Imunofluorescência.....	65
3.14 Imunohistoquímica de microarranjo de tecido mamário.....	67
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>69</b>
4.1 Estratégia racional para produção de anticorpos anti-C2Cat.....	69
4.2 Anti-C2Cat reconhece o domínio C2 da PKC $\beta$ I.....	71
4.3 Anti-C2Cat reconhece preferencialmente as cPKCs ativas.....	74
4.4 Anti-C2Cat é capaz de imunoprecipitar mais eficientemente cPKCs após ativação com PMA.....	76
4.5 Anti-C2Cat é capaz de detectar cPKCs ativas após estimulação de receptores em linhagens de neuroblastomas.....	78
4.6 Aplicação dos anticorpos anti-C2Cat no câncer de mama.....	83
4.6.1 Avaliação dos níveis de expressão e localização subcelular das cPKCs.....	83
4.6.2 A linhagem MDA-MB-231 possui um maior conteúdo relativo de cPKCs ativas do que a linhagem MCF-7.....	87
4.6.3 Anticorpos anti-C2Cat detectam um maior conteúdo de PKC $\alpha$ e $\gamma$ ativas em células MDA-MB-231 quando comparadas a células MCF-7.....	88
4.6.4 Anti-C2Cat detecta mais cPKCs ativas em tumores de câncer de mama triplo-negativos.....	93
4.7 Estratégia para produção de anticorpos monoclonais específicos para formas ativas das cPKCs.....	97
4.7.1 O anticorpo monoclonal 4.8E reconhece preferencialmente cPKCs ativas ..	103
4.7.2 O epítipo reconhecido por 4.8E está presente na região V3 ou no domínio catalítico das cPKCs.....	106
4.8 cPKCs ativas podem estar envolvidas na síntese proteica na linhagem metastática de câncer de mama MDA-MB-231.....	108
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>113</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>125</b>
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>126</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>127</b>
<b>9 ANEXOS.....</b>	<b>138</b>
9.1 SÚMULA CURRICULAR.....	138

### 1 INTRODUÇÃO

#### 1.1 A família das Proteína Quinases C: Classificação e Estrutura

Em células eucarióticas, a reação de fosforilação consiste na transferência do grupo fosforila localizado na posição gama do ATP para hidroxilas de resíduos de aminoácidos de serina, treonina ou tirosina, presentes em substratos proteicos. As proteína quinases são responsáveis por catalisar essa reação (Taylor, Keshwani, Steichen, & Kornev, 2012). A fosforilação reversível de proteínas é a principal modificação pós-traducional responsável por conectar e integrar proteínas entre diversas redes de sinalização celular, sendo fundamental para regular a atividade, localização subcelular e interações proteína-proteína ou proteína-lipídeo (Prabakaran, Lippens, Steen, & Gunawardena, 2012).

A importância da fosforilação de proteínas em eucariotos é evidenciada pelo fato de que 2% do genoma codificam proteína quinases (Montenegro, Garcia-Viloca, González-Lafont, & Lluch, 2007). Além disso, estima-se que 30% das proteínas do proteoma humano sejam passíveis de fosforilação (Cohen, 2000) e que existem 700.000 resíduos potencialmente fosforilados das proteínas constituintes do genoma humano (Ubersax & Ferrell, 2007).

Em 1977, Nishizuka e colaboradores na Universidade de Kobe (Japão) descreveram um novo grupo de proteína quinases que são ativadas por proteólise, as quais foram denominadas Proteína Quinase C (PKCs) (Inoue, Kishimoto, Takai, & Nishizuka, 1977; Takai, Kishimoto, Inoue, & Nishizuka, 1977; Takai, Yamamoto,

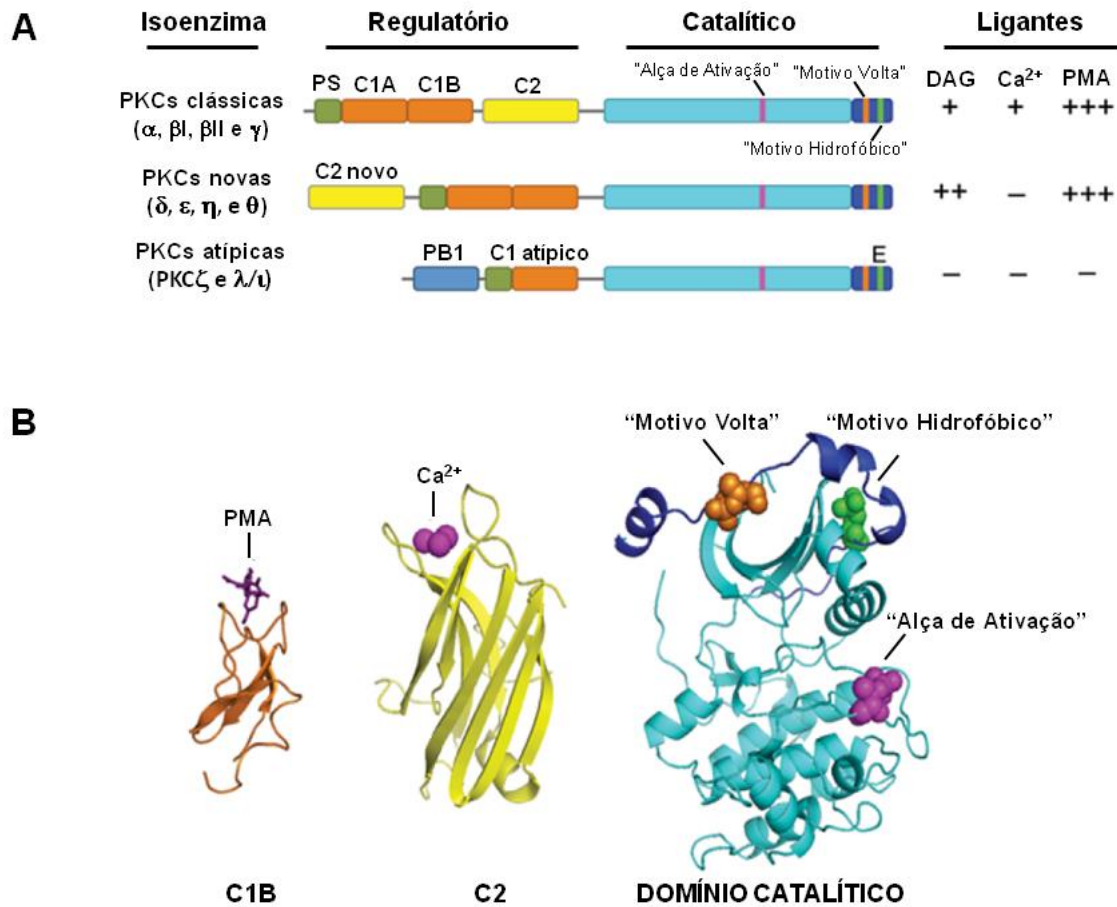
Inoue, Kishimoto, & Nishizuka, 1977). Estudos posteriores desenvolvidos pelo mesmo grupo demonstraram que estas quinases eram ativadas por cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e por um “fator associado às membranas”, descrito posteriormente como fosfolípídeos (Kaibuchi, Takai, & Nishizuka, 1981).

A família das PKCs é composta por nove genes que codificam dez isoenzimas, as quais são capazes de fosforilar resíduos de serina e treonina contidos em um motivo consenso de fosforilação (Nishizuka, 1988). Essas quinases são compostas por domínios quinase responsável pela atividade catalítica e um domínio regulatório que controla essa atividade. As isoenzimas das PKCs são diferentemente reguladas, devido às pequenas divergências estruturais nos seus domínios regulatórios e em virtude disso, são classificadas em PKCs clássicas, nóveis e atípicas (A. C. Newton, 2010; Reyland, 2009; Steinberg, 2008) (Figura 1). As PKCs clássicas (cPKC) que incluem as  $\text{PKC}\alpha$ ,  $\text{PKC}\beta\text{I}$ ,  $\text{PKC}\beta\text{II}$  e  $\text{PKC}\gamma$  são ativadas por  $\text{Ca}^{2+}$  e os lipídeos fosfatidilserina (PS) e diacilglicerol (DAG) ou por éster de forbol (análogo de DAG) (Castagna et al., 1982). As PKCs  $\beta\text{I}$  e  $\beta\text{II}$  são isoformas originadas por um evento de *splicing* alternativo e diferem apenas em 43 aminoácidos na extremidade C-terminal (Ono et al., 1987). Já as PKCs nóveis (nPKCs) são compostas pelas isoenzimas  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ , e  $\theta$ , sendo ativadas pelos mesmos fosfolípídeos responsáveis pela ativação das cPKCs, porém são insensíveis ao  $\text{Ca}^{2+}$  (A.C. Newton, 2010). Por outro lado, as PKCs atípicas (aPKC), que incluem as  $\text{PKC}\zeta$  e  $\lambda/\iota$ , não dependem de  $\text{Ca}^{2+}$  e DAG para sua ativação, sendo ativadas por interações proteína-proteína e por outros lipídeos como a ceramida (A. C. Newton, 1995). Em 2003, descreve-se uma nova variante da

PKC $\zeta$  (PKM $\zeta$ ), composta apenas de um domínio catalítico. Essa forma encontra-se expressa apenas no cérebro e é regulada por um promotor alternativo no gene da PKC $\zeta$  (Hernandez et al., 2003).

Apesar de serem muito semelhantes e reconhecerem a mesma sequência consenso, cada PKC desempenha funções únicas, fosforilando grupos específicos de substratos, os quais determinarão distintos efeitos fisiológicos. Isso se deve em parte pelas diferentes localizações subcelulares das diferentes isoenzimas das PKCs (Disatnik, Buraggi, & Mochly-Rosen, 1994). Em alguns casos, as PKCs podem inclusive exibir funções opostas. Por exemplo, a ativação da PKC $\epsilon$  é responsável por proteger cardiomiócitos da morte celular por isquemia. Entretanto, a ativação de outra isoenzima, da mesma subfamília, a PKC $\delta$ , promove o aumento da morte celular no mesmo processo (L. Chen et al., 2001).





**Figura 1. Esquema das estruturas primárias e terciárias das proteína quinases C.** (A) A porção N-terminal contém os domínios regulatórios compostos pelo: pseudo-substrato (PS; verde); os domínios C1A e C1B (laranja) que ligam o diacilglicerol (DAG) ou o éster de forbol (PMA), e o domínio C2 (amarelo) que se liga a lipídeos aniônicos de forma Ca<sup>2+</sup> dependente nas cPKCs. Nas aPKCs, o domínio C1, pode ligar outros lipídeos como a ceramida e contém um domínio de Phox e Bem1 (PB1) responsável por interações proteína-proteína. A porção C-terminal contém o domínio catalítico (azul). Os cofatores requeridos para a ativação das diferentes isoenzimas das proteína quinases C estão representados à direita, assim como suas afinidades relativas pelos seus respectivos domínios regulatórios. A PKM $\zeta$  (não representada na figura) é composta apenas pelo domínio catalítico. (B) Representação esquemática da estrutura terciária dos domínios C1B, C2 e domínio catalítico. Os sítios de fosforilação presentes na “Alça de Ativação”, “Motivo Volta” e “Motivo Hidrofóbico” são discutidos no texto (Adaptado de Wu-Zhang & Newton, 2013).

A estrutura primária das PKCs consiste em uma cadeia polipeptídica contendo cinco regiões variáveis encontradas entre cada domínio, o domínio

catalítico é altamente conservado entre as três subfamílias e o domínio regulatório, possui grande variação de sequência (Figura 1) (Steinberg, 2008; Taylor et al., 2012).

O domínio regulatório está presente na extremidade amino-terminal e contém o pseudo-substrato, uma região que possui um resíduo de alanina substituindo resíduos fosfoceptores serina/treonina numa sequência consenso reconhecida pela PKC. Dessa forma, o pseudo-substrato se assemelha a um substrato da PKC, porém não é passível de fosforilação, e pode levar à auto-inibição da enzima por ser capaz de interagir com o sítio catalítico da PKC (Kemp, Pearson, & House, 1991). Essa e outras interações intramoleculares entre os domínios regulatório e catalítico das PKCs auxiliam a manter a quinase inativa contribuindo para a regulação da atividade das PKCs. O domínio regulatório contém o domínio C1, que nas cPKCs e nPKCs encontram-se em *tandem* (C1A e C1B), sendo responsáveis pela ligação à DAG ou PMA. As aPKCs possuem apenas um domínio C1 com algumas diferenças estruturais e por isso se liga a lipídeos como ceramida, não sendo capazes de se ligarem ao DAG ou PMA (A. C. Newton, 1995; Nishizuka, 1988). O domínio regulatório também possui o domínio C2, capaz de se ligar a lipídeos aniônicos de maneira  $\text{Ca}^{2+}$  dependente nas cPKCs. Nas nPKCs, o domínio C2 não possui os resíduos de aspartato responsáveis por coordenar o íon de  $\text{Ca}^{2+}$  e por essa razão, não dependem de  $\text{Ca}^{2+}$  para ativação (A.C Newton, 2010). Já, as aPKCs não possuem o domínio C2, mas possuem o domínio de interação proteína-proteína Phox e Bem1 (PB1), o qual pode mediar a interação com outras proteínas que possuem esse mesmo

domínio e regular as suas funções (Moscat, Diaz-Meco, Albert, & Campuzano, 2006).

O domínio catalítico possui as regiões C3 e C4 que contêm sítios de ligação para ATP e substratos (Taylor et al., 2012). Além disso, é importante mencionar que o domínio V5, na extremidade C-terminal presente em todas as isoenzimas das PKCs, além de mediar interações proteína-proteína, também sofre fosforilações que são fundamentais para a maturação das PKCs (Figura 1) (A.C. Newton, 2003; Schechtman & Mochly-Rosen, 2001).

A elucidação da estrutura cristalográfica das PKCs tem sido um desafio, principalmente porque essas quinases possuem múltiplos domínios que sofrem extensas mudanças conformacionais e também por possuírem estruturas altamente flexíveis (Antal, Callender, Kornev, Taylor, & Newton, 2015; Zhang, Kazanietz, Blumberg, & Hurley, 1995). Estruturas dos domínios individuais em alta resolução estão disponíveis, incluindo os domínios C1A e C1B, C2 e catalítico de diferentes isoenzimas (Hommel, Zurini, & Luyten, 1994; Messerschmidt et al., 2005; Ochoa et al., 2001; Pappa, Murray-Rust, Dekker, Parker, & McDonald, 1998; Sutton & Sprang, 1998; Zhang et al., 1995). Em 2011, Leonard e colaboradores resolveram a estrutura cristalográfica da PKC $\beta$ II (Leonard, Rózycki, Saidi, Hummer, & Hurley, 2011). Entretanto, recentemente esses dados cristalográficos foram revistos baseando-se em dados bioquímicos. Nesse sentido, uma nova interpretação compatível com a PKC inativa foi proposta, sendo que esta conteria algumas das diversas interações intramoleculares contidas nas PKCs inativas (Antal, Callender, et al., 2015).

Estruturas cristalográficas de domínios C1B de diferentes PKCs complexados ao PMA mostraram que esse domínio é estruturalmente bastante conservado entre as diferentes isoenzimas. O domínio C1 possui cerca de 50 resíduos de aminoácidos, sendo formado por duas folhas  $\beta$  pequenas, formando um pequeno sulco, onde a molécula de PMA se liga por meio de ligações de hidrogênio. Além disso, o domínio C1 possui dois sítios de coordenação a íons zinco ( $Zn^{2+}$ ) (cada um formado por três resíduos de cisteína e um resíduo de histidina) que são fundamentais para o enovelamento correto desse domínio. Aminoácidos carregados positivamente, no domínio regulatório, interagem via interações eletrostáticas com os fosfolipídeos de membrana posicionando o domínio C1 na membrana e permitindo a sua posterior interação com o DAG (Hommel et al., 1994; Steinberg, 2008; Zhang et al., 1995).

A estrutura cristalográfica do domínio C2 mostrou que este possui cerca de 130 resíduos de aminoácidos, formado por oito folhas  $\beta$  antiparalelas conectadas por alças variáveis. A estrutura desse domínio nas cPKCs, cálcio dependentes, também mostrou que dois ou três íons  $Ca^{2+}$  se ligam de forma cooperativa a resíduos altamente conservados de aspartato presentes nas alças que conectam as folhas  $\beta$  (Pappa et al., 1998; Sutton & Sprang, 1998). Nesse caso, uma vez ligado ao  $Ca^{2+}$  o domínio C2, pode se ligar diretamente a lipídeos aniônicos, como fosfatidilserina, por meio de interações eletrostáticas. Outros resíduos de aminoácidos do domínio C2 medeiam a penetração desse domínio na bicamada lipídica (Steinberg, 2008; Verdaguer, Corbalan-Garcia, Ochoa, Fita, & Gómez-Fernández, 1999). Dessa forma, os íons  $Ca^{2+}$  auxiliam na ligação aos lipídeos. Já

nas nPKCs a afinidade do domínio C2 por lipídeos é maior, dispensando os íons  $\text{Ca}^{2+}$  (Steinberg, 2008; Verdaguer et al., 1999).

A estrutura cristalográfica do domínio catalítico das PKCs só foi resolvida em 2004 (Xu et al., 2004). O domínio catalítico é bastante conservado nas quinases em geral, possuindo cerca de 250 aminoácidos que formam os lóbulos N e C. O lóbulo N é composto principalmente por folhas  $\beta$  e também possui uma alça rica em glicinas responsável por ligar o ATP e posicionar o fosfato  $\gamma$  para a catálise. Já o lóbulo C é predominantemente composto por  $\alpha$ -hélices. Entre os dois lóbulos forma-se uma cavidade onde o substrato se liga (Kobe & Kemp, 1999; Steinberg, 2008). Para a fosforilação de proteínas, ocorre a abertura e fechamento dessa cavidade, e os substratos proteicos são ancorados no sítio de ligação ao substrato próximo ao sítio ativo, de forma a permitir que o grupo hidroxila do resíduo a ser fosforilado esteja posicionado para receber o fosfato- $\gamma$  do ATP (Taylor et al., 2012).

### **1.2 Mecanismos de ativação das PKCs**

As PKCs podem ser ativadas por vários hormônios como adrenalina e angiotensina, fatores de crescimento, incluindo insulina e EGF (fator de crescimento epidérmico) e neurotransmissores como dopamina e endorfina (Daria Mochly-Rosen, Das, & Grimes, 2012b). Essas moléculas podem se ligar a receptores acoplados a proteínas G, do tipo Gq, ou a receptores do tipo tirosina quinase (Harden & Sondek, 2006). Em ambos os casos, ocorrerá a ativação de

membros da família das fosfolipases C (PLC) (Gresset & Harden, 2012). A PLC ativa irá provocar a hidrólise do fosfolípido de membrana fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>) em fosfatidilinositol 1,4,5-trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG), que permanecerá associado às membranas. O IP3 liberado irá se difundir para o citosol e se ligará aos seus receptores no retículo endoplasmático, causando uma rápida liberação de Ca<sup>2+</sup> para o citosol. As moléculas de DAG juntamente com Ca<sup>2+</sup> irão se ligar aos domínios C1 e C2, respectivamente, e atuarão sinergicamente na ativação das PKCs (Gresset & Harden, 2012; Daria Mochly-Rosen et al., 2012b).

A ativação das PKCs pode ainda ocorrer independente de um receptor. O aumento dos níveis citoplasmáticos de Ca<sup>2+</sup> pode ativar diretamente a PLC e por consequência as PKCs (Daria Mochly-Rosen, Das, & Grimes, 2012a). Além disso, PKCs podem ser ativadas por clivagem proteolítica mediada por Caspase 3 na região de junção entre os domínios regulatório e catalítico (V3). Essa clivagem produz um fragmento de 40 kDa que funciona como enzima constitutivamente ativa, semelhante à PKMζ, uma vez que não possui interações intramoleculares com o domínio regulatório que mantêm a enzima na conformação inativa (Emoto et al., 1995). As PKCs podem também ser ativadas por interação proteína-proteína, em particular as PKCs atípicas, podem ser ativadas por meio da interação com proteínas da família PAR (Partitioning defective complex) pelo domínio PB1 (Graybill, Wee, Atwood, & Prehoda, 2012).

Várias modificações pós-traducionais também são capazes de ativar PKCs. Por exemplo, o estresse oxidativo moderado pode levar à oxidação de cisteínas

do domínio C1 e à ativação da PKC $\gamma$  (Gopalakrishna & Jaken, 2000). Além disso, já foi demonstrado que a acetilação, nitração e fosforilação de PKCs podem levar a ativação de algumas isoenzimas (Balafanova, 2002; Steinberg, 2010).

A ativação das PKCs está geralmente associada com a translocação dessas enzimas da fração citoplasmática (solúvel) para a fração particulada, que inclui a membrana plasmática e de organelas (Kraft & Anderson, 1983; D Mochly-Rosen, 1995). Durante o processo de ativação, as PKCs sofrem inúmeras mudanças conformacionais, o que provoca a interrupção de interações intramoleculares e a exposição de regiões que são envolvidas na interação com o substrato e proteínas adaptadoras (Schechtman & Mochly-Rosen, 2001). Além disso, para a maturação das PKCs, essas quinases sofrem três fosforilações na região V5 que são essenciais para a estabilidade e competência catalítica da enzima (A. C. Newton, 2003). Essas fosforilações ocorrem: i) na “alça de ativação” que fica próximo ao sítio ativo, ii) no “motivo de volta” e iii) “motivo hidrofóbico”, o qual é flanqueado por aminoácidos hidrofóbicos (Figuras 1 e 2) (Keranen, Dutil, & Newton, 1995). É importante mencionar, que as aPKCs possuem um resíduo de glutamato (fosfomimético) no “motivo hidrofóbico” e por isso não são fosforiladas nessa região (Figura 1) (A. C. Newton, 2010).

O primeiro evento de fosforilação ocorre em um resíduo de treonina da “alça de ativação”. As PKCs recém-sintetizadas adotam uma conformação relativamente aberta ligada às membranas e possuem a “alça de ativação” expostas, o que possibilita a fosforilação das mesmas pela PDK-1 (*3-phosphoinositide Dependent Protein Kinase-1*) (Figura 2). Essa fosforilação é

fundamental na estabilização das PKCs, uma vez que essas quinases são degradadas em células que perderam a PDK-1 (Balendran, Hare, Kieloch, Williams, & Alessi, 2000). Além disso, essa fosforilação é importante por alinhar corretamente os resíduos de aminoácidos envolvidos na catálise (A. C. Newton, 2003).

A consequência imediata dessa primeira fosforilação é a fosforilação do “motivo de volta” e subsequentemente a do “motivo hidrofóbico”. Essas fosforilações são imprescindíveis para estabilizar a estrutura já madura das PKCs (A. C. Newton, 2010) (Figura 2). Estudos realizados com mutantes da PKC $\beta$ II que perderam a atividade de quinase mostraram que esses não apresentaram fosforilações nos “motivos de volta e hidrofóbico”, sugerindo que essas fosforilações são catalisadas pela própria PKC $\beta$ II (auto-fosforilações) (Behn-Krappa & Newton, 1999). Trabalhos mais recentes têm demonstrado que a fosforilação nesses motivos é dependente da atividade da quinase do complexo mTORC2, pois em células que não expressam essa quinase, as PKCs são instáveis e por isso são degradadas (Ikenoue et al. 2008; A. C. Newton, 2010). Interessantemente, ensaios *in vitro* mostram que mTORC2 não é capaz de fosforilar o “motivo de volta” das PKCs, porém o “motivo hidrofóbico” pode ser fosforilado por várias quinases, incluindo mTORC2 (Ikenoue et al., 2008). Dessa forma, ainda não está claro o papel exato de mTORC2 no controle dessas fosforilações (Ikenoue et al., 2008). Ainda, a fosforilação no “motivo hidrofóbico” parece ser controlada pela interação com a chaperona HSP90 (*heat shock protein*



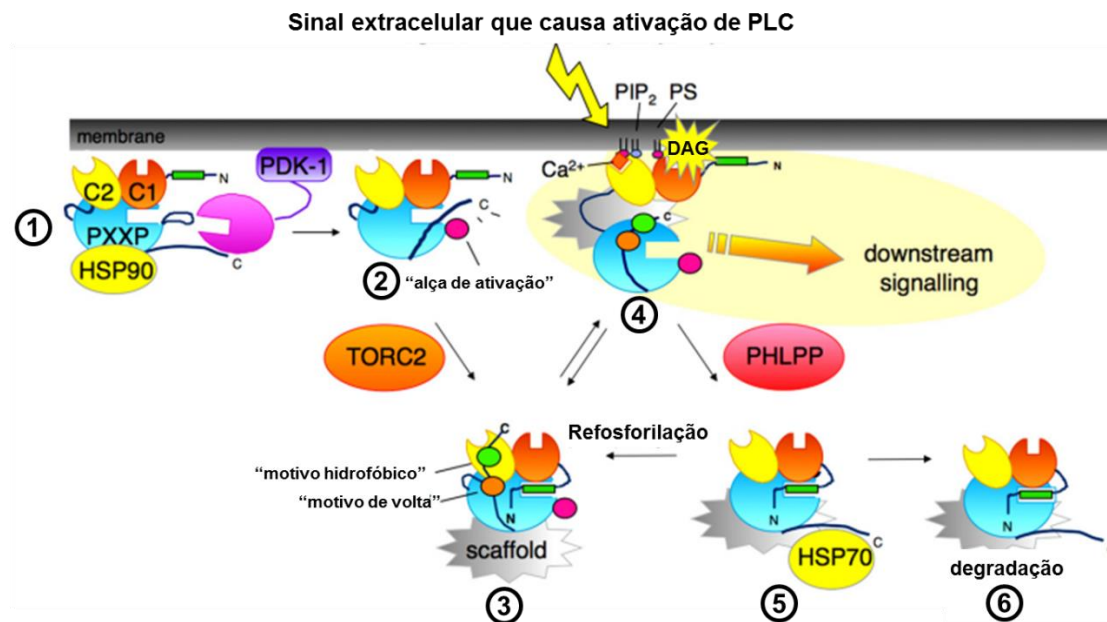
90 kDa), isso porque inibidores da HSP90 leva a uma redução na fosforilação nesse sítio (Gould & Newton, 2008).

Para a ativação das c e nPKCs é fundamental que essas quinases possam se associar com segundos mensageiros. Após os três eventos de fosforilação, as PKCs maduras são posicionadas no citosol por meio de interação com proteínas parceiras (A. C. Newton, 2010; Schechtman & Mochly-Rosen, 2001). Essas quinases permanecem na conformação inativa (pseudo-substrato ocupando o sítio ativo) até que segundos mensageiros se liguem aos seus domínios regulatórios, o que causará inúmeras mudanças conformacionais e translocação das quinases para membranas celulares (Figura 2) (A. C. Newton, 2010).

Com aumento intracelular da concentração de íons  $\text{Ca}^{2+}$  provocado pela ativação das PLCs, esses íons se associam ao domínio C2 das cPKCs e causam mudanças conformacionais e a translocação das cPKC para membranas celulares, onde essas quinases irão se associar a lipídios aniônicos, tais quais fosfatidilserina e PIP2. Nas membranas, as PKCs também irão se ligar ao DAG através do domínio C1. A ligação conjunta de  $\text{Ca}^{2+}$ , fosfatidilserina e DAG irá liberar energia suficiente para promover a remoção do pseudo-substrato da cavidade de ligação ao substrato e a consequente ativação das cPKCs (Makowske & Rosen, 1989; A C Newton, 2009). Portanto, verifica-se que tanto as formas inativas quanto ativas das cPKCs possuem as três fosforilações mencionadas acima e que apenas após a ligação de lipídeos e  $\text{Ca}^{2+}$  que as cPKCs adotam uma conformação ativa (A C Newton, 2009) Dessa forma, diferentemente

de --outras quinases, como a ERK (Payne et al., 1991) a fosforilação não se correlaciona diretamente com a ativação da PKC.

É importante mencionar que o domínio C1 das cPKCs se liga a membranas contendo PMA com uma afinidade duas vezes maior do que quando se liga ao DAG. Por tal motivo, o tratamento de células com PMA leva ao recrutamento de PKCs para membranas e a liberação do pseudo-substrato do sítio ativo, mesmo na ausência de  $\text{Ca}^{2+}$  (Mosior & Newton, 1996).



**Figura 2. Esquema ilustrativo do “ciclo de vida” das PKCs clássicas.** As cPKCs recém-sintetizadas (**1 e 2**) associam-se à membranas e apresentam o pseudo-substrato e a “alça de ativação” expostos, o que permite a sua fosforilação por PDK-1. Nesta etapa, existem chaperonas (HSP90) que auxiliam no processo de maturação das PKCs. O passo seguinte consiste na fosforilação do “motivo de volta” e do “motivo hidrofóbico”, sendo que essas fosforilações parecem ser dependente da atividade do complexo mTORC2. As PKCs completamente fosforiladas e maduras (**3**), estão localizadas no citosol, podendo inclusive estar associadas com proteínas adaptadoras (*scaffolds*). Nessa etapa o pseudo-substrato encontra-se ligado ao sítio catalítico. Quando um agonista se liga a um receptor que causa ativação de fosfolipase C (PLC), ocorre a hidrólise de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato ( $PIP_2$ ), liberação de  $Ca^{2+}$  e produção diacilglicerol (DAG). A ligação de  $Ca^{2+}$  ao domínio C2 irá promover a associação das PKCs com membranas celulares por meio de lipídios aniônicos (fosfatidilserina e  $PIP_2$ ) (**4**). As PKCs irão então se difundir pelas membranas até encontrar o DAG, o qual se ligará às PKCs por meio do domínio C1. Esses segundos mensageiros irão induzir mudanças conformacionais nas PKCs. Nessa etapa as PKCs se encontram ativas, uma vez que o pseudo-substrato foi removido da cavidade de ligação ao substrato, permitindo a fosforilação de substrato e sinalização *downstream*. A PKC ativa possui conformação aberta e por isso é sensível à defosforilação pela fosfatase PHLPP (**5**). Essa espécie pode ser re-fosforilada com o auxílio de HSP70 (**3**) ou ser degradada via ubiquitina-proteassomo (**6**) (Adaptado de A C Newton, 2009).

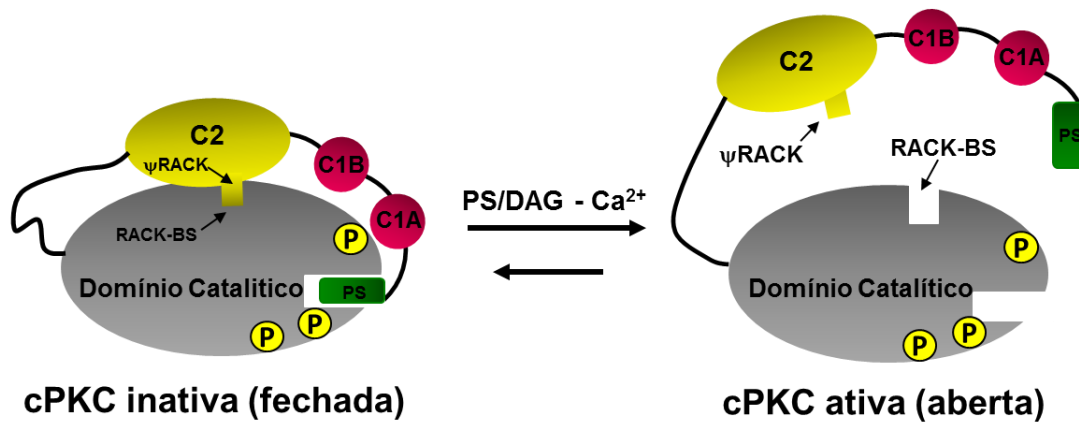
A ativação completa das nPKCs ocorre de forma semelhante ao descrito para cPKCs. No entanto, a afinidade do domínio C1B das nPKCs por DAG é duas

vezes maior que para o domínio C1B de cPKCs (Giorgione, Lin, McCammon, & Newton, 2006). Isso permite que as nPKCs possam translocar para membranas celulares em resposta ao aumento fisiológico de DAG, mesmo contendo um domínio C2 que é incapaz de se associar com íons  $\text{Ca}^{2+}$ .

Por muitos anos, os modelos de ativação das PKCs focaram em mudanças conformacionais que a quinase sofria em decorrência da interrupção da interação entre o pseudo-substrato e a cavidade de ligação ao substrato (Steinberg, 2008). Isso porque estudos mostraram que mutações que levavam ao rompimento da interação entre essas duas regiões geravam formas ativas das PKC (Pears, Kour, House, Kemp, & Parker, 1990). Além disso, anticorpos dirigidos contra o pseudo-substrato resultavam na interrupção da interação entre pseudo-substrato e sítio catalítico, também culminando na ativação das PKCs (Makowske & Rosen, 1989).

Embora o mecanismo de ativação/ translocação das PKCs não seja totalmente entendido, demonstrou-se que a organização espaço-temporal das vias de sinalização por PKC é determinada pela interação das PKCs com proteínas adaptadoras chamadas RACKs (*Receptor for Activated C Kinase*) (D Mochly-Rosen & Gordon, 1998; D Mochly-Rosen, Khaner, & Lopez, 1991). Baseado no fato de que as PKCs só se ligariam à sua RACK após a sua ativação, supôs-se que o sítio de ligação à RACK não estaria exposto numa enzima inativa e sim envolvida em uma interação intra-molecular como é o caso do pseudo-substrato. Dessa forma, esses autores identificaram regiões na sequência das PKCs que possuem similaridade com a sequência de aminoácidos presentes nas RACKs, denominada pseudo-RACK ( $\psi$ RACK). A  $\psi$ RACK participaria de uma interação

intra-moleculares com o sítio de ligação à RACK auxiliando na manutenção das PKCs numa conformação inativa (Ron et al., 1994). Além disso, as PKCs possuem mais de uma região de ligação à RACK (Stebbins & Mochly-Rosen, 2001). Demonstrou-se que quando as PKCs são ativadas por lipídeos e cálcio, essa interação intramolecular é rompida e as PKCs passam a se associar com suas RACKs, uma vez que estas possuem maior afinidade por PKCs do que a região da  $\psi$ RACK (Figura 3) (Ron et al., 1994).



**Figura 3. Representação esquemática das formas inativa e ativa da PKC clássica.** Como indicado, várias interações intramoleculares ocorrem na enzima inativa (conformação fechada), como a interação entre o sítio de ligação à RACK (RACK-BS, localizado no domínio catalítico V5) e a  $\psi$ RACK (localizada no domínio C2), assim como a interação entre o pseudo-substrado (PS, localizado no domínio regulatório) e o domínio catalítico. Após a ativação com lipídeos (PS/DAG e  $\text{Ca}^{2+}$ ) as interações intramoleculares são interrompidas, levando à exposição do RACK-BS,  $\psi$ RACK e do sítio catalítico (conformação aberta). Note que as formas inativas e ativas das cPKCs encontram-se igualmente fosforiladas.

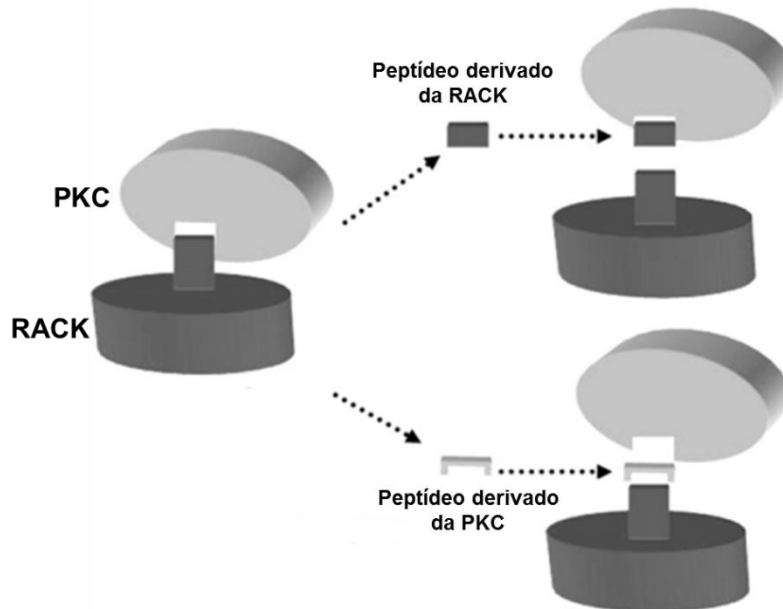
Até o momento foi descrito a existência de duas RACKs: a RACK1 e  $\epsilon$ RACK, as quais são específicas para a PKC $\beta$ II e PKC $\epsilon$ , respectivamente (Csukai, Chen, Matteis, Mochly-Rosen, & De Matteis, 1997; Ron et al., 1994). Por exemplo,

a PKC $\beta$ II possui a sequência SVEIWD no domínio C2 que possui homologia com a sequência SIKIWD na RACK1. Acredita-se que a presença de um resíduo básico (lisina) na sequência da RACK1, em contraposição ao resíduo ácido (glutamato) na PKC $\beta$ I ( $\psi$ RACK) explicaria a maior afinidade da PKC $\beta$ II pela sua RACK. Por essa razão, quando ocorre ativação da PKC $\beta$ II essa interação intramolecular é desfeita para que a PKC possa interagir com sua RACK (Schechtman & Mochly-Rosen, 2002).

As RACKs são proteínas adaptadoras constituídas por repetições do motivo WD40, os quais estão envolvidos em interações proteína-proteína e, portanto, conferem às mesmas a habilidade de se associar a várias proteínas (Ron et al., 1994). Dessa forma, as RACKs são capazes de unir diversas proteínas participantes do mesmo processo de transdução de sinal (Schechtman & Mochly-Rosen, 2001). Ainda, essas proteínas adaptadoras são importantes por ancorar as PKCs ativas a membranas celulares, aproximando as PKCs dos seus substratos e conferindo a especificidade das vias de sinalização (Schechtman & Mochly-Rosen, 2001).

É importante mencionar que as RACKs não são substratos para PKCs, entretanto na presença de RACK a fosforilação dos substratos por PKC aumenta várias vezes (Ron et al., 1994). Cada RACK reconhece uma isoenzima específica da PKC, de forma que peptídeos podem ser desenhados para inibir seletivamente a interação de uma determinada PKC com a sua respectiva RACK. Esses peptídeos de seis a dez aminoácidos mimetizam o sítio de interação da PKC ou da

RACK e interferem especificamente com a translocação e por consequência com a atividade de uma dada PKC (Figura 4) (Schechtman & Mochly-Rosen, 2002).



**Figura 4. Diagrama representativo dos peptídeos inibidores das PKCs.** As isoenzimas das PKCs quando ativadas se associam especificamente às suas RACKs. Peptídeos derivados da RACK na região aonde se liga a PKC, ou ainda peptídeos derivados do sítio de ligação da RACK (RACK-BS) na PKC, potencialmente são capazes de bloquear a interação entre a PKC e RACK e, por consequência inibem a PKC. Estas estratégias são utilizadas para inibição específica das diferentes isoenzimas das PKCs. (Adaptado de Costa-Junior, Suetsugu, Krieger, & Schechtman, 2009).

Durante muitos anos, tentativas frustradas para o desenvolvimento de moduladores específicos da atividade de cada isoenzima das PKCs foram realizadas. Essa dificuldade existe devido à alta conservação do domínio catalítico entre essas quinases. Dessa forma, o desenvolvimento racional de peptídeos moduladores foi fundamental para que a função de cada isoenzima pudesse ser seletivamente estudada (Churchill, Qvit, & Mochly-Rosen, 2010).

O término da sinalização via PKC pode ocorrer pela remoção dos segundos mensageiros ou degradação das PKCs. Quando ativada, as PKCs adotam uma conformação aberta que expõe os sítios fosforilados à ação das fosfatases. Gao e colaboradores (2008) descreveram uma fosfatase denominada PHLPP (*PH domain Leucin-rich repeat Protein Phosphatase*) que catalisa a defosforilação das PKC, levando à desestabilização e degradação dessas quinases (Tianyan Gao, Brognard, & Newton, 2008). No entanto, essas formas defosforiladas podem ser refosforiladas com auxílio da HSP70 (T. Gao & Newton, 2006). Além disso, os níveis celulares da PKC podem ser regulados via ubiquitina-proteassoma, visto que a E3 ligase RINK (*RING-finger protein that interacts with C kinase*) é capaz de ubiquitinar as PKCs e que sua superexpressão leva à redução dos níveis de PKCs (D. Chen et al., 2007).

### **1.3 Métodos para mensurar a atividade das PKCs**

As PKCs desempenham funções regulatórias críticas em vários processos biológicos. A alteração dos níveis de expressão e atividade dessas quinases contribui para a carcinogênese (Garg et al., 2014; Urtreger, Kazanietz, & Bal de Kier Joffé, 2012). Porém, a ausência de ferramentas que permitem mensurar a atividade das PKCs ou distinguir as formas ativas das PKCs das inativas em amostras de pacientes, tem dificultado o entendimento dos papéis dessas quinases no câncer (Garg et al., 2014).



Apesar de anos de intensa investigação, o conhecimento da relação entre cada PKC e seus substratos com a tumorigênese é limitado. Isso se deve a diversos fatores como: i) falta de especificidade de alguns anticorpos, ii) existência de discrepância entre os níveis de mRNA codificadores para PKCs e seus níveis proteicos, iii) ausência de ferramentas que possam ser utilizadas para detectar o estado de ativação das PKCs, principalmente em tumores (Garg et al., 2014). Além desses fatores, o fato das diferentes PKCs apresentarem perfis de expressão variáveis, assim como a existência de diferentes substratos em diferentes contextos, contribui para dificultar a compreensão do papel exato de uma isoenzima ou substrato em particular na tumorigênese (Martiny-Baron & Fabbro, 2007).

Os métodos atualmente disponíveis para avaliação da atividade das PKCs requerem a transfecção de células com sondas para determinar a atividade dessas quinases ou mesmo a preparação de um extrato proteico, o que inviabiliza a detecção de PKCs ativas *in situ* em amostras de pacientes (Sakai et al., 1997; Shirai, Kashiwagi, Yagi, Sakai, & Saito, 1998; J. D. Violin, Zhang, Tsien, & Newton, 2003).

A ativação das PKCs tem sido associada com a translocação destas quinases para membranas desde a sua descoberta, em que foi demonstrado que ésteres de forbol causava a redistribuição das PKCs do citosol para membranas (Kraft & Anderson, 1983). Nesse sentido, ensaios de translocação foram desenvolvidos baseando-se na redução da solubilidade da enzima quando esta é ativada por um determinado agonista, ou seja, perante um estímulo ativador as

PKCs se associam à fração particulada e passam a ser resistentes à extração com quelantes de cálcio, mas são sensíveis à extração com detergentes não-aniônicos (Kazanietz, Krausz, & Blumberg, 1992). Os ensaios de translocação envolvem uma etapa inicial em que as frações solúveis (citossólica) e particuladas (membranar) são separadas. A segunda etapa é realizada para possibilitar a extração de proteínas apenas da fração particulada usando um detergente não-iônico (Triton X-100), sendo obtido uma fração solúvel ao detergente que contém membranas celulares e uma fração insolúvel, contendo proteínas do citoesqueleto. Ao final do processo, as proteínas são analisadas por ensaios de Western blot utilizando anticorpos específicos para cada PKC (Kazanietz et al., 1992). Alternativamente, a translocação das PKCs para membranas pode ser avaliada por imunofluorescência seguida por análise em microscópio. Esse método tem a vantagem de permitir a detecção no início da ativação das PKCs e por possibilitar a visualização da distribuição espacial das PKCs em células (Sando et al., 2003). Ainda, a ativação das PKCs pode ser monitorada em tempo real em microscópio confocal utilizando células superexpressando PKCs em fusão com GFP (Sakai et al., 1997). Esses estudos revelaram o comportamento dinâmico das PKCs no interior das células e sua distribuição espaço-temporal, além de mostrar que estímulos específicos levam à ativação de uma determinada PKC, revelando assim diferenças funcionais entre as isoenzimas das PKCs (Sakai et al., 1997; Shirai et al., 1998).

Como os métodos apresentados acima fornecem medidas indiretas da atividade da PKC, Violin e colaboradores (2003) propuseram um método que

permite a quantificação direta da atividade das PKCs por FRET (“Transferência de Energia de Ressonância por Fluorescência”), denominado CKAR (*C Kinase activity reporter*). Nesse caso, células são transfectadas com um peptídeo repórter que contém um consenso de fosforilação para PKC, um domínio de ligação ao peptídeo substrato fosforilado (FHA2), além das proteínas fluorescentes CFP (*Cyan Fluorescent Protein*) e YFP (*Yellow Fluorescent Protein*). Na ausência de PKC ativa, as proteínas CFP e YFP encontram-se a uma distância menor que 10 nm e quando CFP é excitada por um comprimento de onda de 434 nm ocorre a emissão luz em 476 nm que leva a excitação de YFP, o qual emitirá luz no comprimento de onda 528 nm. Quando as células são estimuladas com um composto que promove ativação de PKC, esta irá fosforilar o peptídeo substrato, causando a associação do domínio FHA2 com substrato fosforilado. Essa mudança conformacional resulta no distanciamento de CFP e YFP com consequente redução na medida de FRET. Esse método possui diversas vantagens como: permitir o estudo em células vivas em tempo real, possibilidade de direcionar a sonda CKAR para compartimentos subcelulares específicos, além de interferir minimamente com funções celulares, já que não se baseia em superexpressão (J. D. Violin et al., 2003; J. Violin & Newton, 2003).

Adicionalmente a atividade das PKCs pode ainda ser mensurada por ensaios radioativos de incorporação de  $\gamma^{32}$ -P-ATP ou por ensaios de ELISA que utilizam um peptídeo substrato e anticorpos específicos para formas fosforiladas desse peptídeo (Boyle et al., 2014; Sando et al., 2003). Ainda, a atividade das PKCs pode ser mensurada após a imunoprecipitação desta quinase seguida pela

adição de ativadores (lipídios e/ou  $\text{Ca}^{2+}$ ) e de substratos proteicos (por exemplo, histona ou mielina básica). Essas proteínas são analisadas por SDS-PAGE e coradas com um corante específico para fosfoproteínas (Pro-Q Diamond) (Sando et al., 2003), ou com anticorpos anti-serina ou treonina fosforilada (Jones, Craik, Gibbins, & Poole, 2004).

Anticorpos capazes de detectar apenas formas ativas das cPKCs não estão disponíveis. Existem apenas anticorpos que reconhecem cPKCs fosforiladas, no entanto, estes são incapazes de diferenciar formas ativas das inativas, visto que as fosforilações nas cPKCs fazem parte do processo de maturação dessa subclasse de quinases e estão presentes tanto na forma ativa como inativa, conforme ressaltado na Figura 3 (Wu-Zhang & Newton, 2013). Nesse contexto, o desenvolvimento de anticorpos capazes de distinguir as conformações ativas e inativas das PKCs poderá ser útil para acompanhar os processos e estímulos que levam à ativação dessas quinases em níveis endógenos e para a detecção de proteínas parceiras e substratos que interagem especificamente com as formas ativas das cPKCs. Além disso, tais anticorpos poderão ser aplicáveis em estudos que envolvam a utilização de amostras de tecidos, como na detecção dos níveis de ativação de PKCs em amostras de tecido tumoral.

### 2 OBJETIVOS

O trabalho desenvolvido na presente tese possui dois objetivos gerais, descritos a seguir:

#### **Objetivo 1: Desenvolver anticorpos policlonais específicos para PKCs clássicas ativas e explorar suas aplicações**

1. Produzir anticorpos policlonais que reconhecem preferencialmente formas ativas das PKCs clássicas;
2. Caracterizar anticorpos conformacionais policlonais que reconhecem especificamente as cPKCs ativas;
3. Identificar as proteínas que interagem com as cPKCs ativas em linhagem de câncer de mama triplo-negativa MDA-MB-231;
4. Avaliar o valor prognóstico dos anticorpos anti-C2Cat em câncer de mama.

#### **Objetivo 2: Desenvolver anticorpos monoclonais específicos para PKCs clássicas ativas**

1. Produzir anticorpos monoclonais que reconhecem preferencialmente formas ativas das PKCs clássicas;
2. Caracterizar os anticorpos monoclonais que reconhecem especificamente as cPKCs ativas;
3. Identificar as proteínas que interagem com as cPKCs ativas na linhagem MDA-MB-231.

### 3. MATERIAL & MÉTODOS

#### 3.1 Linhagens celulares

Nesta tese foram utilizadas as seguintes linhagens celulares: HEK293T (linhagem epitelial de rim embrionário humano), HeLa (linhagem de câncer cervical humano), MCF-7 (linhagem de câncer de mama humano, ER<sup>+</sup>, subtipo luminal) e MDA-MB-231 (linhagem de câncer de mama humano, subtipo triplo-negativo), Neuro 2A (linhagem de neuroblastoma de camundongo), SK-N-SH (linhagem de neuroblastoma humano) e a P3U1 (linhagem de mieloma de camundongo) .

A linhagem celular HEK293T foi gentilmente cedida pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Bettina Malnic (Universidade de São Paulo, Instituto de Química) e a linhagem HeLa foi cedida pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Renata Rosito Tonelli (Universidade Federal de São Paulo). Ambas as linhagens foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Sigma-Aldrich, MO, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB; Life Technologies Co.), penicilina (50 U/mL, Life Technologies Co.), estreptomicina (50 µg/mL, Life Technologies Co.).

As linhagens celulares de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231 foram gentilmente cedidas pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Letícia Labriola (Universidade de São Paulo, Instituto de Química) e foram cultivadas em meio DMEM/ F12 e RPMI-1640 (Sigma-Aldrich), respectivamente. Ambos os meios foram preparados sem

vermelho de fenol e suplementados com 10% de SFB e antibióticos nas concentrações descritas acima.

As células de mieloma P3U1, utilizadas nos ensaios de fusão para a produção de anticorpos monoclonais, foram gentilmente cedidas pela Dr<sup>a</sup>. Maria Júlia Manso Alves (Universidade de São Paulo, Instituto de Química) e cultivadas em meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de SFB e antibióticos.

Todas as linhagens celulares ao atingirem 60 - 80% de confluência foram subcultivadas e/ou plaqueadas para o tratamento experimental. Também foram feitos estoques celulares em 90% soro fetal bovino e 10% DMSO (dimetilsulfóxido) em reservatório contendo nitrogênio líquido. Todas as linhagens foram mantidas em estufa umidificada a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>.

### 3.2 Plasmídeos e construções

O domínio C2 da PKC $\beta$  (aminoácidos 152-292) foi subclonado em vetor de expressão pGEX 4T-1 (gentilmente cedido pela prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Suely Lopes Gomes da Universidade de São Paulo, Instituto de Química), após amplificação a partir do cDNA da PKC $\beta$ I (PKCLab.org) usando os iniciadores descritos na Tabela 1. A subclonagem foi realizada entre os sítios de restrição de *Bam* HI and *Xho* I. O domínio C2 foi expresso em fusão com a proteína GST (*glutathione S-transferase*) em *Escherichia coli* BL21 (DE3).

Tabela 1. Sequência dos iniciadores utilizados para a realização das clonagens das sequências codificantes do domínio C2 das PKC $\beta$  (oligonucleotídeos F-C2-*Bam*HI e R-C2-*Xho*I), da WTPKC $\beta$ I (F- $\beta$ I full-*Bam*HI e R- $\beta$ I-*Xho*I) e  $\Delta$ NPSPKC $\beta$ I (F- $\beta$ I cut-*Bam*HI e R- $\beta$ I-*Xho*I)

Oligonucleotídeos	Orientação	Sequência
F-C2- <i>Bam</i> HI	<i>Forward</i>	ATTGATGGATCCTACATGCAGGCCCAACA
R-C2- <i>Xho</i> I	<i>Reverse</i>	ATACATCTCGAGGCCTTCTTCCTGGCTTA
F- $\beta$ I full- <i>Bam</i> HI	<i>Forward</i>	ATATTTAGGATCCCAGATGGCTGACCCG
R- $\beta$ I- <i>Xho</i> I	<i>Reverse</i>	CAGGTCCGTCTCGAGCTACACATTAATG
F- $\beta$ I cut- <i>Bam</i> HI	<i>Forward</i>	ATATTTAGGATCCCAGATGAACGTGCAC

As construções expressando as PKC $\beta$ I selvagem (WTPKC $\beta$ I) e a PKC $\beta$ I contendo uma deleção dos 30 primeiros aminoácidos da extremidade N-terminal ( $\Delta$ NPSPKC $\beta$ I) foram ambas clonadas no vetor de expressão em células de mamífero pcDNA 3.1+ entre os sítios de *Bam* HI e *Xho* I. Foi utilizado nas clonagens da WTPKC $\beta$ I e  $\Delta$ NPSPKC $\beta$ I os iniciadores F- $\beta$ I full-*Bam*HI/ R- $\beta$ I *Xho*HI e F- $\beta$ I cut- *Bam*HI/ R- $\beta$ I *Xho*HI, respectivamente, que estão descritos na Tabela 1.

### 3.3 Expressão e purificação do domínio C2 da PKC $\beta$ acoplado ao GST

A expressão do domínio C2 em fusão com GST e da proteína GST foi realizada em sistema heterólogo de *Escherichia coli* cepa BL21 (DE3), as quais foram transformadas pelo método de choque térmico (Sambrook et al. 1989) com o vetor pGEX 4T-1 contendo a sequência codificante para o domínio C2 da PKC $\beta$  ou apenas com o vetor pGEX 4T-1. Para tanto, 1 ng de cada plasmídeo foi adicionado a alíquotas de 100  $\mu$ L de bactérias competentes em glicerol 20% e



CaCl<sub>2</sub> 0,1 M. As bactérias foram então mantidas por 20 minutos em banho de gelo, seguido pelo choque térmico em banho-maria a 42°C e 5 minutos em banho de gelo. Posteriormente, foram adicionados 600 µL de meio Luria-Bertani líquido (LB líquido, Sigma-Aldrich) e as bactérias incubadas por 1 hora a 37°C. As bactérias transformantes foram selecionadas por meio de um cultivo em LB meio sólido (Sigma-Aldrich) contendo 100 µg/mL de carbenicilina (Sigma-Aldrich) (Sambrook et al. 1989).

Com o objetivo de induzir a expressão do domínio C2 em fusão com GST de forma solúvel, foi adicionado IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo - Sigma-Aldrich) em diferentes concentrações (800, 400 e 200 µM) às culturas em fase logarítmica de crescimento (densidades óticas de indução 0,4 e 0,8). Além disso, foram testados quatro temperaturas de crescimento (18 °C, 22 °C, 28 °C e 37 °C). As bactérias foram crescidas em meio LB líquido contendo carbenicilina, a partir de colônias isoladas da placa de meio LB ágar. Os cultivos foram realizados nas condições citadas acima por 12 horas, em incubadora com agitação (New Brunswick Scientific Co., INC). A indução da expressão da proteína GST foi feita quando as bactérias atingiram a densidade ótica de 0,4 a 37 °C, com 400 µM de IPTG. Após a indução as bactérias foram cultivadas por 12 horas.

As bactérias crescidas nas diferentes condições foram lisadas à temperatura ambiente por 30 minutos em tampão PBS pH 7,4 contendo 1% de Triton X-100, 200 µg/mL de Lisozima (Sigma), coquetel contendo inibidores de protease (1:10, Sigma-Aldrich®) e inibidores de fosfatase (1:10, Roche). Esse homogenato foi em seguida sonificado em gelo por 2 minutos em amplitude de 60

Hz (Branson Sonifier 250) com a sonda inserida diretamente no tubo contendo a amostra. Em seguida o material foi centrifugado por 10 minutos a 10.000 RPM para separar o sobrenadante (fração solúvel) e o sedimento (fração insolúvel).

A purificação do domínio C2 em fusão com GST, assim como a proteína GST sozinha, foi realizada por cromatografia de afinidade usando a resina glutationa Sefarose 4B (GE Healthcare). Brevemente, a resina foi equilibrada usando cinco volumes de PBS pH 7,4, seguida pela adição do lisado bacteriano e lavagem da resina com 10 volumes de PBS pH 7,4. A eluição da proteína foi realizada utilizando cinco volumes de 50 mM de Tris-HCl e 10 mM de glutationa reduzida pH 8,0. Frações de 1 mL foram coletadas, sendo a absorbância em 280 nm mensurada para detecção e quantificação de proteínas. As frações positivas foram analisadas por gel SDS-PAGE 10% e as proteínas visualizadas através de coloração com Coomassie Blue. Utilizando essa metodologia foi possível obter o domínio C2 em fusão com GST e a proteína GST parcialmente purificados.

### **3.4 Western blot**

Lisados totais (100 µg) foram ressuspensos em tampão Laemmli (60 mM Tris-HCl pH 6,8; 2% SDS; 10 % glicerol; 5% β-mercaptoetanol; 0,01 % Azul de bromofenol), fervidos durante 10 minutos em banho-maria, sendo em seguida resolvidos por SDS-PAGE pelo método de Laemmli (1970). Em seguida, as proteínas do gel foram transferidas para membranas de nitrocelulose, com o auxílio de um aparato de transferência (Bio-Rad) a 100 V por 1 hora ou 15 V por

16 horas em câmara fria, de acordo com o método de Towbin (Towbin, Staehelin, Gordon, & Ross, 1995).

As membranas de nitrocelulose foram bloqueadas com tampão de bloqueio PBS-T contendo 5% de leite desnatado (Molico), 0,05 % de Tween 20 em PBS pH 7,4 por 2 horas a temperatura ambiente. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários, os quais foram diluídos em tampão de bloqueio PBS-T, por 16 horas em câmara fria sob agitação constante.

Foram utilizados anticorpos específicos para cada cPKC anti-PKC $\alpha$  (sc-208), anti-PKC $\beta$ I (sc-8049 and sc-209), anti-PKC $\beta$ II (sc-210) e PKC $\gamma$  (SC-211) (Santa Cruz Biotechnology), todos na concentração de 0,4  $\mu$ g/mL. Ainda, foram utilizados os anticorpos anti- $\alpha$ -tubulina (1:5000) (Sigma-Aldrich), anti-puromicina (1:100), o qual foi gentilmente cedido pelo prof. Dr. Isaias Glezer da Universidade Federal de São Paulo, e anti-GST (1:1000), o qual foram produzidos e gentilmente cedidos pela prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Suely Lopes Gomes da Universidade de São Paulo, Instituto de Química.

Após o término da incubação com os anticorpos primários, as membranas foram lavadas três vezes com PBS-T por 15 minutos à temperatura ambiente. As membranas foram subsequentemente incubadas por uma hora com anticorpo secundário específico conjugados à peroxidase (1:1000, GE-Healthcare) e em seguida lavadas como descrito anteriormente. Todas essas incubações foram realizadas sob agitação e a temperatura ambiente.

A revelação foi realizada pelo método de quimiluminescência sob filmes fotográficos (Enhancer Chemi-Luminescence, GE-Healthcare) de acordo com as

instruções do fabricante. Para a análise quantitativa, as auto-radiografias foram escaneadas e quantificadas utilizando-se o software Image J (<http://imagej.nih.gov/ij/>). A significância estatística foi determinada utilizando-se o Teste de Bonferroni (GraphPad Software, Inc).

### 3.5 Transfecção de células HEK293T com diferentes construções da PKC $\beta$ I

O polímero polietilenoimina (PEI) (1mg/mL), 25,6  $\mu$ L, foi diluído em 520  $\mu$ L de DMEM *high glucose* sem soro. A essa solução foi então adicionado 8  $\mu$ g de DNA (construções WTPKC $\beta$ I,  $\Delta$ NPSPKC $\beta$ I,  $\Delta$ C1PKC $\beta$ I e  $\Delta$ C1C2PKC $\beta$ I), que foi incubada por 10 minutos à temperatura ambiente. Após essa etapa, o complexo DNA/PEI foi então adicionado a uma garrafa (75 cm<sup>2</sup>) contendo células na confluência de 60 – 80%, cultivadas em meio DMEM *high glicose* suplementado com 10% de SFB.

As células transfectadas foram então mantidas a 37°C em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas, e lisadas para a realização de ensaios de Western blot, ELISA e imunoprecipitação. Alternativamente, as células foram fixadas com 4% de paraformaldeído, conforme descrito no item 3.13 para realização dos ensaios de imunofluorescência. Além disso, a eficiência de transfecção foi monitorada por Western blot, utilizando o anticorpo anti-PKC $\beta$ I.

### 3.6 Fracionamento subcelular

O fracionamento subcelular objetivando separar frações solúveis e particuladas (contendo as PKCs ativas) foi realizado conforme descrito previamente (Schechtman, Murriel, Bright, & Mochly-Rosen, 2003). Brevemente, as linhagens celulares HEK293T, MCF-7 e MDA-MB-231 foram lisadas com tampão de homogeneização (Tris-Cl 20 mM, pH 7,4; EDTA 2 mM; EGTA 10 mM e sacarose 250 mM), contendo um coquetel de inibidores de protease (1:10, Sigma-Aldrich) e de inibidores de fosfatase (1:10, Roche). Células foram então separadas em frações solúveis e particuladas, por meio de ultracentrifugação do lisado a 100.000 g por 40 minutos a 4 °C. O sobrenadante contendo a fração solúvel foi separado e o precipitado homogeneizado em tampão DE (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5; EDTA 1 mM; EGTA, 1 mM e 1% Triton-X 100) contendo inibidores de protease e fosfatase, conforme descrito acima. Esse homogenato foi em seguida sonificado por 30 minutos em amplitude de 60 Hz (Branson Sonifier 250) com a sonda em banho de gelo. A concentração de proteína foi determinada pelo método colorimétrico de Bradford (Bio-Rad Laboratories, Inc.) e ensaios de Western blot realizados conforme descrito anteriormente.

### 3.7 Geração do modelo da PKC $\beta$ inativa

A geração do modelo da PKC $\beta$  inativa foi realizada em colaboração com o Dr. Paulo Sérgio Lopes de Oliveira do Laboratório Nacional de Biotecnologia (LnBio).

Para tanto, foi utilizado o programa YASARA (<http://www.yasara.org/index.html>) (Krieger, Darden, Nabuurs, Finkelstein, & Vriend, 2004) e se baseou em coordenadas da estrutura cristalográfica da PKC $\beta$ II (Leonard et al., 2011) disponível no *Protein Data Bank* (PDB). Operações de simetria foram realizadas para buscar domínios de quinases em unidades assimétricas vizinhas que fazem contato com o domínio C2. Os resíduos de aminoácidos que formam a longa alça que conecta os domínios C1A e C2 foram deletados, sendo que foi utilizado o domínio C2 original a partir da unidade assimétrica depositado no PDB. Uma nova posição para o domínio C2 foi determinada ancorado ao domínio catalítico, usando operações de simetria do grupo de espaço. O modelo produzido foi confirmado pela observação da interação entre K205, no domínio C2 e E655, no domínio catalítico, previamente descrita e validada por Antal e colaboradores (Antal, Callender, et al., 2015).

### **3.8 Produção de anticorpos policlonais anti-C2Cat**

A utilização, manutenção e manipulação dos coelhos seguiram as normas de bem estar animal, de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Controle de Experimentação Animal (CONCEA) devidamente aprovado pela Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA), do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (Certificado número 19/2011).

### 3.8.1 Conjugação de peptídeos com KLH e BSA

Previamente à imunização de coelhos, o peptídeo C2Cat (KDRRLSVEIWDWDLT) (Proteimax) foi conjugado ao carreador proteico KLH (*Keyhole Limpet Hemocyanin*) (Sigma Aldrich, EUA) com glutaraldeído ou à proteína soro albumina bovina (BSA). As proteínas KLH ou BSA foram inicialmente reconstituídas em 5 mL de tampão PBS pH 7,4 para a concentração de 1 mg/mL. Em seguida, o peptídeo C2Cat (2,5 mg) foi pesado e dissolvido em solução com a proteína carreadora a 4 °C sob agitação. Posteriormente, foi adicionada à solução de carreador e peptídeo, uma solução de glutaraldeído, gota a gota, até atingir a concentração final de 1%. A reação de acoplamento ocorreu sob agitação contínua por 2 horas a 4 °C. Após esse período, o glutaraldeído reativo foi inativado pela adição de 10 µL de solução de Tris 1M pH 8,0 para cada 10 mL de solução de conjugação. A solução resultante foi dialisada contra PBS pH 7,4 por 24 horas a 4 °C.

### 3.8.2 Imunizações de coelhos

Dois coelhos machos com aproximadamente 60 dias de idade, adquiridos do Biotério do IQ/USP (Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da USP) foram imunizados por via subcutânea em quatro a cinco locais distintos do dorso do animal. A imunização foi repetida a cada duas semanas. A primeira imunização foi realizada

com 2 mL de emulsão com 500 µg do imunógeno C2Cat-KLH e adjuvante completo de Freund's. As quatro imunizações subsequentes foram realizadas na presença do imunógeno C2Cat-KLH e adjuvante incompleto de Freund's.

Como controle negativo para os ensaios subsequentes, antes da primeira imunização, foi feita a retirada de cerca de 2 mL de sangue para a coleta do soro pré-imune. Para obtenção de soros hiperimunes, foram realizadas sangrias dos animais 15 dias após a terceira, quarta e quinta imunização. Em todos esses casos, o sangue foi coletado a partir da veia marginal da orelha após dilatação do vaso com luz infravermelha e assepsia com álcool 70%.

O soro foi então obtido após o sangue permanecer a 37°C por 1 hora para formação de coágulo e outra hora em banho de gelo para retração do coágulo. Após esse período, centrifugou-se o material a 1.000 g por 10 minutos a 4°C. O soro obtido foi aliquoteado, identificado e armazenado a -20°C até o momento dos testes.

Os títulos de anticorpos produzidos foram avaliados pelo método de ELISA indireto usando o peptídeo C2Cat conjugado à BSA (descrito no item 3.8.1). Após a confirmação do título de anticorpos, os coelhos foram submetidos à sangria final para obtenção de soro contendo anticorpos anti-C2Cat. Para tanto, os animais foram anestesiados pela veia marginal da orelha, conforme descrito acima, usando ketamina (50 mg/kg) associada a xilazina (5 mg/kg).

Posteriormente, os animais foram eutanasiados por meio da administração da dose anestésica (ketamina associada à xilazina, nas concentrações descritas acima), até que o animal entrasse em anestesia profunda. Em seguida, foi



administrado o dobro da dose anestésica e ao final os coelhos foram colocados em câmara de CO<sub>2</sub> somente para certificação da eutanásia.

### 3.8.3 ELISA para titulação dos anticorpos anti-C2-Cat

Os ensaios enzimáticos por imunoabsorção (ELISA) foram realizados utilizando o peptídeo C2Cat conjugado ao BSA (C2Cat-BSA), 100 ng, diluído em 100 µL de PBS pH 7,4. Essa solução foi adicionada a poços de placas de 96 poços e incubado por 16 horas a 4 °C. Como controle, placas idênticas foram sensibilizadas apenas com 100 ng por poço da proteína BSA e processadas como descrito abaixo.

Em seguida, as placas foram lavadas três vezes com solução de PBS pH 7,4 e bloqueadas com solução de PBS pH 7,4 contendo 5% de leite em pó desnatado (Molico) por 1 hora a 37 °C. Após essa etapa, 100 µL do soro hiperimune e pré-imune nas diluições seriadas de 1:120 a 1:3840 foram adicionados e as placas foram então incubadas por 1 hora a 37 °C. Como controle negativo, em algumas condições, os anticorpos primários foram substituídos pela adição apenas de PBS pH 7,4.

O próximo passo consistiu em lavar as placas três vezes com solução de PBS pH 7,4 contendo 0,05% Tween-20 e na adição de anticorpo secundário anti-IgG de coelho acoplado à enzima peroxidase (Sigma-Aldrich) na diluição 1:5000. As placas foram novamente incubadas por 1 hora a 37 °C e lavadas como descrito anteriormente. A seguir, 100 µL do substrato cromógeno tetrametilbenzina (TMB)

(BD Biosciences) foi adicionado a cada poço. As placas foram então incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente. Por fim, a leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro de placa a 655 nm (Biotek Synergy HT Multi-Mode).

### **3.8.4 ELISA para determinar se o anti-C2Cat reconhece o domínio C2**

A capacidade do anticorpo anti-C2Cat de reconhecer o domínio C2 em fusão com a proteína GST foi avaliada por ELISA. Para tanto, os ensaios foram realizados utilizando 1, 10, 25 e 50 ng do domínio C2 em fusão com GST ou as mesmas quantidades da proteína GST. Essas proteínas foram então diluídas em 100 µL de PBS pH 7,4, seguida pela adição dessa solução em cada poço de placas de 96 poços e incubação por 16 horas a 4 °C. O restante do ensaio foi realizado conforme descrito no item anterior, sendo que em algumas condições, os anticorpos primários foram substituídos pela adição de PBS pH 7,4 (controle negativo).

### **3.8.5 ELISA para determinação da especificidade dos anticorpos produzidos**

Como as PKCs possuem grande similaridade de sequência, a especificidade dos anticorpos anti-C2Cat (e também do anticorpo monoclonal 4.8E, descrito abaixo) foi avaliada por ensaios de ELISA, visto que esses anticorpos poderiam reconhecer mais de uma isoenzima. Dessa forma, os ensaios

foram realizados utilizando 100 ng das cPKCs recombinantes e purificadas (PKC $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II,  $\gamma$ ,  $\delta$  e  $\epsilon$ ), as quais foram diluídas em 100  $\mu$ L de PBS pH 7,4, seguida pela adição dessa solução em cada poço de placas de 96 poços e incubação por 16 horas a 4 °C. O restante do ensaio foi realizado conforme descrito no item 3.8.3, sendo que foi utilizado o anticorpo anti-C2Cat na diluição 1:100 (e o sobrenadante do hibridoma 4.8E puro). Como controle negativo, em algumas condições, os anticorpos primários foram substituídos pela adição de PBS pH 7,4.

### 3.8.6 ELISA para análise da ativação das cPKCs

A ativação das cPKCs foi analisada como descrito por Souroujon et al. (2004). Brevemente, 10  $\mu$ g de cada isoenzima (PKC $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II,  $\gamma$ ,  $\delta$  e  $\epsilon$ ) recombinante e purificada foi incubada com 100  $\mu$ L 20 mM de Tris-HCl pH 7,4 contendo 40  $\mu$ M de ATP, 40 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2 mM de CaCl<sub>2</sub>, 60  $\mu$ g/mL de fosfatidilserina (PS) e 2  $\mu$ g/mL de dioleoylglycerol (DAG) a 37°C por 30 minutos. O volume dessa solução foi ajustada para 10 mL com tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,4 e 100  $\mu$ L contendo 100 ng de PKC foi adicionado em cada poço de uma placa de 96 poços e incubado por 1 hora a 37 °C. Em seguida, as placas foram lavadas em PBS pH 7,4 contendo 0,05% Tween-20 e o restante do ensaio realizado como descrito anteriormente.

Em paralelo, placas idênticas às descritas acima foram preparadas com cPKC purificadas, porém essas foram incubadas apenas com 100  $\mu$ L Tris-HCl 20 mM pH 7,4 em banho de gelo, sendo que as etapas subsequentes do ensaio

foram realizadas como descrito para PKCs previamente incubadas com lipídeos e  $\text{Ca}^{2+}$  (PKCs ativas).

A afinidade dos anticorpos por cPKC ativas foi determinado pela razão da absorbância na presença e ausência de ativadores das cPKCs (lipídeos e cálcio).

### 3.9 Produção de anticorpos monoclonais

A utilização, manutenção e manipulação dos camundongos seguiram as normas de bem estar animal, de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foram devidamente aprovados pela Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA), do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (Certificado número 08/2013).

#### 3.9.1 Imunizações dos camundongos

Para a obtenção de linfócitos B secretores de anticorpos que reconhecem com maior afinidade formas ativas das cPKCs, camundongos Balb/ C foram imunizados por via intraperitoneal (i.p.) com lisado total de células HEK293T transfectadas com a construção  $\Delta\text{NPSPKC}\beta\text{I}$  como descrito no item 3.5. Essa construção expressa uma forma constitutivamente ativa da PKC $\beta\text{I}$ , visto que não codifica os 30 primeiros aminoácidos da extremidade amino-terminal, onde a região do pseudo-substrato esta localizada. Na ausência dessa região, a enzima

perde uma importante interação intramolecular entre o domínio regulatório e catalítico, mantendo-se assim numa conformação aberta e, constitutivamente ativada (Pears et al., 1990).

Após 24 horas de transfecção, as células foram lisadas em tampão PBS pH 7,4 contendo 0,1 % de Triton X-100, coquetel inibidores de protease e fosfatase nas concentrações descritas no item 3.6. Após serem passados três vezes por uma seringa 26G ½, os lisados foram congelados em gelo seco, sonicados e centrifugados a 10.000 g por 10 minutos à 4 °C. Os sobrenadantes foram então coletados e a quantidade de proteínas total determinada pelo método colorimétrico de Bradford (Bio-Rad Laboratories, Inc.).

Quatro camundongos fêmeas da linhagem Balb/ C (oito semanas de idade) foram imunizados por via i.p. com 50 µg do lisado total de células HEK293T transfectadas preparado em 200 µL de PBS pH 7,4. Foram administradas quatro doses em intervalos de sete dias entre cada uma, sendo que quatro dias após a quarta imunização, foi procedida uma dose reforço por via intravenosa (veia caudal).

Antes da primeira imunização e após a terceira e quarta imunizações, amostras de sangue foram coletadas para obtenção do soro. O título de anticorpos anti-PKCβI no soro dos camundongos foi analisado por ELISA usando a proteína recombinante PKCβI (descrito no item 3.8.3), sendo que o animal que apresentou o maior título de anticorpos anti-PKCβI foi então selecionado para os ensaios de fusão.

### 3.9.2 Obtenção de hibridomas secretores de anticorpos

Quatro dias após a dose reforço, o camundongo que apresentou maior título de anticorpos anti-PKC $\beta$ I foi sacrificado após anestesia com Avertina (250 mg/Kg) administrada intraperitonealmente, seguida por deslocamento cervical. Os animais foram então embebidos em álcool 70% em placa de Petri e levados a uma cabine de segurança biológica, para obtenção dos esplenócitos de forma estéril. O baço do camundongo foi removido e lavado 10 vezes por meio da transferência deste órgão para diferentes placas de Petri contendo meio RPMI-1640. Na última placa, a cápsula do baço foi rompida e os esplenócitos no interior desse órgão foram removidos com ajuda de uma pinça flambada. A suspensão celular foi transferida para um tubo cônico, o qual foi mantido em repouso por cerca de 10 minutos para permitir que as células pudessem decantar.

Durante esse período, cerca de  $1 \times 10^7$  células de mieloma (linhagem P3U1) foram ressuspensas em 40 mL de meio RPMI1640, sendo centrifugadas a 1000 g por 5 minutos a 4 °C. O meio de cultura foi descartado e o precipitado celular ressuspensado em 10 mL de meio RPMI-1640. É importante salientar que no dia anterior à fusão, as células de mieloma foram transferidas de garrafas de 25 cm<sup>2</sup> para garrafas de cultura celular de 75 cm<sup>2</sup>, para atingirem a fase logarítmica de crescimento, pois as células nessa fase apresentam melhor viabilidade para a fusão (Yokoyama et al., 2013).

Para obtenção dos hibridomas, os esplenócitos foram adicionados a um tubo cônico de 50 mL já contendo as células de mieloma, ajustado-se o volume

final para 40 mL com meio RPMI-1640. As células foram centrifugadas a 1000 *g* por 5 minutos a 4 °C e o sobrenadante cuidadosamente removido, já que nessa etapa o precipitado celular é pouco compacto. Sobre o precipitado foi adicionado 1 mL de PEG 4000 (50% de PEG 4000 em PBS) (Gibco BRL) previamente aquecido a 37°C, gota a gota, durante 1 minuto, homogeneizando-se constantemente com movimentos rotativos suaves. Em seguida, durante 1 minuto, o tubo contendo a mistura de células de mieloma e esplenócitos foi novamente homogeneizado com movimentos rotativos. Após isso, adicionou-se ao precipitado celular 30 mL de meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB e antibióticos, sendo as células então centrifugadas a 1000 *g* por 5 minutos a 4 °C. A seguir, as células foram delicadamente ressuspensas em 20 mL de meio HAT (meio RPMI-1640 com 100 µM de hipoxantina, 0,4 µM de aminopterin e 16 µM de timidina – Sigma-Aldrich) suplementado com 10 % SFB e antibióticos, usando pipeta de 10 mL. Cerca de 100 µL da suspensão celular foi distribuída em cada poço de placas de cultura de 96 poços, as quais foram mantidas a 37°C, em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

A seleção dos hibridomas foi realizada por meio do cultivo em meio HAT por cerca de 15 dias e sempre que o meio de cultura apresentou coloração amarelada, metade do volume foi removido e substituído por meio HT (meio RPMI-1640 com 100 µM de hipoxantina e 16 µM de timidina – Sigma-Aldrich) contendo 10 % de SFB e antibióticos.

### 3.9.3 Triagem de hibridomas secretores de anticorpos anti-PKC $\beta$ I por ELISA

Os hibridomas que apresentaram crescimento no meio de seleção quando observados em microscópio e tornavam o meio acidificado tiveram parte do sobrenadante coletado para ser analisado para verificar se eram produtores de anticorpos anti-PKC $\beta$ I.

Para triagem dos hibridomas, dois diferentes tipos de ensaios de ELISA foram conduzidos. Em um deles, foi utilizado extrato total de células HEK293T transfectadas com as construções  $\Delta$ NPSPKC $\beta$ I e WTPKC $\beta$ I, assim como extrato total de células HEK293T não transfectadas e em outro ensaio foi utilizada a proteína PKC $\beta$ I purificada como antígeno.

O primeiro ensaio de triagem consistiu em ensaios de ELISA usando células HEK293T transfectadas com as construções WTPKC $\beta$ I ou  $\Delta$ NPSPKC $\beta$ I, assim como células HEK293T não transfectadas. Esse ensaio teve como objetivo detectar apenas aqueles hibridomas que secretavam anticorpos que reconheciam preferencialmente o extrato total de células HEK293T superexpressando a PKC $\beta$ I ativa (transfectadas com a construção  $\Delta$ NPSPKC $\beta$ I).

Nesse sentido, células HEK293T foram transfectadas conforme descrito no item 3.5 com as construções WTPKC $\beta$ I ou  $\Delta$ NPSPKC $\beta$ I. Vinte e quatro horas após as transfecções, lisados totais das células transfectadas ou das células controle (não- transfectadas) foram preparados em tampão PBS pH 7,4 contendo 0,1 % de Triton X-100, coquetel inibidores de protease e fosfatase nas mesmas concentrações descritas acima. A seguir, as células foram passadas três vezes



por uma seringa de 1 mL 26G ½, congelados (-80°C) e descongelados três vezes. Os lisados foram ainda sonicados por 30 minutos em amplitude de 60 Hz (Branson Sonifier 250) com a sonda em banho de gelo e centrifugados a 10.000 g por 10 minutos a 4°C e os sobrenadantes coletados, sendo a quantidade total de proteínas dosadas pelo método colorimétrico de Bradford (Bio-Rad Laboratories, Inc.).

Para o ELISA, 10 µg de proteínas (lisado proteico das células) diluídos em 20 µL de PBS pH 7,4 foram adicionados a cada poço de uma placa de 96 poços com fundo chato. Em seguida, as placas foram destampadas e incubadas em estufa 37 °C até que o conteúdo líquido sofresse evaporação completa. Os sítios inespecíficos foram então bloqueados com 200 µL de PBS pH 7,4 contendo 3% de BSA por 1 hora a 37 °C. O próximo passo consistiu na incubação de 100 µL de sobrenadante de hibridoma (não diluído) por 16 horas a 4 °C. Após esse período, a solução de anticorpos foi aspirada e as placas lavadas três vezes, por meio de incubações de 5 minutos com solução de PBS pH 7,4 contendo 1% de BSA.

Os anticorpos secundários anti-IgG e anti-IgM de camundongo acoplado à enzima peroxidase (Sigma-Aldrich) foram diluídos 3000 vezes em solução de PBS pH 7,4 contendo 1 % de BSA e incubados às placas por uma hora a 37 °C. A seguir, as placas foram lavadas conforme descrito acima e o substrato TMB (100 µL) adicionado e incubado a temperatura ambiente por 30 minutos. As leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro de placa a 655 nm (Biotek Synergy HT Multi-Mode).

Os hibridomas que reconheceram com maior afinidade o extrato total de células HEK293T transfectadas com as construções WTPKC $\beta$ I ou  $\Delta$ NPSPKC $\beta$ I do que o extrato de células não transfectadas foram submetidos a um segundo ensaio de ELISA, com o intuito de verificar se os anticorpos produzidos ligavam-se especificamente à PKC $\beta$ I. Para tanto, placas de 96 poços foram sensibilizadas com 100 ng da proteína recombinante e purificada PKC $\beta$ I, a qual foi diluída em 100  $\mu$ L PBS pH7,4. Em seguida, as placas foram lavadas com PBS pH 7,4 e bloqueadas como descrito no item 3.8.3. Após essa etapa, 100  $\mu$ L do sobrenadante de cada hibridoma foram adicionados por poço e as placas incubadas por 2 horas a 37 °C. Como controle negativo, em algumas condições, os sobrenadantes foram substituídos pela adição apenas de PBS pH 7,4. O restante do ensaio foi realizado como descrito no item 3.8.3. Além disso, a especificidade do anticorpo 4.8E foi determinada utilizando as PKCs purificadas (PKC $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II,  $\gamma$ ,  $\delta$  e  $\epsilon$ ), conforme descrito anteriormente (item 3.8.5).

### **3.9.4 Clonagem do hibridoma 4.8E por diluição limitante**

Utilizando os métodos de triagem descritos no item anterior, foi possível a identificação de um único hibridoma, chamado 4.8E, capaz de secretar anticorpos com maior afinidade por PKC $\beta$ I ativa. Dessa forma, esse hibridoma foi submetido à clonagem por diluição limitante, com o objetivo de minimizar problemas de poli-especificidade e também para eliminar as células não-secretoras, que podem

crescer demais, em detrimento dos hibridomas secretores de anticorpos (Yokoyama et al., 2013).

Nesse contexto, o hibridoma 4.8E foi inicialmente expandido em placas de 24 poços e submetido à clonagem por diluição limitante. Dessa forma, as células híbridas foram diluídas em meio RPMI-1640 nas concentrações de 10, 1 e 0,5 células por mililitro. A partir dessas diluições, alíquotas de 100  $\mu$ L foram distribuídas em cada poço de placas de 96 poços. Após isso, as placas foram observadas em microscópio invertido (Nikon Eclipse TS100) e poços contendo uma única célula foram identificados.

A próxima etapa consistiu no preparo de *feeder layer* a partir de baços de camundongos Balb/ C. Para isso, o sacrifício dos animais, remoção do baço e coleta de esplenócitos do interior desse órgão foram realizados conforme descrito item 3.8.2. Após a obtenção dos esplenócitos, estes foram incubados em estufa a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> por 16 horas, com o objetivo de certificar que os esplenócitos não estavam contaminados. A seguir, foi adicionada uma camada de células contendo cerca de 1000 esplenócitos por poço de cada placa contendo células únicas de hibridomas. Após o crescimento das células híbridas, estas foram novamente submetidas aos testes de triagem conforme descrito anteriormente.

Além disso, foram feitos estoques celulares em 90% soro fetal bovino e 10% DMSO em reservatório contendo nitrogênio líquido.

### 3.10 Ligação covalente de anticorpos aos *beads* de proteína G ou L

Os anticorpos anti-C2Cat e 4.8E foram ligados covalentemente aos *beads* de proteína G agarose e *beads* de proteínas L agarose, respectivamente. Para isso, os *beads* foram lavados 2 vezes com PBS pH 7,4 e ressuspensos em igual volume desse tampão. A esse volume foram adicionados igual volume de tampão PBS contendo 1 mg/mL BSA seguida por incubação por 10 minutos a 4 °C sob agitação. Após isso, as amostras foram centrifugadas a 9.000 g por 10 minutos, sendo o sobrenadante removido. A seguir foi adicionado 5 µL do anticorpo anti-C2Cat ou 1 mL de sobrenadante do hibridoma 4.8E para cada 50 µL de *beads*, sendo a mistura incubada a 4 °C durante 2 horas sob agitação. Ao final desse tempo, as amostras foram novamente centrifugadas a 9.000 g por 10 minutos e os sobrenadantes contendo anticorpos que não se ligaram aos *beads* foram descartados. Os *beads* foram ressuspensos em tampão PBS pH 7,4 contendo 1 mg/mL BSA e incubados durante 5 minutos a 4 °C sob agitação. Novamente, as amostras foram submetidas a centrifugações a 9.000 g por 5 minutos a 4 °C, e lavados com PBS pH 7,4, por centrifugação e remoção do sobrenadante.

A ligação covalente dos anticorpos aos *beads* ocorreu após adição de igual volume da solução de 13 mg/mL dimetil pimelimidato (DMP) e solução PBS pH 7,4 contendo 1 mg/mL BSA. As amostras foram incubadas por 30 minutos a 4 °C sob agitação, e posteriormente centrifugadas e os sobrenadantes removidos. A seguir, os *beads* foram lavados por centrifugação com solução PBS pH 7,4 contendo 1 mg/mL BSA e os sobrenadantes removidos. Essa etapa de adição da solução de

DMP e lavagens foram repetidas. A seguir, as amostras foram ressuspensas em 50 mM etanolamina, seguida por incubação por 5 minutos a 4 °C sob agitação e lavagem com PBS pH 7,4. Finalmente, o excesso de anticorpos não ligado foi removido por meio da incubação das amostras com 1 M glicina pH 3,0 por 10 minutos sob agitação.

Os anticorpos ligados covalentemente aos *beads* foram armazenados a 4 °C até serem utilizados para ensaios de imunoprecipitação.

### 3.11 Ensaios de imunoprecipitação

Os ensaios de imunoprecipitação foram realizados a partir de lisados totais de células HEK293T obtidos após 24 horas de transfecção com as construções WTPKC $\beta$ I ou  $\Delta$ NPSPKC $\beta$ I. Ainda, foram utilizados lisados totais das linhagens de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231. Em algumas condições, tanto as células HEK293T após 24 horas de transfecção, quanto as linhagens de câncer de mama foram tratadas com 100 nM PMA por 15 minutos.

Para o preparo dos lisados totais, as células foram lisadas em tampão PBS pH 7,4 contendo 1% de Triton X-100, coquetel inibidores de protease e fosfatase como descrito anteriormente. Os lisados foram passados três vezes por uma seringa de 1 mL 26G ½ e congelados (-80°C) e descongelados três vezes. Os lisados foram ainda sonicados por 30 minutos em amplitude de 60 Hz (Branson Sonifier 250) com a sonda em banho de gelo. Esse material foi então centrifugado a 10.000 g por 10 minutos a 4°C. Após isso, os sobrenadantes foram coletados e

diluídos em PBS pH 7,4 para a concentração final de 0,1% Triton X-100. O *pre-clearing* dos lisados foi feito incubando-se as amostras com 30  $\mu$ L de beads de proteína G-agarose ou L-agarose (Life Technologies) já lavados com tampão PBS pH 7,4, por duas horas a 4°C. Após centrifugação a 100 g por 2 minutos a 4 °C, o sobrenadante contendo o lisado de proteínas solúveis foi cuidadosamente removido para ser utilizado nas imunoprecipitações.

Para as imunoprecipitações, 50  $\mu$ L de *beads* de proteína G-agarose ou proteína L-agarose foram lavados e incubações com anticorpos (5  $\mu$ L do anticorpo anti-C2Cat, 1  $\mu$ g do anticorpo específico para PKC $\beta$ I ou 1 mL de sobrenadante puro do hibridoma 4.8E) foram realizadas por duas horas a 4 °C sob agitação constante. Após isso, os *beads* foram lavados 3 vezes com PBS pH 7,4 para a remoção dos anticorpos que não se ligaram. Em seguida, os *beads* foram bloqueadas com PBS pH 7,4 contendo 1 mg/mL de BSA por 30 minutos a 4 °C.

Para a próxima etapa, os *beads* de proteína G-agarose contendo anticorpos anti-C2Cat ou anti-PKC $\beta$ I ligados e os *beads* de proteína L-agarose contendo o anticorpo 4.8E foram incubados com os lisados celulares por 16 horas a 4 °C sob agitação constante. Após a incubação das amostras, os *beads* foram lavados por centrifugação três vezes com PBS pH 7,4 contendo os coquetéis inibidores de proteases e de fosfatases.

Para a eluição das proteínas que se ligaram aos anticorpos, os *beads* foram ressuspensos em tampão Laemmli, aquecidos a 100°C por dez minutos e analisados por Western blot usando anticorpos específicos para cada PKC.

Alternativamente, as proteínas foram eluídas dos *beads* com solução de glicina 0,1 M pH 3,0 para que estas pudessem ser identificadas por espectrometria de massa.

### 3.12 Espectrometria de massa

A identificação de proteínas que se ligam às PKCs clássicas ativas na linhagem de câncer de mama MDA-MB-231 foi realizada por ensaios de co-imunoprecipitação usando os anticorpos anti-C2Cat e 4.8E seguida por espectrometria de massa.

Após a realização dos ensaios de imunoprecipitação conforme descrito no item anterior e eluição das proteínas em glicina 0,1M pH 3,0, essa solução foi trocada pelo tampão bicarbonato de amônio na concentração de 25 mM. Para isso, a solução de proteínas contendo glicina foi submetida a centrifugações em tubos que contêm filtros de exclusão de massa molecular (3 kDa, Centricon – Millipore), sendo que foi adicionado pelo menos dois volumes de tampão bicarbonato de amônio à esses tubos para permitir a completa remoção do tampão glicina.

A seguir as proteínas foram tratadas e digeridas de acordo com Medzihradszky (2005) com algumas modificações. Brevemente, as proteínas foram reduzidas em 10 mM de DTT a 37°C durante 30 minutos, sendo posteriormente alquiladas com 15 mM de iodoacetamida no escuro a temperatura ambiente por 20 minutos. As amostras contendo proteínas de interesse foram

digeridas com uma solução contendo 100 µg de tripsina (Trypsin Gold Mass Spectrometry Grade, Promega) em 25 mM de bicarbonato de amônio, sendo a enzima diluída 50 vezes no volume da amostra. Por fim, as amostras foram incubadas a 37°C por 16 horas.

Posteriormente, a solução contendo os peptídeos foi submetida à secagem em um concentrador à temperatura ambiente (SPD 1010 SpeedVac, Thermo Scientific) por 2-3 horas para que o tampão bicarbonato de amônio fosse completamente evaporado. Em seguida, os peptídeos foram ressuspensos em 0,1% de ácido trifluoacético e purificados através de resina de C18 (ZipTip - MilliPore), conforme especificações do fabricante. O eluato de peptídeos purificados foi transferido para um novo tubo para análise por espectrometria de massa.

Os peptídeos foram adquiridos em espectrômetro de massa UHR-ESI-Q-TOF Bruker Daltonics MaXis 3G (Billerica, MA, EUA) acoplado a um sistema de UPLC com fonte de ionização Captive Spray com ionização em modo positivo da Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

A separação dos peptídeos foi realizada usando-se uma coluna de fase reversa C18. Os peptídeos foram eluídos pela adição de um gradiente linear de 95% do solvente A (0,1 % de ácido fórmico em água) e 5% do solvente B (0,1 % ácido fórmico em acetonitrila) para 40% do solvente B durante 120 minutos.

Os espectros de massas das amostras dos diferentes tratamentos foram processados através do programa Bruker Data Analysis e analisados no programa MASCOT MS/MS Ions Search (<http://www.matrixscience.com>).



Os parâmetros utilizados para a identificação de proteínas no MASCOT foram:

- *Database: SwissProt,*
- *Taxonomy: Homo sapiens,*
- *Enzyme: Trypsin,*
- *Fixed modification: Carbamidomethyl (C),*
- *Variable modifications: Oxidation (M), Phosphorylation (S or T),*
- *Peptide tol.: +/- 10ppm,*
- *MS/MS tol.: +/- 0.5 Da,*
- *Peptide charge: 2+, 3+, 4+ (no caso de ESI-Q-TOF).*

### 3.13 Imunofluorescência

As linhagens celulares HEK293T, HeLa, MCF-7, MDA-MB-231, Neuro 2A e SK-N-SH foram cultivadas em lamínulas redondas de 13 mm até que atingissem 60 - 80 % de confluência. Em algumas condições, cerca de 24 horas após o plaqueamento, as células foram tratadas com PMA 50 nM ou 100 nM por 15 minutos ou com 1  $\mu$ M de morfina, ATP ou glutamato por 1, 3 e 30 minutos.

Antes de fixadas, as células tiveram o meio de cultura completamente removido e em seguida, a fixação foi realizada usando solução de paraformaldeído 4% (PFA 4%) por 15 minutos a temperatura ambiente. Após isso, as lamínulas foram lavadas duas vezes com PBS pH 7,4 e as células tratadas com uma solução contendo 0,1% de Triton-X100 em PBS pH 7,4, para

promover a permeabilização das celular. A próxima etapa consistiu no bloqueio dos sítios inespecíficos, para tanto as lamínulas foram incubadas por 40 minutos, em atmosfera úmida a temperatura ambiente, com uma solução contendo 1% de soro fetal bovino, 0,1 % de Triton-X 100 em PBS pH 7,4. A solução de bloqueio foi removida e as células incubadas com os anticorpos primários diluídos na solução de bloqueio por 16 horas a 4°C.

Os anticorpos primários usados para o ensaio foram anti-PKC $\alpha$  (sc-208), anti-PKC $\beta$ I (sc-8049 and sc-209), anti-PKC $\beta$ II (sc-210) e PKC $\gamma$  (SC-211) (Santa Cruz Biotechnology), os quais foram diluídos 2  $\mu$ g/mL. Os anticorpos anti-C2Cat na diluição 1:100 e o anticorpo anti-puromicina (EMD Millipore) na diluição 1:1000.

Os anticorpos primários foram aspirados e as células lavadas três vezes com uma solução contendo PBS e 0,1 % Triton-X100. Os anticorpos secundários fluorescentes anti-IgG de coelho conjugado a Alexa 555 (Invitrogen), anti-IgG de camundongo conjugado a Alexa 555 e anti-IgG de camundongo conjugado a Alexa 488 foram utilizados na concentração final 1  $\mu$ g/mL. Já os anticorpos secundários anti-IgG de coelho conjugado a Alexa 568 (Invitrogen) foram utilizados na diluição 0,3  $\mu$ g/mL. As incubações com os anticorpos secundários foram realizadas por 1 hora à temperatura ambiente e protegido de luz. Novamente, as células foram lavadas conforme descrito acima.

Para a montagem das lamínulas contendo células sobre as lâminas foi utilizada a solução de ProLong<sup>®</sup> (Cell Signaling Technology) para retardar a perda de fluorescência, sendo as lamínulas seladas com esmalte incolor. A

imunoreatividade foi detectada por microscopia de epi-fluorescência Nikon Eclipse E600 ou Leica DM6000.

Durante a aquisição das imagens, o tempo de exposição foi cuidadosamente controlado, a fim de evitar diferença de intensidade de marcação entre as amostras, que não seja devido a diferenças na afinidade dos anticorpos ou expressão das proteínas.

### **3.14 Imunohistoquímica de microarranjo de tecido mamário**

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital do Câncer A.C. Camargo de São Paulo, sob o número de protocolo 08284/2015. Todos os pacientes assinaram um termo de consentimento livre e foram informados antes da data de cirurgia, permitindo a utilização dos seus tecidos tumorais para fins de pesquisa.

Os ensaios de imunohistoquímica de microarranjo de tecido mamário foram realizados em colaboração com o Dr. Victor Piana de Andrade do Departamento de Patologia do Hospital de Câncer A.C. Camargo de São Paulo.

Todos os arquivos de amostras de câncer de mama humano do Departamento de Patologia do Hospital de Câncer AC Camargo de São Paulo foram revistos e áreas representativas de cada tumor foram selecionados para a construção de dois blocos de microarranjo de tecido, sendo um deles com amostras de pacientes ER<sup>+</sup> e o outro contendo amostras ER<sup>-</sup>/PR<sup>-</sup>/HER2<sup>-</sup> (triplo-negativas). Pequenas amostras de tecidos dos blocos dadores foram retirados

com agulhas de 1 mm usando o equipamento *Manual Tissue Arrayer MTA-1* (Becher Instruments, Sun Prairie, WI) e inseridas em blocos receptores precisamente arranjadas em intervalos de 0,2 mm. Um total de 105 amostras de pacientes ER<sup>+</sup> e 29 tumores triplo-negativos foram avaliados após a coloração Imunohistoquímica e digitalização.

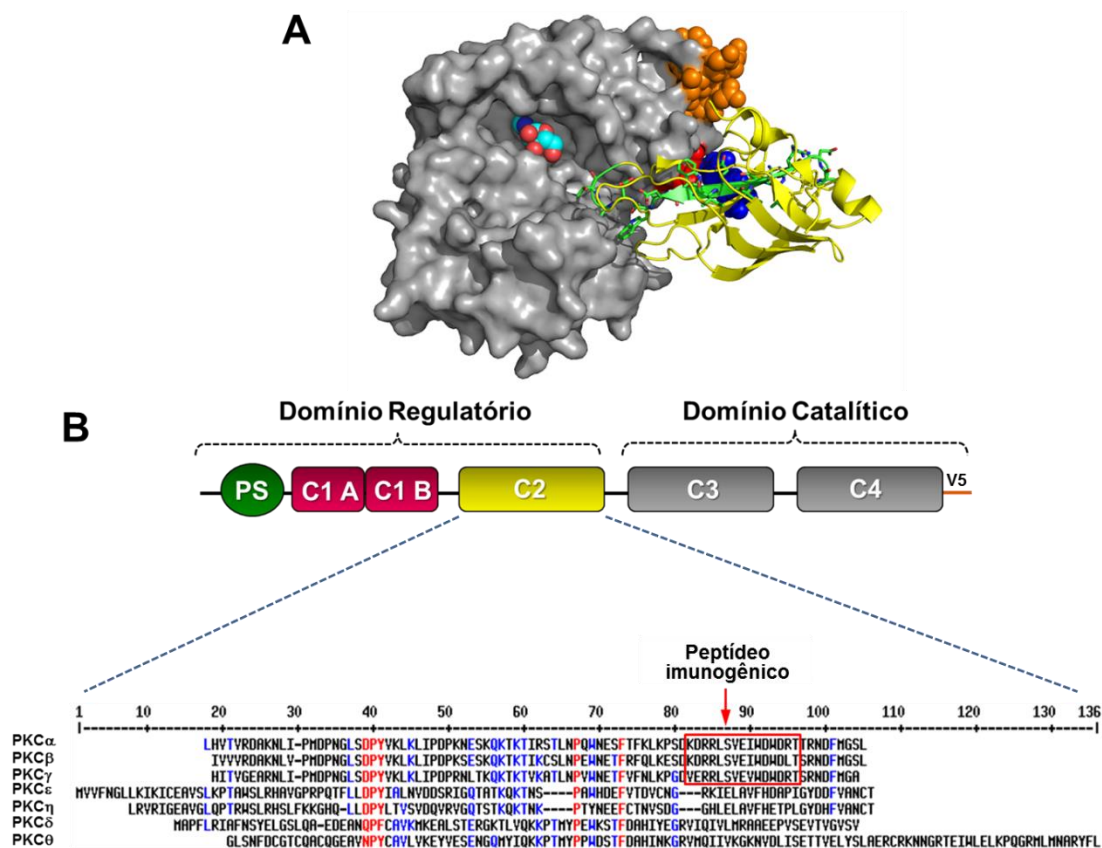
As lâminas contendo as amostras de tecido com 1 mm de diâmetro foram cortadas com espessura de 4 µm e coradas em Benchmark ULTRA (Roche-Ventana) após a diluição dos anticorpos primários.

Desparafinização foi realizada por EZ PREP e a recuperação de antígenos realizada por calor em solução Ultra Cell Conditionig em pH elevado a 96°C durante 36 minutos. A peroxidase endógena foi bloqueada durante cinco minutos utilizando o agente de bloqueio de peroxidase (UltraView Universal DAB inibidor diluído em 3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), seguido por lavagem em PBS pH 7,4. As lâminas foram então incubadas por 32 minutos com anticorpos anti-C2Cat na diluição 1:300. A reação foi revelada com polímero HRP (HRP Multimer), sendo então lavadas com PBS pH 7,4 e incubadas com o substrato diaminobenzidina (DAB). As lâminas foram lavadas novamente com PBS pH 7,4 e contra-coradas com Hematoxilina (Hematoxilina II (Roche-Ventana)). Por fim, as lâminas foram montadas e a quantificação da imunohistoquímica foi realizada utilizando o escaner digital Aperio ScanScope XT (Leica Biosystems) e algoritmo v9.0 PixelCount, sendo todo o procedimento realizado segundo recomendações do fabricante (Laurinaviciene et al., 2014).

## **4 RESULTADOS**

### **4.1 Estratégia racional para produção de anticorpos anti-C2Cat**

O desenvolvimento racional de anticorpos policlonais anti-C2Cat que reconhecem preferencialmente a conformação ativa das cPKCs fundamentou-se na criação de um modelo da PKC $\beta$  inativa, baseado na estrutura cristalográfica da PKC $\beta$ II (Leonard et al., 2011) e no modelo feito à partir da reinterpretação dessa estrutura (Antal et al., 2015). Essas análises possibilitaram a escolha de um peptídeo denominado C2Cat (KDRRLSVEIWDWDLT) que corresponde aos aminoácidos 236 a 250 das PKC $\beta$  (Figura 5A, em verde), localizado na região de interação entre os domínios C2 (Figura 5A, amarelo) e catalítico das PKCs (Figura 5A, cinza). Após a ativação das cPKCs essa interação é rompida (Banci, Cavallaro, Kheifets, & Mochly-Rosen, 2002; Ron & Mochly-Rosen, 1995; Stebbins & Mochly-Rosen, 2001) de forma que este peptídeo fica exposto, assim anticorpos anti-C2Cat deveriam reconhecer apenas a cPKCs ativas.



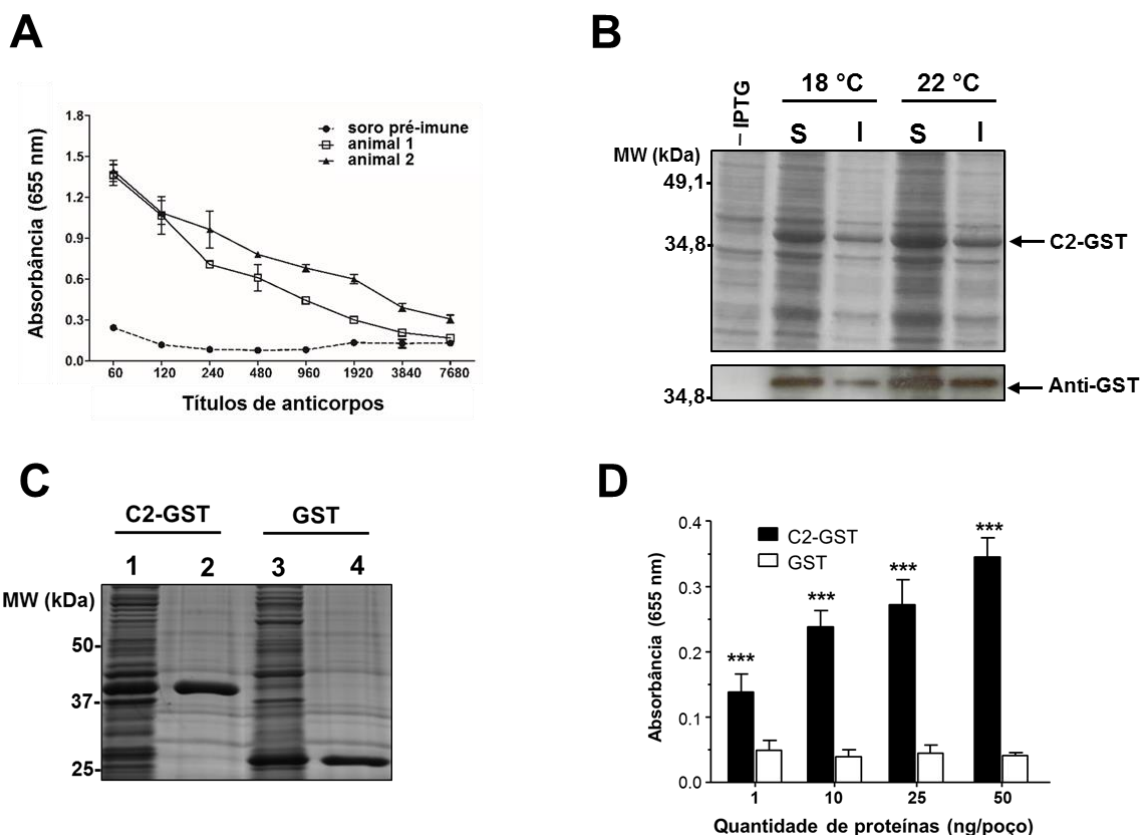
**Figura 5. Estratégia racional para o desenvolvimento do anticorpo policlonal anti-C2Cat (A)** Modelo molecular mostrando o peptídeo C2Cat (em verde) localizado na região de interação entre os domínios catalítico (cinza) e C2 (amarelo). O peptídeo C2Cat está próximo da região de contato entre K205 e E655, dos domínios C2 e catalítico, respectivamente (em azul e vermelho). O modelo também mostra a região V5 (laranja), descrita por interagir com o domínio C2. **(B)** Representação esquemática da estrutura primária dos domínios das PKCs clássicas (adaptado de Wu-Zhang & Newton, 2013). O peptídeo C2Cat (retângulo vermelho) foi utilizado nas imunizações de coelhos para a produção de anticorpos anti-C2Cat. Para o alinhamento das sequências de aminoácidos das c e nPKCs foi utilizado o programa MultAlin.

O peptídeo C2Cat é relativamente conservado entre as cPKCs (Figura 5B) e contém a sequência da  $\psi$ RACK (SVEIWD), uma região previamente descrita por interagir com o sítio de ligação à RACK na quinase inativa (Ron et al., 1995; Ron & Mochly-Rosen, 1995) (Figura 5A, verde). Além disso, o peptídeo C2Cat está

localizado próximo de outra região de contato que inclui os resíduos de aminoácidos K205 e E655, presentes nos domínios C2 e catalítico, respectivamente (Figura 5A, azul e vermelho). É ainda possível visualizar no modelo apresentado, a região V5 (Figura 5A, laranja), interagindo com o domínio C2, como descrito anteriormente (Stebbins & Mochly-Rosen, 2001) (Figura 5A). Essas interações intramoleculares, assim como a interação entre o domínio catalítico e o pseudo-substrato (não mostrado aqui), auxiliam na manutenção da conformação inativa das PKCs (Banci et al., 2002; Ron & Mochly-Rosen, 1995; Stebbins & Mochly-Rosen, 2001).

### **4.2 Anti-C2Cat reconhece o domínio C2 da PKC $\beta$ I**

Para a produção de anticorpos policlonais específicos para formas ativas das cPKCs, dois coelhos foram imunizados com o peptídeo C2Cat, previamente acoplado ao KLH. Os soros provenientes desses animais foram capazes de reconhecer o peptídeo C2Cat conjugado à BSA até a diluição 1:3840 (Figura 6A).



**Figura 6. Anti-C2Cat reconhece o domínio C2 da PKC $\beta$ .** (A) Ensaio de ELISA mostrando a reatividade ao peptídeo C2Cat acoplado ao BSA de soros obtidos de dois coelhos imunizados com o peptídeo C2Cat acoplado ao KLH. (B) Análise da expressão e solubilidade do domínio C2 em fusão com GST (C2-GST) em gel SDS-PAGE. A expressão do domínio C2 em fusão com GST foi realizada em *E. coli* BL21 (DE3), a 18 °C e 22 °C após 16 horas de crescimento usando 400  $\mu$ M de IPTG. MW, marcador de peso molecular; - IPTG, controle sem IPTG; S, fração solúvel e I, fração insolúvel. No painel inferior é mostrado o Western blot usando o anticorpo anti-GST (1:1000). (C) Análise do domínio C2-GST e GST isolado por SDS-PAGE após purificação de frações solúveis por cromatografia de afinidade usando a resina glutationa sefarose. MW, marcador de peso molecular; 1 e 3, *E. coli* induzida expressando C2-GST e GST, respectivamente; 2 e 4, frações de C2-GST e GST purificadas, respectivamente. (D) Ensaio de ELISA mostrando que o anticorpo C2Cat reconhece o domínio C2-GST. Os valores representam a média e desvio padrão de três experimentos independentes. Diferenças estatisticamente significativas foram determinada por ANOVA, usando o pós teste Bonferroni, onde \*\*\* p < 0,001.



Para os experimentos subsequentes, foi utilizado o soro do animal 2, pois esse apresentou um título de anticorpos maior que o animal 1.

Tendo em vista que o peptídeo C2Cat encontra-se dentro do domínio C2 das cPKCs, a capacidade do anticorpo anti-C2Cat de reconhecer esse domínio foi avaliada. Para realização dos ensaios de ELISA foi necessário a clonagem e expressão do domínio C2 em fusão com GST de forma solúvel.

Inicialmente, temperaturas de crescimento de dois clones foram testadas (18 °C, 22 °C, 28 °C e 37 °C), assim como densidade ótica de indução (0,4 e 0,8) e concentrações de IPTG (200, 400 e 800  $\mu$ M). As bactérias crescidas nessas diferentes condições foram lisadas e o material centrifugado para obtenção do sobrenadante (fração solúvel) e sedimento (fração insolúvel). Foi possível verificar, por ensaios de SDS-PAGE e Western blot (Figura 6B), que a proteína se encontrava parcialmente solúvel a 18 °C e 22 °C, sendo observada uma tendência à maior solubilidade relativa a 18 °C. O domínio C2 recombinante em fusão com GST apresentou peso molecular de 41 kDa, conforme predito (ProtParam).

As proteínas C2-GST e a GST foram purificados por cromatografia de afinidade usando a resina glutationa Sefarose 4B (GE Healthcare) (Figura 6C), sendo em seguida utilizadas nos ensaios de ELISA. Como esperado, verificou-se que o anticorpo anti-C2Cat (1:50) reconheceu diferentes concentrações do domínio C2 em fusão com GST, mas não o GST (Figura 6D).

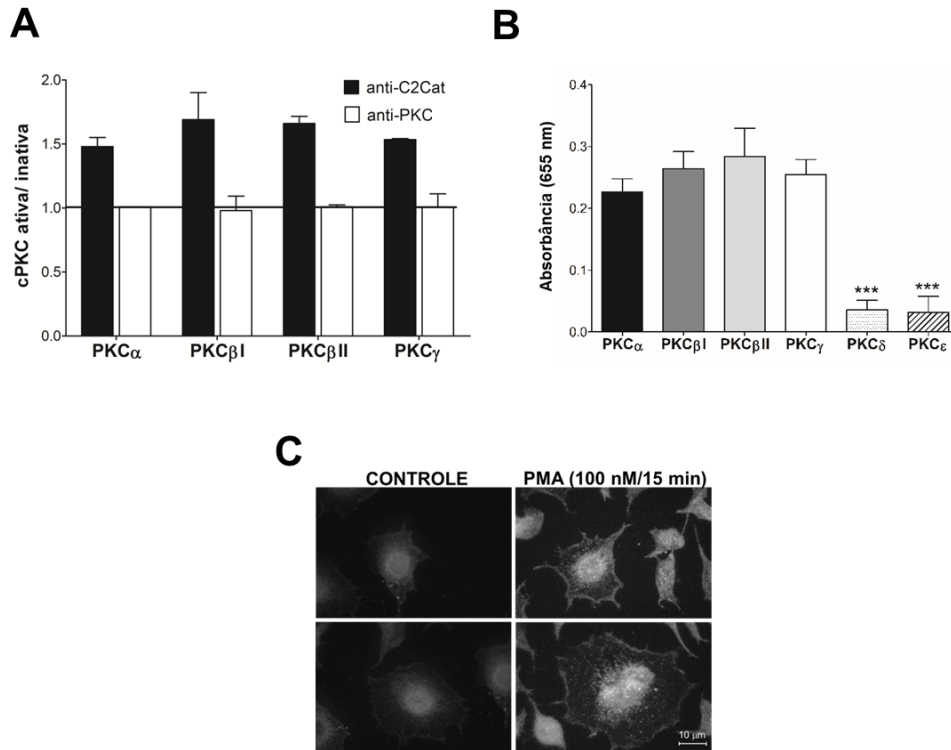
### **4.3 Anti-C2Cat reconhece preferencialmente as cPKCs ativas**

A capacidade do anticorpo anti-C2Cat de reconhecer preferencialmente as formas ativas das cPKCs, conforme predito, foi avaliada. Foi possível verificar por ensaios de ELISA, que o anti-C2Cat reconheceu formas ativas das cPKCs (na presença de lipídeos e cálcio) aproximadamente 1,5 vezes mais do que as quinases inativas (na ausência de lipídeos e cálcio). Além disso, os anticorpos comerciais não foram capazes de diferenciar entre formas ativas e inativas das cPKCs, apresentando reatividade análoga por ambas as formas (Figura 7A).

Como mencionado anteriormente, o peptídeo C2Cat é conservado entre as cPKCs, sendo idêntico entre as PKC $\beta$  e possuindo variações de um e quatro aminoácidos nas sequências das PKC $\alpha$  e  $\gamma$ , respectivamente (Figura 5B). Em virtude disso, a especificidade do anticorpo anti-C2Cat foi avaliada. Novamente, ensaios de ELISA usando cada uma das cPKCs recombinantes purificadas (PKC $\alpha$ , PKC $\beta$ I, PKC $\beta$ II e PKC $\gamma$ ) e duas representantes das nPKCs (PKC $\delta$  e PKC $\epsilon$ ) foram conduzidos. Como esperado, anti-C2Cat reconheceu preferencialmente todas as cPKCs ativas com afinidades semelhantes e não apresentou reatividade por nPKCs, demonstrando portanto ser um anticorpo específico para cPKCs (Figura 7B).

O passo seguinte consistiu na realização de ensaios de imunofluorescência com o anticorpo anti-C2Cat e células HeLa previamente estimuladas com PMA. Esses ensaios mostraram que anti-C2Cat apresentou maior reatividade por células tratadas com PMA. Além disso, anti-C2Cat marcou regiões celulares onde

tipicamente encontram-se as PKCs ativas, como membrana plasmática e região perinuclear (Kraft & Anderson, 1983; J. Violin & Newton, 2003) (Figura 7C).

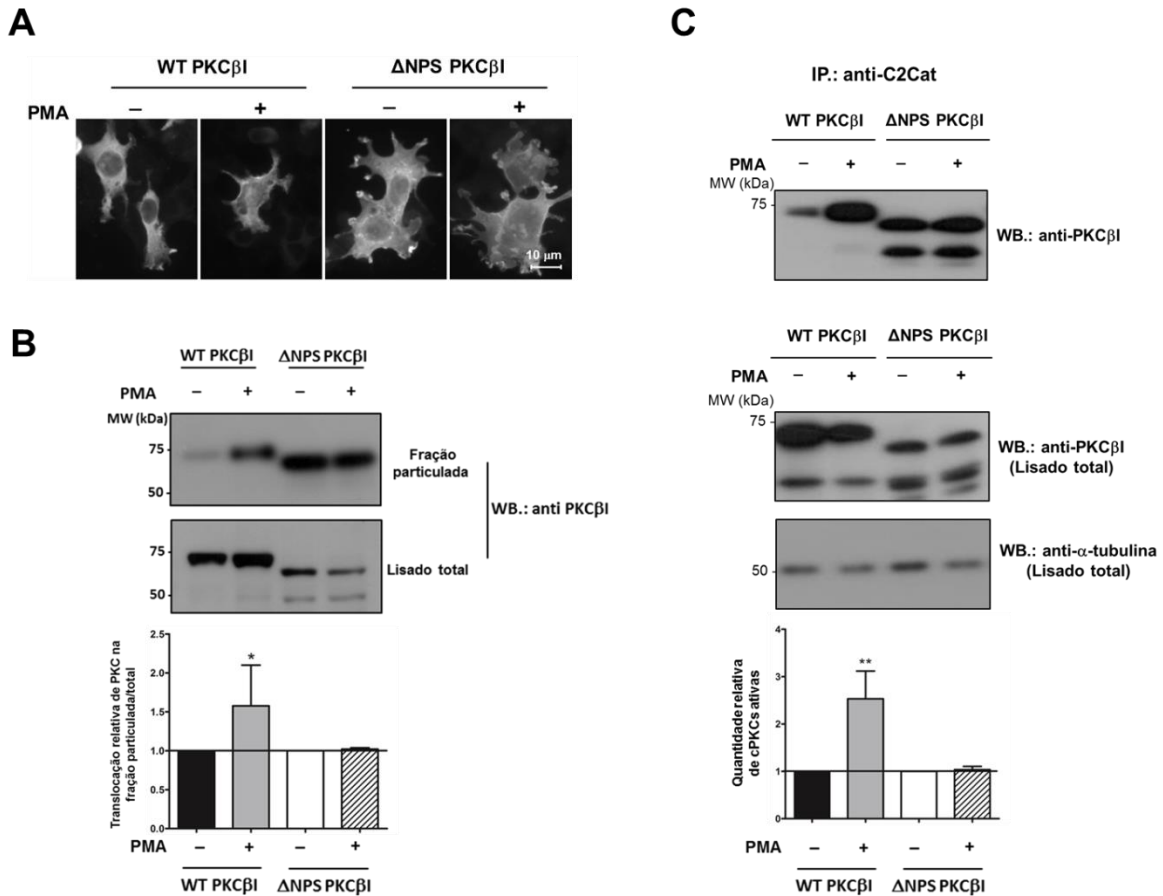


**Figura 7. Anti-C2Cat reconhece preferencialmente formas ativas das PKCs clássicas. (A)** Ensaio de ELISA mostrando a razão de reconhecimento de formas ativas e inativas das cPKCs por anti-C2Cat comparados a anticorpos comerciais específicos para cada cPKC ( $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II e  $\gamma$ ). As formas ativas das diferentes cPKCs (100 ng) foram obtidas após a incubação com lipídeos e cálcio, enquanto as formas inativas foram incubadas apenas com PBS pH 7,4. **(B)** Anti-C2Cat reconhece cPKCs, mas não PKCs nóveis ( $\delta$  e  $\epsilon$ ). **(C)** Imunofluorescência com o anticorpo anti-C2Cat, mostrando células HeLa não tratadas (controle) e tratadas com 100 nM PMA por 15 minutos. Nesse ensaio, células HeLa foram fixadas com PFA 4% e incubadas com anti-C2Cat (1:100) e posteriormente com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado ao Alexa 555 (1,0  $\mu$ g/mL). Os valores representam a média e desvio padrão de três experimentos independentes. Diferenças estatisticamente significativas foram determinada por ANOVA, usando o pós teste Bonferroni, onde \*\*\*  $p < 0,001$ .

#### 4.4 Anti-C2Cat é capaz de imunoprecipitar mais eficientemente cPKCs após ativação com PMA

A seguir, a capacidade do anticorpo anti-C2Cat de reconhecer a PKC ativa foi avaliada por ensaios de imunoprecipitação, visando confirmar os resultados obtidos nos ensaios de ELISA. Para tanto, células HEK293T foram transfectadas com as construções WTPKC $\beta$ I ou  $\Delta$ NPSPKC $\beta$ I. Esta última, não codifica os 30 primeiros aminoácidos onde está localizada a região do pseudo-substrato (responsável pela interação intramolecular com o sítio catalítico na quinase inativa), e por isso, codifica uma forma constitutivamente ativa da PKC $\beta$ I. Após as transfecções, as células foram analisadas por imunofluorescência e Western blot, usando o anticorpo comercial específico para a PKC $\beta$ I e subsequentemente submetidas a ensaios de imunoprecipitação com o anticorpo anti-C2Cat.

Com os ensaios de imunofluorescência foi possível observar que as células transfectadas com a construção WTPKC $\beta$ I (inclui formas inativas e ativas da PKC $\beta$ I) e tratadas com PMA apresentaram maior conteúdo de PKC $\beta$ I ativa (associadas às membranas) quando comparado às células controle. Por outro lado, células transfectadas com a construção  $\Delta$ NPSPKC $\beta$ I, que possui domínios de ligação a lipídeos e o sítio catalítico expostos, apresentaram PKCs ligadas às membranas, mesmo na ausência de PMA (Figura 8A).



**Figura 8. Anti-C2Cat imunoprecipita mais PKCβ1 após o tratamento com éster de forbol. (A)** Imunofluorescência mostrando células HEK293T transfetadas com as construções WTPKCβ1 ou ΔNPSKCβ1. Em algumas condições, as células foram tratadas com PMA. Nesse ensaio, células foram fixadas com PFA 4% e incubadas com o anticorpo comercial anti-PKCβ1 (400 μg/mL) e posteriormente com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado ao Alexa 555 (1,0 μg/mL). **(B)** A quantidade relativa de PKCβ1 ativa (ligada às membranas) foi avaliada em células HEK293T transfetadas e tratadas com PMA. Para isso, foi realizado o fracionamento subcelular, seguida por Western blot usando o anticorpo anti-PKCβ1. **(C)** Células HEK293T transfetadas foram submetidas à imunoprecipitação com o anticorpo anti-C2Cat, seguida por análise por Western blot usando o anticorpo anti-PKCβ1 (painel superior). Os níveis de transfecção e a quantidade total de proteínas foram avaliados por Western blot usando os anticorpos anti-PKCβ1 e anti-α-tubulina, respectivamente (painel inferior). Análises de densitometria foram realizadas usando o programa ImageJ, sendo que as análises estatísticas foram feitas comparando-se células expressando WTPKCβ1 (ou ΔNPSKCβ1) com as tratadas com PMA. Os valores representam a média e desvio padrão de três experimentos independentes. Diferenças estatisticamente significativas foram determinadas por ANOVA, usando o pós-teste Bonferroni, onde \* p < 0,05 e \*\* p < 0,01.

Para confirmar a associação das PKCs ativas com membranas celulares, ensaios de fracionamento subcelular, objetivando separar frações solúveis e particuladas (contendo membranas) das células HEK293T transfectadas foram conduzidos. Foi possível verificar que a ativação das PKCs promovida pelo tratamento com PMA induziu a translocação/ ativação da PKC $\beta$ I selvagem, WTPKC $\beta$ I, para a fração particulada quando comparada ao controle não tratado com PMA. Contrariamente, células transfectadas com a construção  $\Delta$ NPSPKC $\beta$ I apresentaram grande conteúdo de PKC $\beta$ I ativa na fração particulada, independente do tratamento com PMA (Figura 8B).

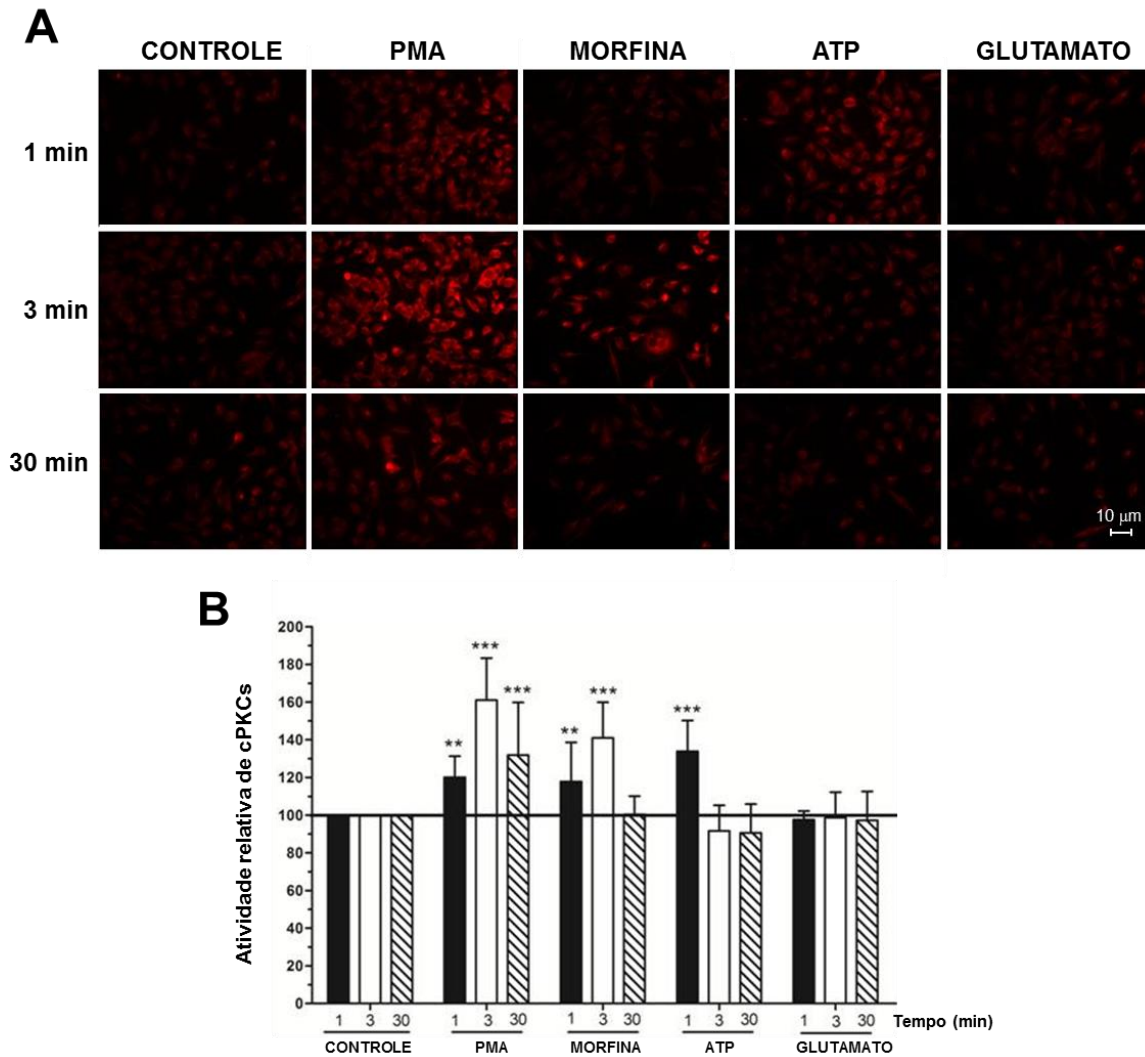
Os ensaios de imunoprecipitação com o anticorpo anti-C2Cat mostraram que uma maior proporção de WTPKC $\beta$ I foi imunoprecipitada quando as células foram previamente estimuladas com PMA. Entretanto, anti-C2Cat imunoprecipitou quantidades similares de  $\Delta$ NPSPKC $\beta$ I, independente do estímulo com PMA (Figura 8C).

#### **4.5 Anti-C2Cat é capaz de detectar cPKCs ativas após estimulação de receptores em linhagens de neuroblastomas**

A localização subcelular das cPKCs ativas em linhagens de neuroblastoma humano (SK-N-SH) e murino (Neuro 2A) foi investigada após a estimulação de receptores. Para isso, as linhagens celulares foram tratadas com compostos que causam a ativação das PKCs (morfina, ATP e glutamato). A ativação das cPKCs foi verificada por ensaios de imunofluorescência utilizando-se o anti-C2Cat.

Células estimuladas ou não com PMA foram utilizadas como controle positivo e negativo do ensaio, respectivamente.

Em células da linhagem Neuro 2A, o tratamento com PMA induziu a ativação das cPKCs logo no primeiro minuto de estímulo, atingindo um pico de ativação após 3 minutos. Além disso, a ativação das cPKCs promovida por PMA foi sustentada, sendo possível detectar cPKCs ativas após 30 minutos de tratamento. Contrariamente, o tratamento dessas células com ATP e morfina induziram uma ativação transiente das cPKCs, atingindo picos de ativação em 1 e 3 minutos, respectivamente. Nas condições experimentais usadas, não foi possível detectar a ativação das cPKCs após o estímulo de células com glutamato (Figura 9A e B).

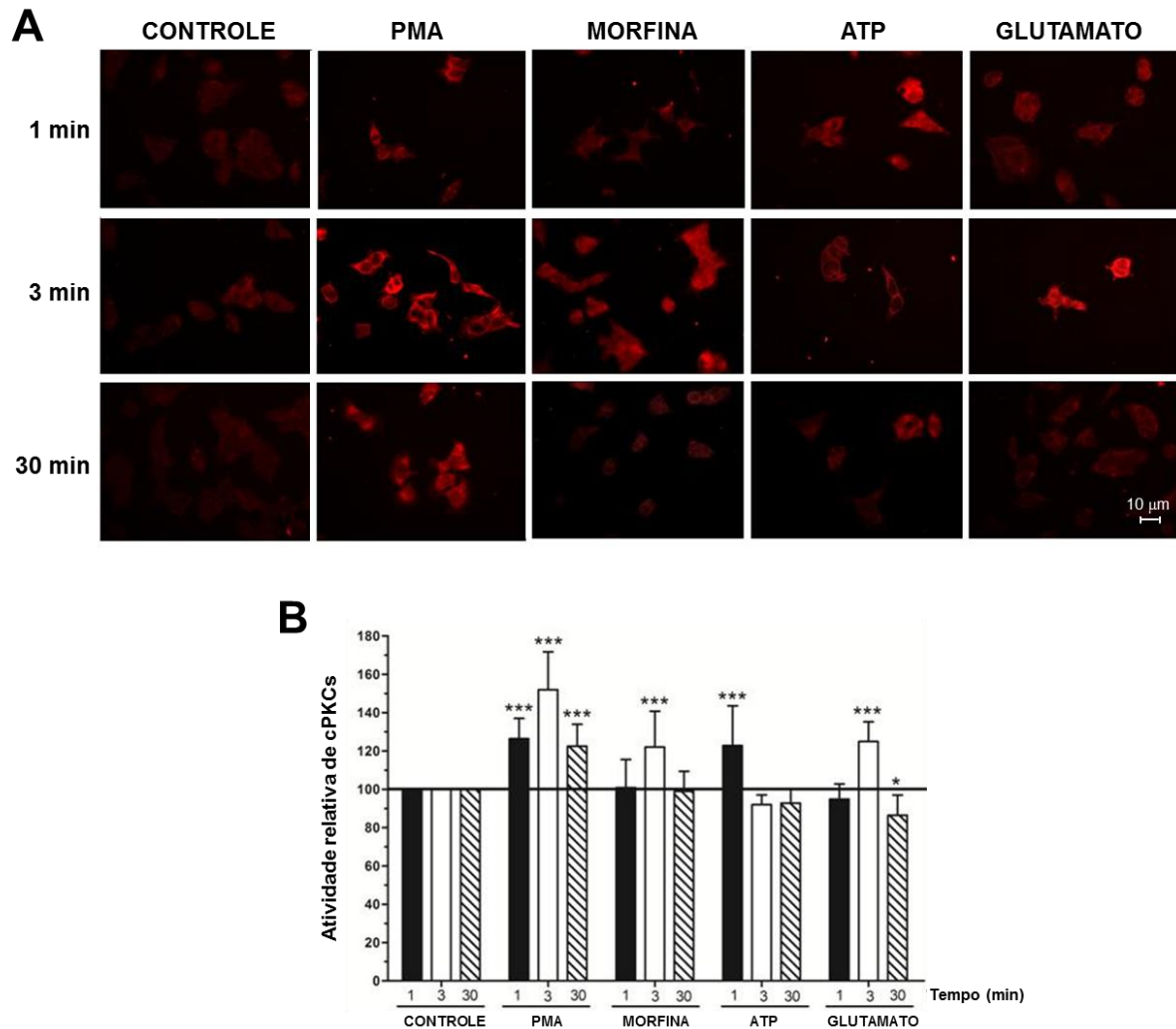


**Figura 9. O anti-C2Cat é capaz de detectar a ativação transiente das cPKCs após o estímulo de receptores na linhagem Neuro 2A. (A)** Células Neuro 2A foram tratadas com PMA (50 nM), morfina, ATP and glutamato (1  $\mu$ M) por 1, 3 e 30 minutos, e usadas em ensaios de imunofluorescência. A ativação das cPKCs foi avaliada usando o anticorpo anti-C2Cat e anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado ao Alexa 568. **(B)** Os níveis de fluorescência foram quantificados pelo programa ImageJ<sup>®</sup> e a quantidade de cPKC ativa em cada tratamento foi normalizada pelo controle (fluorescência detectada em células não estimuladas), ao qual foi atribuído o valor de 100 %. Os resultados representam a média e desvio padrão de 12 a 15 imagens. Diferenças estatisticamente significativa foram determinadas por AVOVA, usando o pós-teste Dunnett, onde \*\*\*  $p < 0,001$  e \*\*  $p < 0,01$ .



Como observado em células Neuro 2A, o estímulo de células SK-N-SH com PMA induziu uma intensa e prolongada ativação de PKCs, atingindo um pico após 3 minutos de tratamento, mas se mantendo por 30 minutos. Já o tratamento com ATP e morfina produziu um aumento transiente na intensidade de fluorescência observado após 1 e 3 minutos de tratamento, respectivamente. Ao contrário do que foi observado nestas células, o estímulo de células SK-N-SH com glutamato resultou na ativação de cPKCs com um pico de ativação após três minutos de tratamento (Figura 10A e B).

Os resultados obtidos apontam que o anticorpo anti-C2Cat pode ser aplicado na detecção de cPKCs ativas, podendo ser utilizado em estudos de monitoramento da dinâmica espacial e temporal da ativação de cPKCs independente do tipo de estímulo empregado.



**Figura 10. O anti-C2Cat é capaz de detectar a ativação transiente de cPKCs após o estímulo de receptores na linhagem SK-N-SH . (A)** Células SK-N-SH foram tratadas com PMA (50 nM), morfina, ATP ou glutamato (1μM) por 1, 3 e 30 minutos, e usadas em ensaios de imunofluorescência. A ativação das cPKCs foi avaliada usando o anticorpo anti-C2Cat e anticorpo secundário anti-IgG coelho conjugado ao Alexa 568. **(B)** Os níveis de fluorescência foram quantificados pelo programa ImageJ® e a quantidade de cPKC ativa em cada tratamento foi normalizada pelo controle (fluorescência detectada em células não estimuladas), o qual foi atribuído o valor de 100 %. Os resultados representam a média de 12 a 15 imagens. Diferenças estatisticamente significativa foram determinadas por ANOVA, usando o pós-teste de Dunnett, onde \*\*\*  $p < 0,001$  e \*  $p < 0,05$ .

#### **4.6 Aplicação dos anticorpos anti-C2Cat no câncer de mama**

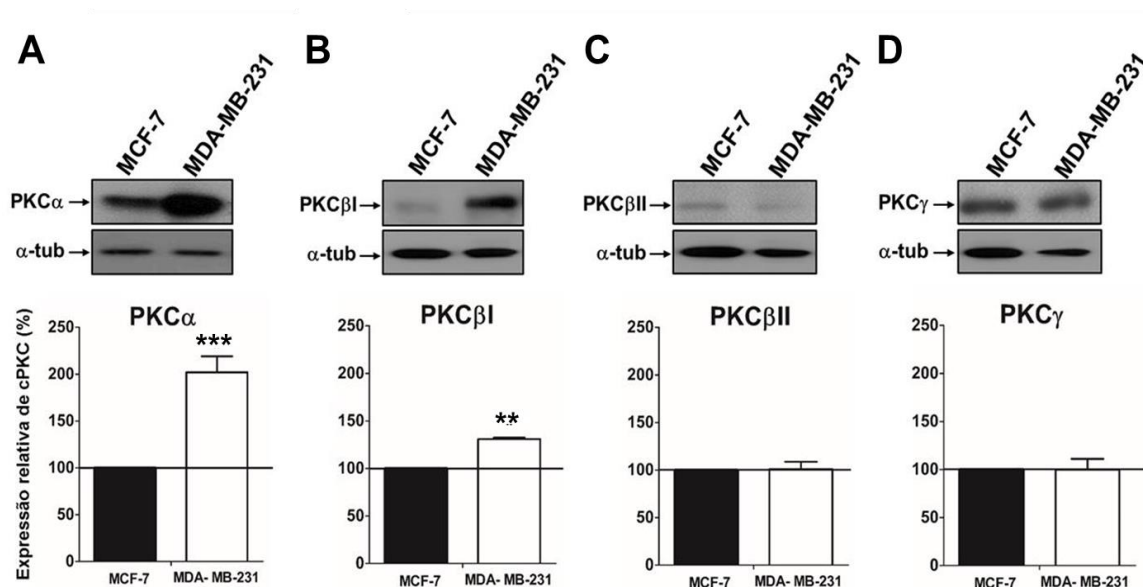
Alguns estudos sugerem que a linhagem de câncer de mama MCF-7, que expressa o receptor de estrógeno (ER<sup>+</sup>) e é derivado de um tumor do subtipo luminal A, possui um menor conteúdo de PKCs ativas do que a linhagem MDA-MB-231, que possui uma mutação ativadora no gene Ras e é classificada como triplo negativa, por não expressar receptores de estrogênio, progesterona e HER2 (Clark & Der, 1995; Keshamouni, Mattingly, & Reddy, 2002). Portanto, essas linhagens celulares constituem modelos adequados para a validação do anticorpo anti-C2Cat que tem mais afinidade por cPKCs ativas.

##### **4.6.1 Avaliação dos níveis de expressão e localização subcelular das cPKCs**

Inicialmente, a expressão e localização subcelular das diferentes cPKCs nas células MCF-7 e MDA-MB-231 foram investigadas por ensaios de Western blot e imunofluorescência. Em ambos os ensaios, foram utilizados anticorpos comerciais específicos para cada cPKC, os quais têm como alvo a região V5 presente na extremidade C-terminal dessas quinases.

Nos ensaios de Western Blot, foi possível verificar que ambas as linhagens expressam a PKC $\alpha$ , PKC $\beta$ I e PKC $\gamma$ , enquanto que a expressão da PKC $\beta$ II foi pouco significativa (Figura 11). Essas linhagens apresentaram níveis similares de expressão das PKC $\beta$ II e PKC $\gamma$ . Interessantemente, observamos uma grande diferença de expressão da PKC $\alpha$  entre as duas linhagens de câncer de mama,

sendo que essa isoenzima apresentou-se pelo menos duas vezes mais expressa em células MDA-MB-231 quando comparado às células MCF-7. Também, se observou um pequeno aumento na expressão da PKC $\beta$ I na linhagem MDA-MB-231 quando comparada à MCF-7 (Figura 11).

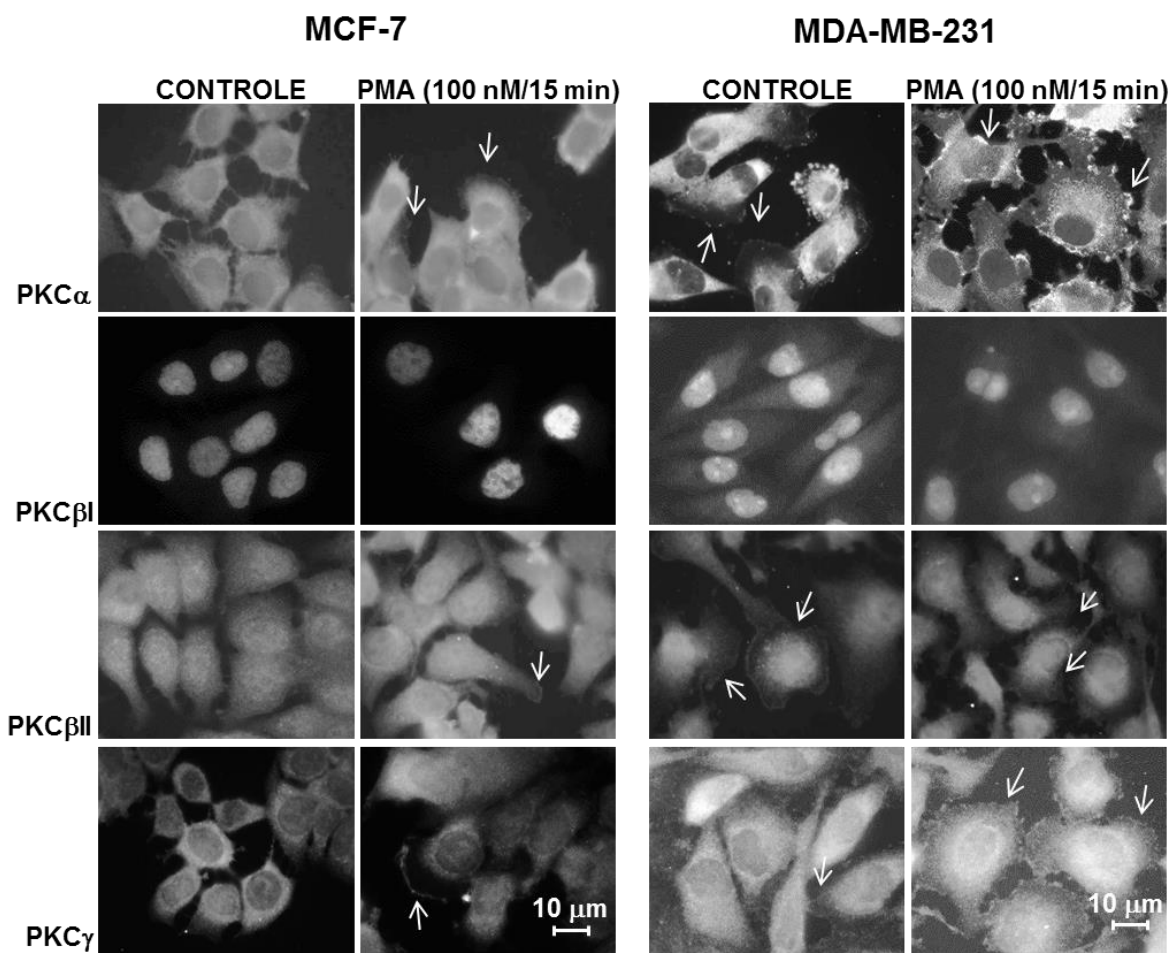


**Figura 11. Níveis de expressão relativa das cPKCs em linhagens de câncer de mama MCF-7 (ER<sup>+</sup>) e MDA-MB-231 (triplo-negativa)** (A) A expressão das PKC $\alpha$ , (B) PKC $\beta$ I, (C) PKC $\beta$ II e (D) PKC $\gamma$  nas linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 foi realizada por Western blot usando anticorpos comerciais específicos para cada isoenzima. A análise de densitometria foi realizada usando o programa ImageJ e os valores foram normalizados pelos níveis de proteínas totais (anti- $\alpha$ -tubulina) e comparados à expressão das cPKCs na linhagem MCF-7. Os valores representam a média e desvio padrão de três experimentos independentes. Diferenças estatisticamente significativa foram determinadas por ANOVA, usando o pós-teste Bonferroni, onde \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ .

Ensaio de Imunofluorescência mostraram a ativação das PKCs após estímulo com PMA, em ambas as linhagens celulares, sendo observado pela translocação das PKC $\alpha$  e  $\gamma$  para a membrana plasmática (Figura 12). Observou-se ainda um aumento na translocação da PKC $\gamma$  para a região perinuclear após o

tratamento com PMA. Interessantemente, também observou-se que as PKC $\alpha$ ,  $\beta$ II e  $\gamma$  estavam associadas às membranas na linhagem MDA-MB-231 não estimulada com PMA, indicando um maior nível de ativação basal de PKCs nessas células (Figura 12).

Em relação à PKC $\beta$ I, essa isoenzima foi observada principalmente no núcleo de ambas as linhagens, sendo que não se observou diferenças na translocação após o estímulo com PMA. Já para PKC $\beta$ II, foi possível observar que essa PKC apresenta-se difusa por toda célula, estando presente tanto no núcleo quando no citoplasma das linhagens MCF-7 e MDA-MB-231. Além disso, verificou-se que o tratamento com PMA levou à translocação dessa quinase para a região perinuclear e para a membrana plasmática (Figura 12).

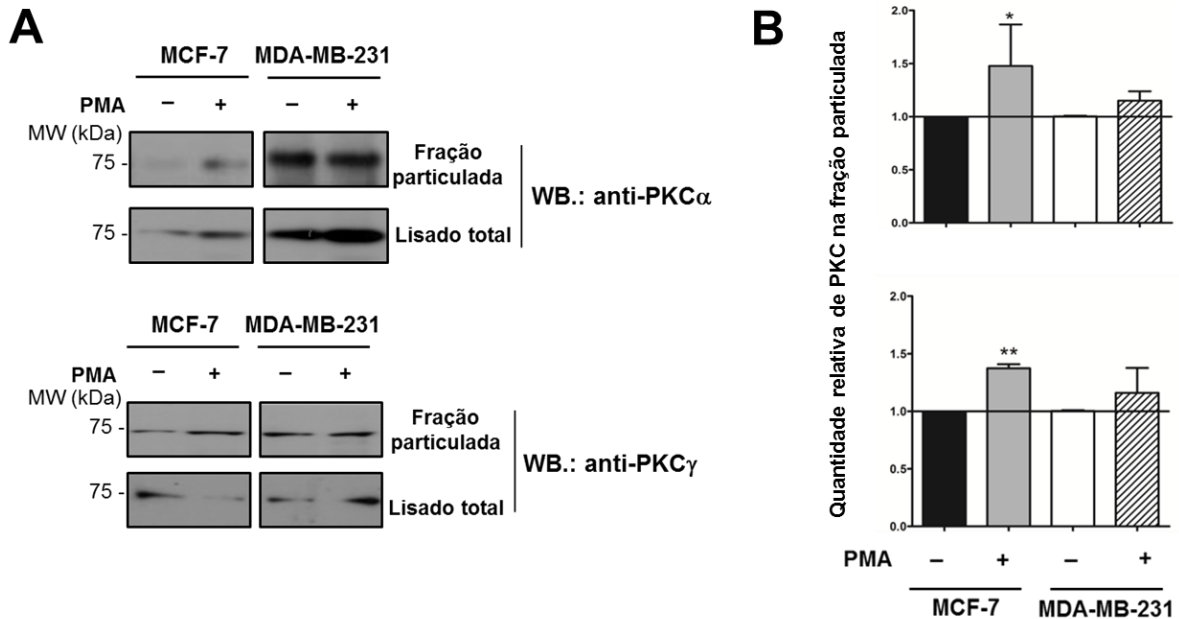


**Figura 12. Localização subcelular das cPKCs nas linhagens de câncer de mama MCF-7 (ER<sup>+</sup>) e MDA-MB-231 (triplo-negativa).** A imunolocalização das cPKC ( $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II e  $\gamma$ ) foi determinada por Imunofluorescência usando anticorpos comerciais específicos para cada isoenzima. Nesse ensaio, as células foram em alguns casos tratadas com 100 mM de PMA por 15 minutos, seguida por fixação com PFA 4% e incubação com anticorpos secundários anti-IgG de coelho ou anti-IgG de camundongo conjugados ao Alexa 555. As setas indicam regiões contendo cPKCs na membrana plasmática, aonde encontra-se tipicamente as PKCs ativas. Imagens representativas de dois experimentos independentes.

### **4.6.2 A linhagem MDA-MB-231 possui um maior conteúdo relativo de cPKCs ativas do que a linhagem MCF-7**

Os dados de imunofluorescência obtidos na presente tese confirmam dados da literatura (Fabbro, Küng, Roos, Regazzi, & Eppenberger, 1986) que mostram que as células MDA-MB-231 apresentam níveis elevados de PKC ativa. Em virtude disso, outro ensaio utilizado para determinar a ativação das PKCs (ensaios de fracionamento subcelular) foi utilizado para confirmar a existência de um maior conteúdo de cPKCs ativas (associado às membranas) nesta linhagem.

De fato, os resultados obtidos mostraram que a linhagem MDA-MB-231 possui um maior conteúdo relativo de PKC $\alpha$  e  $\gamma$  na fração particulada, quando comparado às células MCF-7 (Figura 13A e B). Além disso, quando as células MCF-7 foram tratadas com PMA, observou-se um aumento da associação das PKCs com membranas celulares (fração particulada). Contrariamente, em células MDA-MB-231 não foi observado aumento na translocação das cPKCs para membranas celulares quando essas células foram estimuladas com PMA, visto que na condição basal (sem tratamento com PMA) um grande conteúdo de PKC $\alpha$  e  $\gamma$  já estava presente na fração particulada.



**Figura 13. A linhagem MDA-MB-231 apresenta maior conteúdo de PKC $\alpha$  e  $\gamma$  ativas em relação à linhagem MCF-7. (A)** Os lisados totais das linhagens MDA-MB-231 e MCF-7 foram preparados após o tratamento dessas células com PMA. Esses lisados foram fracionados em fração particulada/membranar e solúvel. Os lisados foram então submetidos a ensaios de Western blot usando anticorpos comerciais específicos para PKC $\alpha$  e  $\gamma$ . A quantidade de PKC $\alpha$  e  $\gamma$  presentes na fração particulada (PKCs ativas) foi normalizada pela quantidade dessas quinases presentes no lisado total. **(B)** Análises de densitometria foram realizadas usando o programa ImageJ. Os valores representam a média e desvio padrão de três experimentos independentes, sendo que a análise estatística foi realizada comparando-se células não tratadas com células tratadas com PMA. Diferenças estatisticamente significativa foram determinadas por ANOVA, usando o pós-teste de Bonferroni, onde \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ .

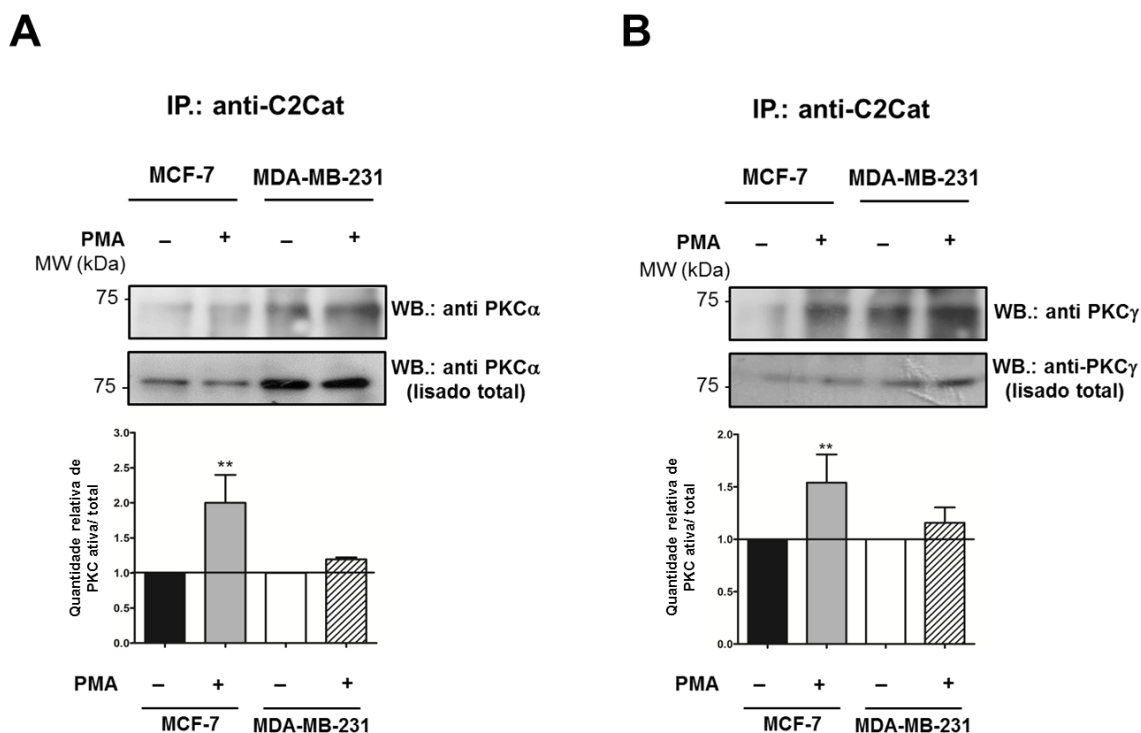
#### 4.6.3 Anticorpos anti-C2Cat detectam um maior conteúdo de PKC $\alpha$ e $\gamma$ ativas em células MDA-MB-231 quando comparadas a células MCF-7

O passo seguinte consistiu em verificar a capacidade do anticorpo anti-C2Cat em detectar níveis distintos de cPKC ativas nas linhagens MDA-MB-231 e MCF-7. Para responder essa questão, foi utilizado ensaios de imunoprecipitação. Nesse caso, proteínas totais dessas duas linhagens foram obtidas a partir de



células crescidas em meios sem vermelho de fenol, na ausência de estrógeno e com baixa concentração de soro fetal bovino (1%).

Ensaio de imunoprecipitação com o anticorpo anti-C2Cat revelaram uma maior quantidade de PKC $\alpha$  ativa na linhagem MDA-MB-231 do que em células MCF-7 (Figura 14A). É interessante notar que uma maior quantidade de PKC $\gamma$  foi imunoprecipitada da linhagem MDA-MB-231, embora o nível de expressão dessa isoenzima seja semelhante nas duas células, conforme mostra as figuras 13B e 11D. O anticorpo anti-C2Cat foi incapaz de imunoprecipitar PKC $\beta$ II (provavelmente devido à pequena quantidade expressa dessa isoenzima) e nPKC, nas duas linhagens estudadas (dados não mostrados). Quando as células foram previamente tratadas com PMA, houve um aumento na quantidade de PKC $\alpha$  e  $\gamma$  imunoprecipitada por anti-C2Cat na linhagem MCF-7. Entretanto, o tratamento com PMA promoveu apenas um pequeno aumento na quantidade de PKCs sendo imunoprecipitada na linhagem MDA-MB-231 (Figura 14). Conforme já mostrado nos resultados de fracionamento subcelular e de imunofluorescência, isso ocorreu provavelmente devido à existência de grande quantidade de PKCs já ativas constitutivamente. Esses resultados confirmam o valor do anticorpo anti-C2Cat no reconhecimento de formas ativas das cPKCs.

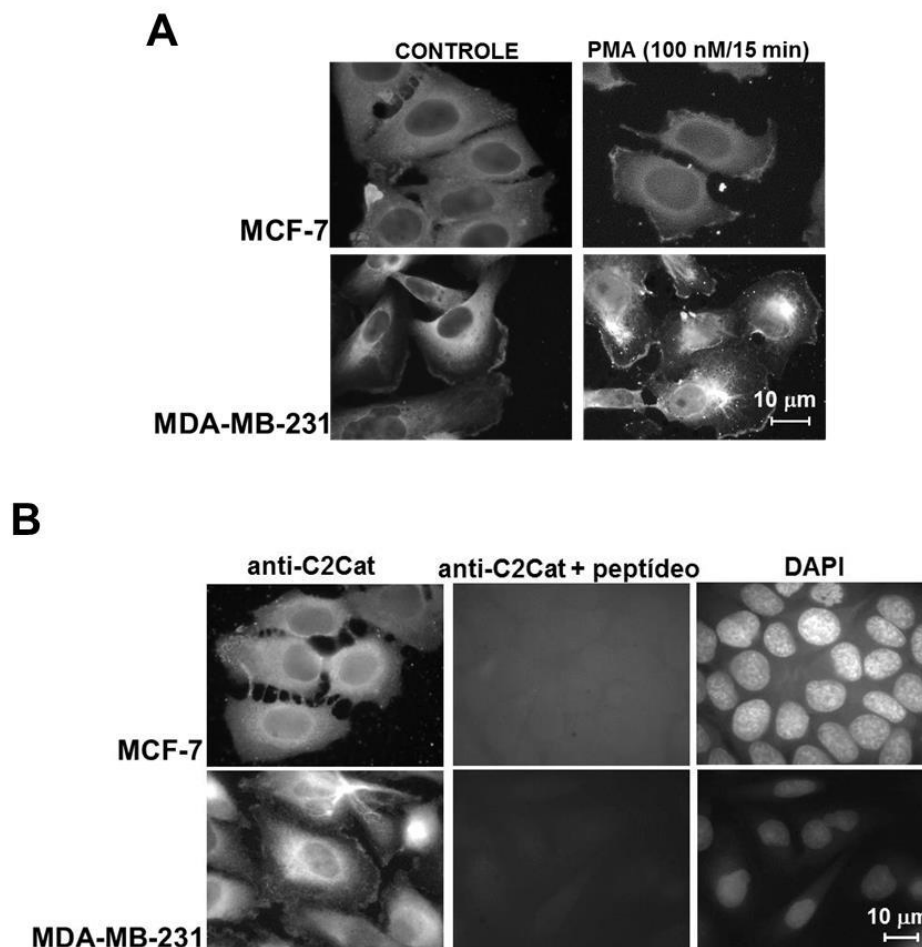


**Figura 14. Imunoprecipitação com o anticorpo anti-C2Cat evidencia um maior conteúdo de PKC $\alpha$  e  $\gamma$  ativa na linhagem MDA-MB-231 em comparação com a linhagem MCF-7. (A)** Ensaios de imunoprecipitação com o anticorpo anti-C2Cat seguido por Western blot com anticorpos anti-PKC $\alpha$  e **(B)** PKC $\gamma$  foram realizados à partir de lisados totais das linhagens MDA-MB-231 e MCF-7. Os lisados foram preparados com células controle e tratadas com PMA como descrito acima. Os valores representam a média e desvio padrão de três experimentos independentes, sendo que a análise estatística foi realizada comparando-se células estimuladas com PMA ou não. Diferenças estatisticamente significativa foram determinadas por ANOVA, usando o pós-teste Bonferroni, onde \*\*  $p < 0,01$ .

A seguir, a localização subcelular das cPKCs ativas nas linhagens MDA-MB-231 e MCF-7 foi avaliada por imunofluorescência, usando o anticorpo anti-C2Cat. Os resultados mostram que nas condições controle, em que as células não foram tratadas com PMA, as cPKCs apresentam-se distribuídas pelo citoplasma, embora uma marcação nuclear pouco intensa seja observada, provavelmente devido à presença da PKC $\beta$  (Figura 15A). Ainda observou-se uma maior

intensidade de marcação por anti-C2Cat na linhagem MDA-MB-231 quando comparada a células MCF-7. Além disso, a linhagem MDA-MB-231 apresentou uma grande quantidade de cPKCs na membrana plasmática e região perinuclear, o que é coerente com a localização de PKCs ativas (Kraft & Anderson, 1983; J. Violin & Newton, 2003). Nessas regiões detectou-se PKC $\alpha$  e  $\gamma$  após o tratamento com PMA, conforme mostra a figura 12, indicando que de fato, anti-C2Cat está reconhecendo essas isoenzimas ativas nas regiões citadas. A existência de cPKCs na membrana plasmática e região perinuclear na ausência de PMA corrobora os dados de imunofluorescência, fracionamento subcelular e imunoprecipitação, que demonstram um maior conteúdo de cPKCs ativas na linhagem MDA-MB-231 do que na linhagem MCF-7, em condições basais (Figura 15A).

Ademais, o tratamento das células das linhagens MDA-MB-231 e MCF-7 com PMA promoveu um aumento na translocação das cPKCs ativas para a membrana plasmática e região perinuclear. Na linhagem MDA-MB-231 esse aumento foi pouco significativo, ao passo que na linhagem MCF-7 só foi possível observar marcação membranar após estímulo com PMA (Figura 15A). Esses dados também corroboram os resultados apresentados anteriormente.



**Figura 15. Anticorpos anti-C2Cat revelam a presença de cPKCs ativas na membrana plasmática e região perinuclear em linhagens de câncer de mama. (A)** A imunolocalização de cPKCs ativas nas linhagens MDA-MB-231 e MCF-7 foi determinada por Imunofluorescência usando os anticorpos anti-C2Cat. Nesse ensaio, células foram fixadas com PFA 4% e incubadas com anti-C2Cat (1:100) e posteriormente com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado ao Alexa 555 (1,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Em algumas condições, as células foram tratadas com PMA. **(B)** A especificidade do anti-C2Cat foi avaliada por ensaios de competição, em que o anticorpo anti-C2Cat foi pré-adsorvido ao peptídeo C2Cat (10  $\mu\text{M}$ ) por 2 horas a 4  $^{\circ}\text{C}$ . Após isso, os anticorpos foram utilizados nos ensaios de imunofluorescência, conforme descrito. Imagens representativas de três experimentos independentes.

Em seguida, a especificidade do anticorpo anti-C2Cat foi verificada. Para tanto, ensaios de imunofluorescência foram novamente realizados utilizando para tanto o anticorpo anti-C2Cat previamente adsorvido com o peptídeo C2Cat, que foi

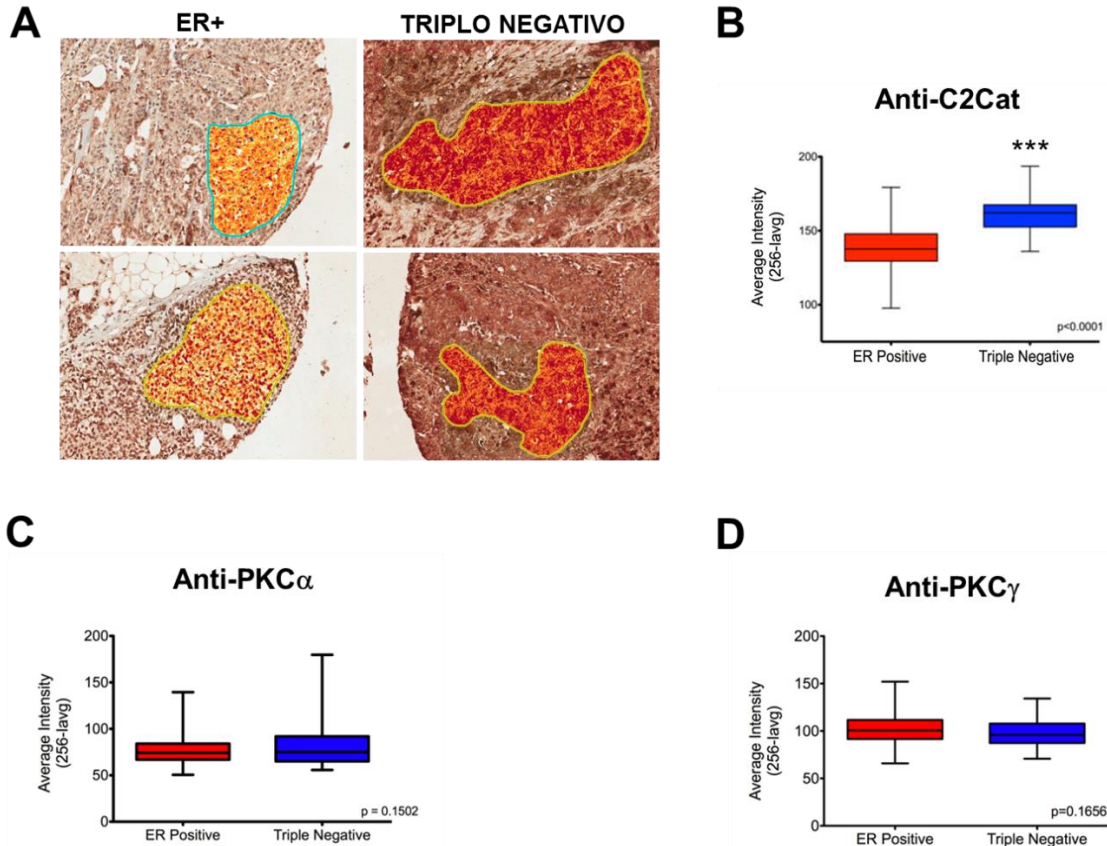
usado para a imunização de coelhos (Figura 15B). A pré-adsorção do anticorpo anti-C2Cat ao peptídeo C2Cat aboliu completamente a sua reatividade com PKCs em células MDA-MB-231 e MCF-7, confirmando assim a sua especificidade.

#### **4.6.4 Anti-C2Cat detecta mais cPKCs ativas em tumores de câncer de mama triplo-negativos**

Visto que uma das limitações para entender o papel das PKCs na tumorigênese é a falta de ferramentas que permitam detectar as PKCs em amostras de tumores (Garg et al., 2014), a reatividade dos anticorpos comerciais anti-PKC $\alpha$  e anti-PKC $\gamma$ , assim como do anticorpo anti-C2Cat com amostras de tumores foi avaliada por imunohistoquímica. Foram utilizados microarranjos de tecidos (TMA) contendo 29 amostras de tumores provenientes de pacientes com câncer de mama triplo-negativo e 105 provenientes de pacientes ER<sup>+</sup> (subtipo luminal), os quais são fenotipicamente similares às linhagens MDA-MB-231 e MCF-7, respectivamente (Figura 16).

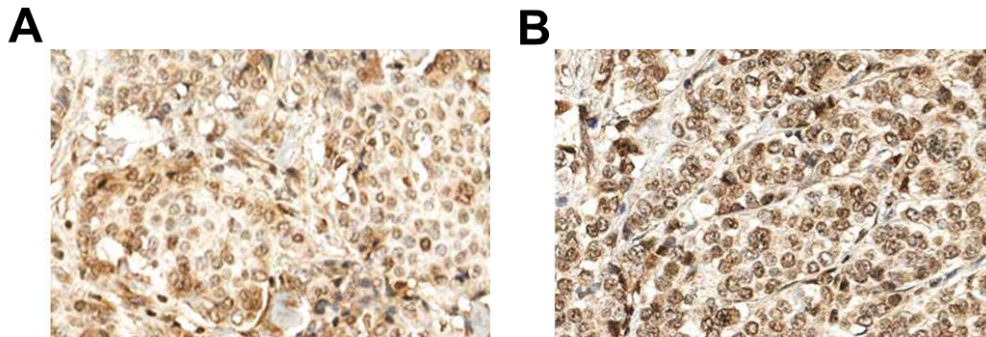
Verificou-se que amostras de tumores de mama triplo-negativos apresentaram uma maior reatividade com o anticorpo anti-C2Cat do que tumores de pacientes ER<sup>+</sup> (Figura 16A e B). No entanto, diferenças de expressão das PKCs  $\alpha$  e  $\gamma$  nas amostras de tumores testadas não foram observadas (Figura 16C e D). Esses resultados sugerem que nesse tipo de câncer de mama existe uma maior ativação dessas quinases, que por consequência pode induzir a ativação de vias de sinalização celular que contribuam para um fenótipo mais agressivo,

exibido por tumores triplo-negativos (Bae, Choi, Kang, & Lee, 2015; Cleator, Heller, & Coombes, 2007).



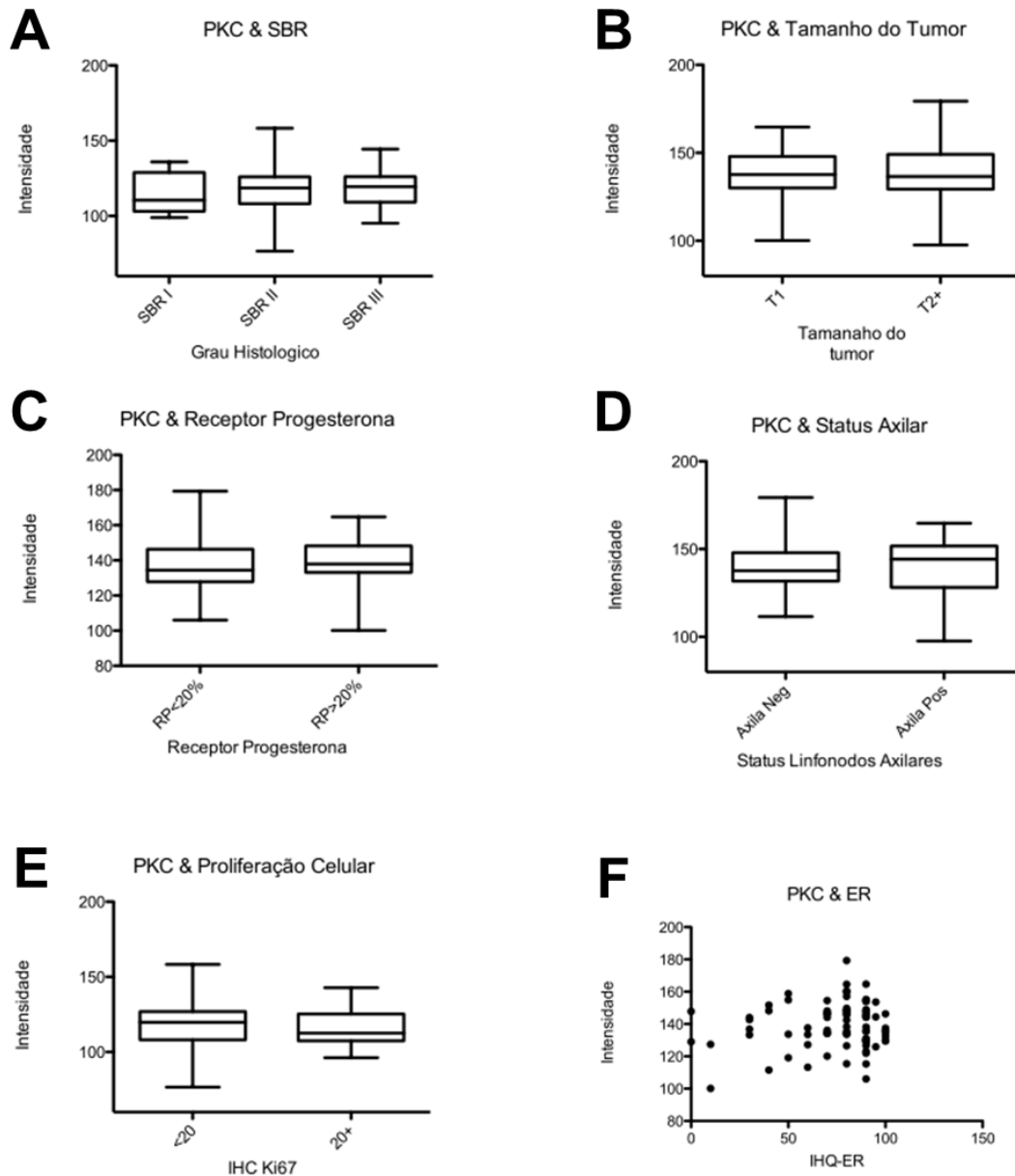
**Figura 16. Anti-C2Cat detecta maiores níveis de cPKCs ativas em tumores de câncer de mama triplo-negativos do que em tumores ER<sup>+</sup>.** (A) Ensaio de imunohistoquímica de microarranjo de tecidos (TMA) foram realizados com o anticorpo anti-C2Cat, visando a detecção de cPKCs ativas. Amostras representativas de tumores de câncer de mama ER<sup>+</sup> (painéis à esquerda) e triplo-negativos (painéis à direita). A área contendo tumor foi selecionada pelo patologista e a intensidade de coloração quantificada. Áreas avermelhadas mostram coloração intensa e positiva (n° de pixels > 220), coloração alaranjada mostra coloração mediana e positiva (n° de pixels entre 220 e 175) e áreas em amarelo mostram coloração fraca e positiva (n° de pixels entre 175 e 100), sendo que valores menores que 100 são considerados negativos. (B) O gráfico representa a quantificação de 105 amostras de tumores ER<sup>+</sup> e 29 amostras de tumores triplo-negativos, onde o eixo Y representa a intensidade de reatividade do anticorpo anti-C2Cat (teste T não pareado, onde \*\*\* p < 0,001), sendo que (C) representa a intensidade de reatividade do anticorpo comercial anti-PKC $\alpha$  e (D) anti-PKC $\gamma$ .

As amostras provenientes de pacientes ER<sup>+</sup> apresentaram uma maior variabilidade no nível de atividade de cPKCs quanto localização subcelular dessas quinases ativas, sendo que alguns pacientes apresentaram uma maior quantidade de cPKCs ativas no núcleo do que outros (Figura 17).



**Figura 17. Heterogeneidade de intensidade e distribuição subcelular das cPKCs ativas em amostras de tumores de mama ER<sup>+</sup>.** Ensaio de imunohistoquímica de microarranjo de tecidos foram realizados com o anticorpo anti-C2Cat, visando a detecção de cPKCs ativas. **(A)** Amostras representativas de tumores de câncer de mama ER<sup>+</sup> (subtipo luminal) apresentando menor marcação nuclear e **(B)** maior marcação nuclear.

Com base na heterogeneidade de expressão e localização subcelular das cPKCs ativas em tumores do subtipo luminal, decidiu-se investigar a existência de correlação entre o nível de ativação das cPKCs e outros parâmetros de prognóstico. No entanto, não foram observadas diferenças significativas para nenhuma das variáveis testadas como grau histológico (SBR I, SBR II, SBR III), tamanho tumoral, estado dos linfonodos axilares, índice de proliferação celular (Ki67), receptor de progesterona e receptor de estrogênio (Figura 18).



**Figura 18. Correlação entre níveis de atividade de cPKCs com parâmetros de prognóstico em amostras de tumores de mama ER<sup>+</sup>.** (A) Classificação de Scarff, Bloom e Richardson, para Grau Histológico (Bloom & Richardson, 1957), (B) Tamanho do tumor, sendo que T1 ≤ 2 cm e T2 entre 2 e 5 cm de espessura, (C) Receptor de Progesterona (RP), sendo que RP < 20% e RP > 20% indica que menos e mais que 20 % das células tumorais expressam RP, respectivamente, (D) Status axilar, sendo que foi avaliado a presença (axila pos) e ausência (axila neg) de metástase na cadeia de linfonodos axilares regionais, (E) Proliferação celular, sendo que < 20 e 20+ indica que menos e mais que 20 % das células tumorais expressam Ki67, respectivamente, (F) Análise de correlação entre intensidade de expressão do receptor de estrogênio (ER) e os níveis de atividade de cPKCs nos tumores.



Desta forma, as cPKCs ativas parecem ter um papel maior nos tumores triplo-negativos do que nos tumores ER<sup>+</sup>. Estudos subsequentes com um maior número de amostras poderão determinar o valor prognóstico desse anticorpo em pacientes com tumores de mama triplo-negativos.

### **4.7 Estratégia para produção de anticorpos monoclonais específicos para formas ativas das cPKCs**

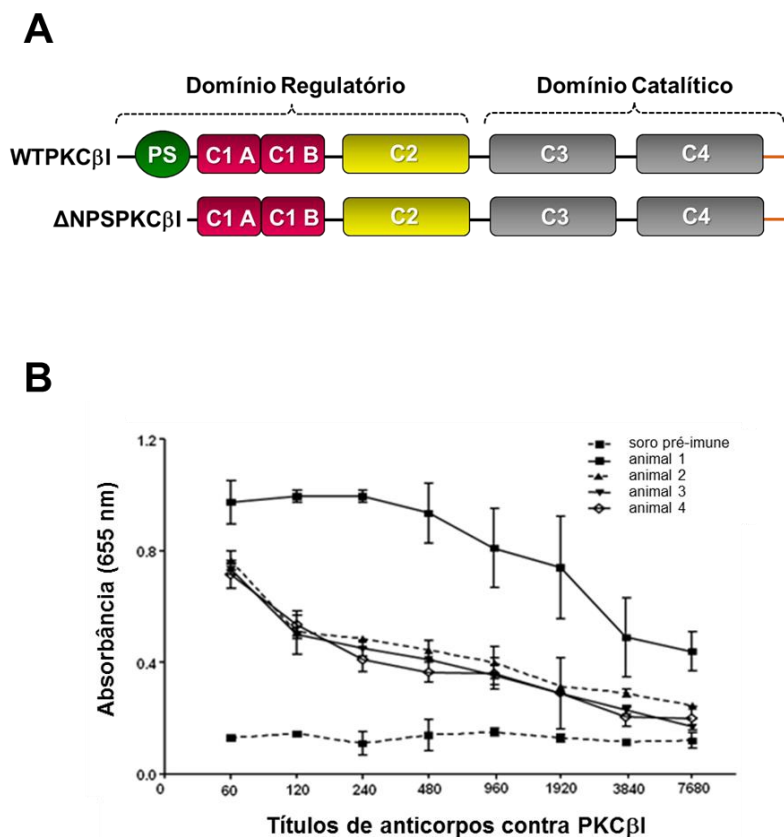
Com base em mudanças conformacionais que ocorrem nas cPKCs durante o processo de ativação, uma segunda estratégia para o desenvolvimento de anticorpos específicos para formas ativas das PKCs foi utilizada. Nesse caso, objetivou-se a produção de anticorpos monoclonais, uma vez que são produzidos por células imortalizadas (hibridomas) e podem ser continuamente produzidos no laboratório.

Para a produção dos anticorpos monoclonais, camundongos Balb/C foram imunizados com o extrato total de células HEK293T transfectadas com a construção  $\Delta$ NPSPKC $\beta$ I. Como descrito anteriormente, essa construção não codifica os 30 primeiros aminoácidos da região N-terminal da enzima, que inclui a região do pseudo-substrato (Figura 19A). Por isso, essa forma é considerada cataliticamente ativa, uma vez que interações intramoleculares que mantêm a enzima inativa, como a interação entre pseudo-substrato e o sítio catalítico, não estão mais presentes (Banci et al., 2002; Ron et al., 1995; Ron & Mochly-Rosen, 1995; Stebbins & Mochly-Rosen, 2001). De fato, mostramos que células

transfectadas com a construção  $\Delta$ NPSPKC $\beta$ I apresentam grande conteúdo de PKCs associadas às membranas (Figura 8).

Além disso, durante as imunizações buscou-se minimizar alterações na conformação da  $\Delta$ NPSPKC $\beta$ I. Dessa forma, os extratos celulares foram preparados em condições brandas (PBS pH 7,4 + 0,1% de Triton X-100) e as imunizações ocorreram na ausência de adjuvantes. Acredita-se que nessas condições a PKC $\beta$ I ainda estaria associada a proteínas parceiras, importantes na manutenção da conformação dessa quinase.

Após realização dos ciclos de imunização dos camundongos, a ativação da resposta imunológica foi acompanhada pela titulação de anticorpos específicos para PKC $\beta$ I, utilizando para tanto placas de ELISA sensibilizadas com PKC $\beta$ I purificada e o soro dos animais em diversas diluições (1:60 – 1:7680). Após seis imunizações, foi possível verificar que um dos animais apresentou o título de anticorpos anti-PKC $\beta$ I maior e por isso foi selecionado para ensaios de fusão (Figura 19B). Dessa forma, o baço desse animal foi removido assepticamente e os esplenócitos foram fusionados às células de mieloma P3U1 conforme descrito anteriormente.



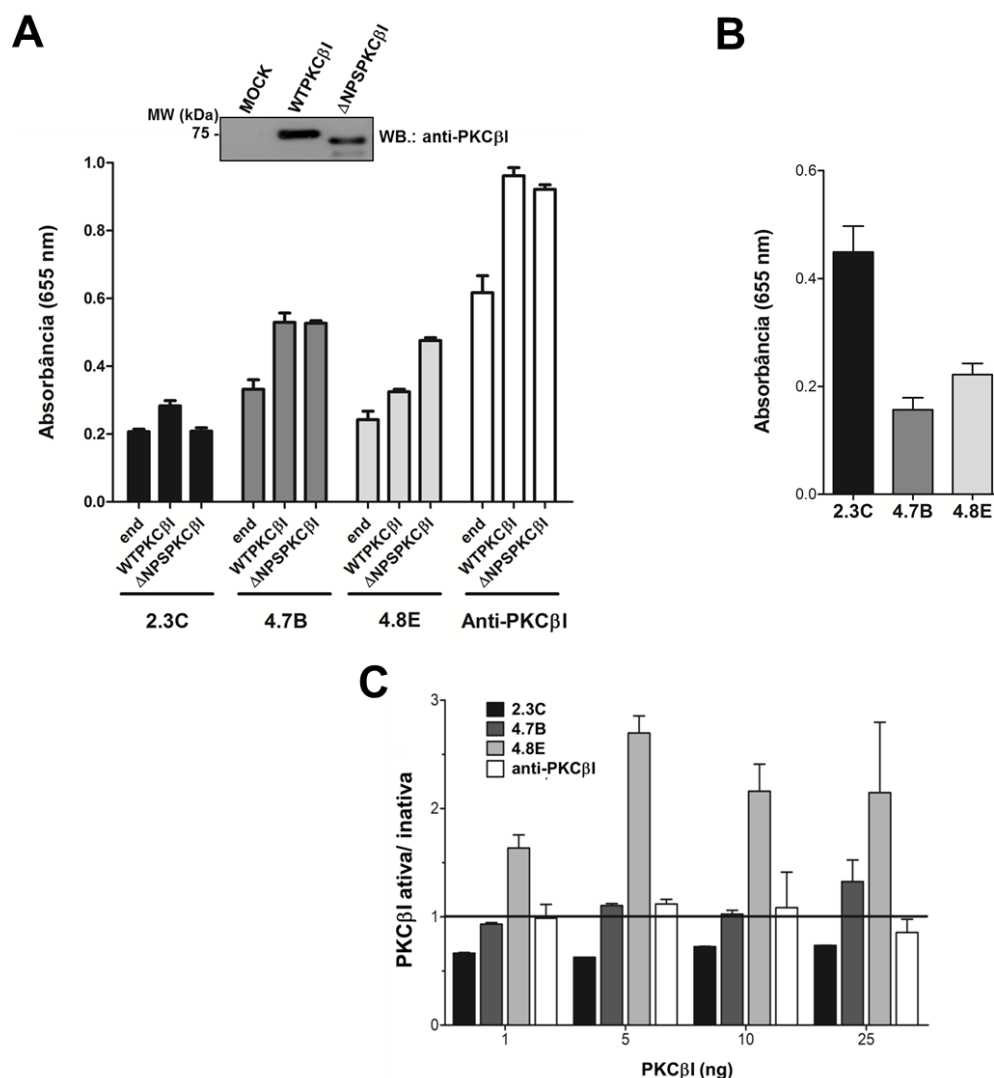
**Figura 19. Produção de anticorpos monoclonais específicos para formas ativas da PKCβI. (A)** Representação esquemática da construção ΔNPSPKCβI (que possui uma deleção dos 30 primeiros aminoácidos, incluindo a região do pseudo-substrato - PS), e sua comparação com a construção WTPKCβI (PKCβI inteira/ selvagem). **(B)** Animais foram imunizados com extratos proteicos provenientes de células HEK293T superexpressando a PKCβI constitutivamente ativa (ΔNPSPKCβI), e o título de anticorpos anti-PKCβI dos soros foram determinados por ELISA usando PKCβI recombinante e purificada (10 ng/poço, conforme a seção de materiais e métodos).

Usando o protocolo descrito no item 3.9 para a geração de anticorpos monoclonais, as células fusionadas foram distribuídas em 480 poços, dos quais 52 (10,83%) apresentaram crescimento de hibridomas após 14 dias em meio de seleção HAT. Para selecionar os hibridomas secretantes de anticorpos conformacionais anti-PKCβI, os 52 hibridomas foram triados por dois ensaios distintos de ELISA. No primeiro ensaio foi utilizando extratos proteicos de células

HEK293T não transfectadas ou transfectadas com as construções WTPKC $\beta$ I (PKC $\beta$ I selvagem) ou  $\Delta$ NPSPKC $\beta$ I (PKC $\beta$ I constitutivamente ativa) na sensibilização de placas. Em paralelo, um segundo ensaio de ELISA utilizando PKC $\beta$ I purificada como antígeno foi conduzido.

No Elisa usando extrato celular, verificou-se que um anticorpo da classe IgM, 2.3C, reconheceu mais o extrato celular contendo formas selvagens da PKC $\beta$ I em comparação com o extrato celular contendo formas constitutivamente ativa da PKC $\beta$ I. Já o anticorpo da subclasse IgG3, 4.7B, reconheceu igualmente as duas formas da PKC $\beta$ I (Figura 20A). Interessantemente, um anticorpo também da classe IgM, 4.8E, reconheceu cerca de 2 vezes mais o extrato de células superexpressando formas constitutivamente ativas da PKC $\beta$ I em relação ao extrato de células não transfectadas. Além disso, tal anticorpo reconheceu 1,5 vezes mais o extrato de células transfectadas com a forma constitutivamente ativa da enzima do que o extrato contendo a forma selvagem da PKC $\beta$ I. Já o anticorpo comercial anti-PKC $\beta$ I (Santa Cruz Biotechnology, Inc) não apresentou seletividade pelos extratos proteicos tendo reatividade similar para ambos.

Quando submetidos ao segundo ensaio de ELISA usando a PKC $\beta$ I purificada, foi possível verificar que os hibridomas 2.3, 4.7B e 4.8E secretavam anticorpos capazes de reconhecer a PKC $\beta$ I, indicando que a estratégia de imunização utilizada foi bem sucedida (Figura 20B).



**Figura 20. Triagem dos hibridomas secretantes de anticorpos por ELISA. A)** Reatividade dos anticorpos secretados pelos hibridomas 2.3C, 4.7B e 4.8E por ELISA usando extratos proteicos de HEK293T não transfectadas (expressa baixos níveis endógenos de PKCβ1, end.) e transfectadas com as construções WTPKCβ1 (PKCβ1 selvagem) ou ΔNPSPKCβ1 (PKCβ1 constitutivamente ativa). O perfil de expressão das construções foi analisado por ensaios de Western blot (painel superior), usando anticorpo monoclonal comercial anti-PKCβ1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc). **(B)** A reatividade dos anticorpos secretados pelos hibridomas citados em A também foi analisada por ELISA usando PKCβ1 purificada (100 ng). **(C)** Ensaios de ELISA utilizando a PKCβ1 recombinante purificada previamente ativada com lipídeos e cálcio (PKCβ1 ativa) e sem ativação (PKCβ1 inativa) mostra que apenas o anticorpo 4.8E reconhece a PKCβ1 ativa. Os valores representam a razão de reconhecimento dos sobrenadantes dos monoclonais por PKCβ1 ativa/inativa.

Os sobrenadantes dos hibridomas 2.3, 4.7B e 4.8E foram submetidos a novos ensaios de ELISA usando a PKC $\beta$ I recombinante previamente incubada com lipídeos e cálcio por 30 minutos a 37°C (Figura 20C). Os resultados mostram que apenas o anticorpo 4.8E reconheceu mais intensamente a PKC $\beta$ I após a sua ativação com lipídeos e cálcio. Esse efeito foi mais intenso quando o ensaio foi realizado com 5 ng de PKC $\beta$ I, onde o reconhecimento de formas ativas foi quase três vezes superior ao reconhecimento de formas inativas da enzima. Em acordo com os resultados obtidos no ensaio de ELISA com extratos proteicos, verificou-se que o anticorpo 2.3C reconheceu menos as formas ativas da PKC $\beta$ I, enquanto que o anticorpo 4.7B reconheceu as formas ativas e inativas com a mesma proporção.

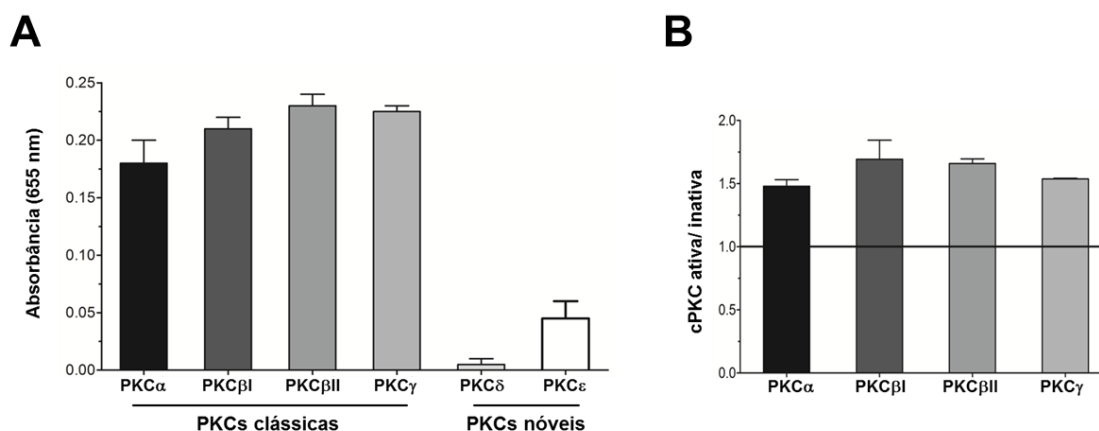
O aumento da ligação do anticorpo 4.8E à PKC $\beta$ I na presença de ativadores lipídicos e cálcio, assim como a maior reatividade desse anticorpo por extrato proteico de células superexpressando a PKC $\beta$ I constitutivamente ativa ( $\Delta$ NPSPKC $\beta$ I), sugere que o epítipo reconhecido por 4.8E é exposto apenas após a ativação da PKC $\beta$ I.

Em resumo, ao final da triagem, foram obtidos três hibridomas estáveis secretando anticorpos anti-PKC $\beta$ I, denominados 4.8E, 2.3C e 4.7B. Dentre os 52 hibridomas testados, 49 (94,2 %) apresentaram uma intensa reatividade contra extrato de células HEK293T não transfectadas, indicando que a grande maioria dos hibridomas secretavam anticorpos contra componentes celulares das células HEK293T. Apenas três hibridomas (5,8 %) se destacaram por apresentarem maior reatividade por extratos de células HEK293T superexpressando a PKC $\beta$ I e por

reconheceram a PKC $\beta$ I purificada em ensaios de ELISA, sendo que somente um hibridoma (4.8E) apresentou maior afinidade por formas ativas da PKC $\beta$ I.

### **4.7.1 O anticorpo monoclonal 4.8E reconhece preferencialmente cPKCs ativas**

Dado o alto grau de conservação nas sequências de aminoácidos entre as diferentes PKCs, é possível que o anticorpo monoclonal 4.8E possa reconhecer mais de uma PKC. Diante disso, a especificidade do anticorpo 4.8E foi avaliada por ensaios de ELISA usando diferentes c e nPKCs. O sobrenadante de cultura do hibridoma 4.8E (sem diluição) foi utilizado como anticorpo primário e o meio HAT, usado para cultivar os hibridomas, foi utilizado como controle negativo. Observou-se que o anticorpo 4.8E foi capaz de reconhecer as quatro isoenzimas que fazem parte da subfamília das cPKCs, não apresentando reatividade contra as nPKCs (Figura 21A).



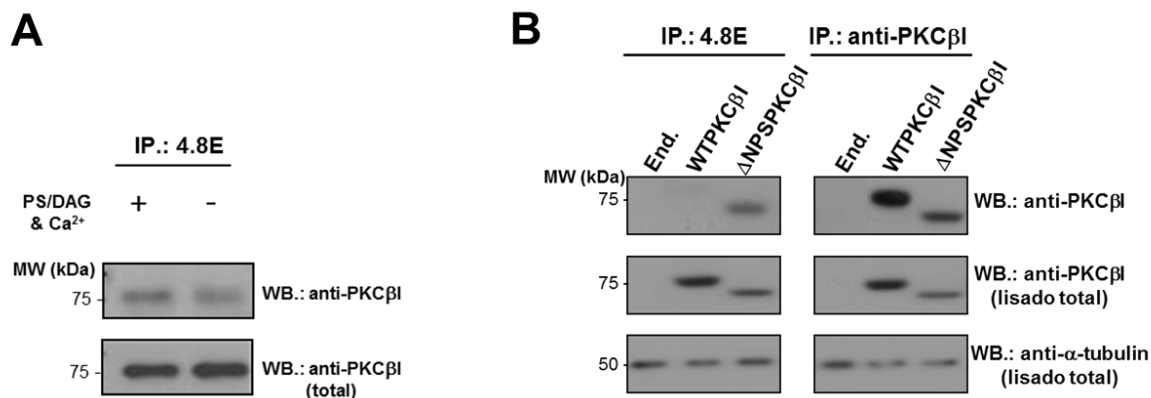
**Figura 21. Anticorpo monoclonal 4.8E reconhece preferencialmente PKCs clássicas ativas. (A)** 4.8E reconhece as cPKCs, mas não as nPKCs. Placas de ELISA foram sensibilizadas com todas as cPKCs (PKC $\alpha$ , PKC $\beta$ I, PKC $\beta$ II e PKC $\gamma$ ) e duas nPKCs (PKC $\delta$  e PKC $\epsilon$ ) (100 ng/poço) em tampão fosfato (PBS pH 7,4) seguida por incubação com o sobrenadante do hibridoma 4.8E não diluído. **(B)** 4.8E reconhece em maior proporção formas ativas das cPKCs. Ensaio de ELISA foram realizados com cPKCs previamente incubadas com lipídeos e cálcio (PKCs ativas) por 30 minutos a 37°C e sem ativação com lipídeos e cálcio (PKCs inativas). Os valores representam a razão de reconhecimento do anticorpo 4.8E pelas PKCs ativas e inativas.

O reconhecimento de formas ativadas de cPKCs também foi investigado por ELISA, utilizando cPKCs recombinantes purificadas não ativadas e ativadas por incubação com lipídeos e cálcio. Observou-se que o anticorpo 4.8E apresentou maior afinidade por todas as cPKCs ativadas (Figura 21B). Nesse ensaio, as proteínas recombinantes PKC $\delta$  e PKC $\epsilon$  foram utilizadas como controle e mesmo após ativação, o anticorpo 4.8E não foi capaz de reconhecer essas nPKCs (dados não mostrados), o que sugere que determinantes antigênicos reconhecidos por 4.8E são exclusivos das cPKCs ativas.



A etapa subsequente da caracterização do anticorpo 4.8E consistiu em avaliar a capacidade do anticorpo de imunoprecipitar a PKC $\beta$ I purificada e proveniente de extratos de células superexpressando essa quinase.

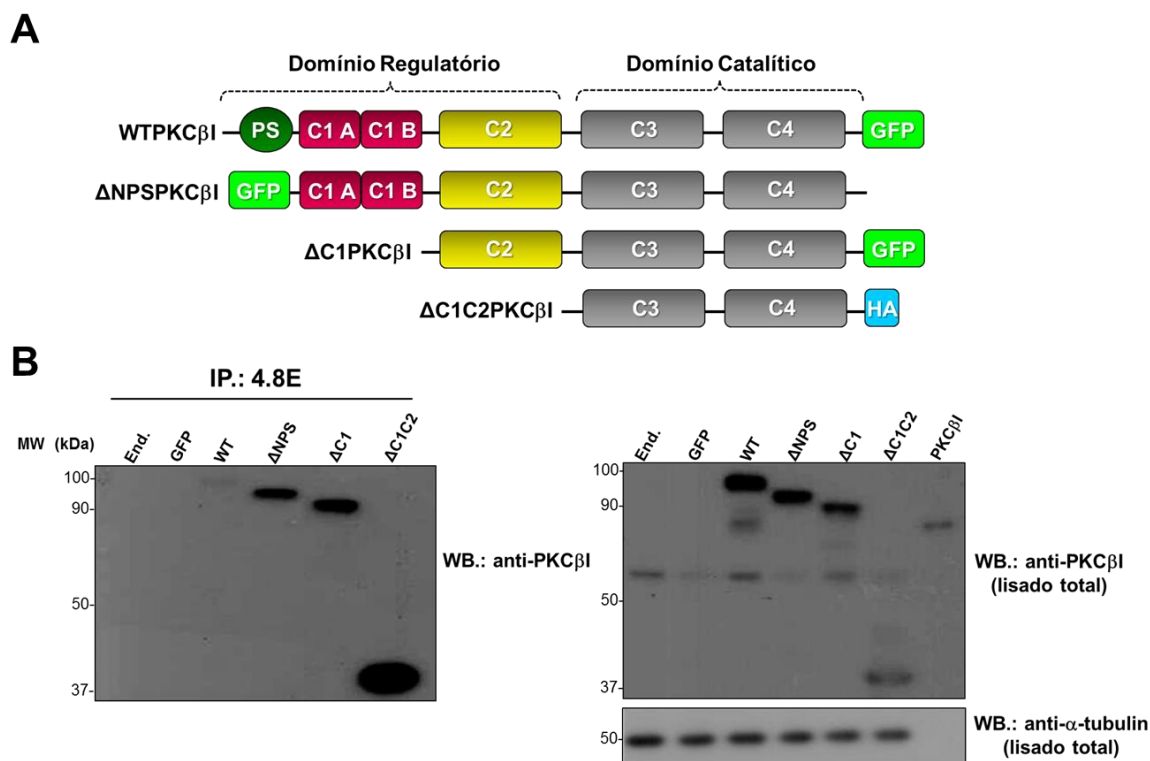
Os ensaios de imunoprecipitação com PKC $\beta$ I recombinante purificada mostraram que o anticorpo 4.8E imunoprecipitou com maior eficiência formas ativas da PKC $\beta$ I, previamente incubada com lipídeos e cálcio (Figura 22A). Ainda, ensaios de imunoprecipitação com extrato total de células HEK293T superexpressando formas constitutivamente ativas ou selvagem da PKC $\beta$ I, mostraram que o anticorpo 4.8E imunoprecipitou quase que exclusivamente formas constitutivamente ativas da PKC $\beta$ I ( $\Delta$ NPSPKC $\beta$ I), confirmando que esse anticorpo é capaz de reconhecer um epítipo exposto após a ativação (Figura 22B). Por outro lado, o anticorpo comercial específico para PKC $\beta$ I imunoprecipitou preferencialmente a forma selvagem desta isoenzima (WTPKC $\beta$ I), indicando possuir maior afinidade por formas inativas da PKC $\beta$ I (Figura 22B).



**Figura 22. Anticorpo monoclonal 4.8E imunoprecipita preferencialmente formas ativas da PKCβI. (A)** A proteína PKCβI recombinante purificada (50 ng) foi incubada com fosfatidilserina (PS), diacilglicerol (DAG) e cálcio (Ca<sup>2+</sup>) por 30 minutos a 37 °C. A PKCβI ativada ou não ativada foi subsequentemente incubada por 16 horas com o anticorpo monoclonal 4.8E acoplado aos *beads* de proteína L-agarose **(B)** Células HEK293T foram transfectadas com as construções WTPKCβI ou ΔNPSPKCβI, sendo os extratos proteicos totais resultantes incubados com o anticorpo monoclonal 4.8E acoplados aos *beads* de proteína L-agarose. Foi utilizado como controle o anticorpo comercial anti-PKCβI (Santa Cruz Biotechnology, Inc). Após a imunoprecipitação, as proteínas eluídas foram analisadas por Western blot usando o anticorpo comercial anti-PKCβI.

#### 4.7.2 O epítipo reconhecido por 4.8E está presente na região V3 ou no domínio catalítico das cPKCs

Com o objetivo de mapear o domínio que contém o epítipo reconhecido pelo anticorpo monoclonal 4.8E, ensaios de imunoprecipitação foram realizados usando extratos totais de células transfectadas com construções codificando a PKCβI selvagem (WTPKCβI) e com diferentes domínios deletados (ΔNPSPKCβI, ΔC1PKCβI e ΔC1C2PKCβI) (Figura 23A e B). A eficiência de transfecção e o perfil de expressão de cada construção foi avaliado por Western blot usando anticorpos comerciais anti-PKCβI (Figura 23B, painel à direita).



**Figura 23. O anticorpo monoclonal 4.8E se liga à região V3 ou domínio catalítico das PKCs clássicas. (A)** Representação esquemática da PKC $\beta$ 1 selvagem (WTPKC $\beta$ 1) e com diferentes domínios deletados ( $\Delta$ NPSPKC $\beta$ 1,  $\Delta$ C1PKC $\beta$ 1 e  $\Delta$ C1C2PKC $\beta$ 1). **(B)** Os lisados de células HEK293T foram incubados durante 16 horas com os anticorpos monoclonais 4.8E acoplados à proteína L-agarose. Após a imunoprecipitação, ensaios de Western blot foram conduzidos usando o anticorpo comercial anti-PKC $\beta$ 1 (painel à esquerda). Para verificar o perfil de expressão assim como a eficiência de transfecção das construções representadas em A, ensaios de Western blot usando lisados transfectados com as diferentes construções foram feitos com o anticorpo anti-PKC $\beta$ 1 (painel à direita). A quantidade de proteína aplicada em cada poço foi avaliada por Western blot usando o anticorpo anti- $\alpha$ -tubulina (painel à direita).

Foi possível verificar que o anticorpo monoclonal 4.8E imunoprecipitou fracamente a PKC $\beta$ 1 selvagem, mesmo sendo uma construção altamente expressa (Figura 23B). Por outro lado, verificou-se que o anticorpo 4.8E imunoprecipitou com alta eficiência a PKC $\beta$ 1 com o pseudo-substrato deletado ( $\Delta$ NPSPKC $\beta$ 1), com o domínio C1 deletado ( $\Delta$ C1PKC $\beta$ 1) e com os domínios C1 e C2 deletados

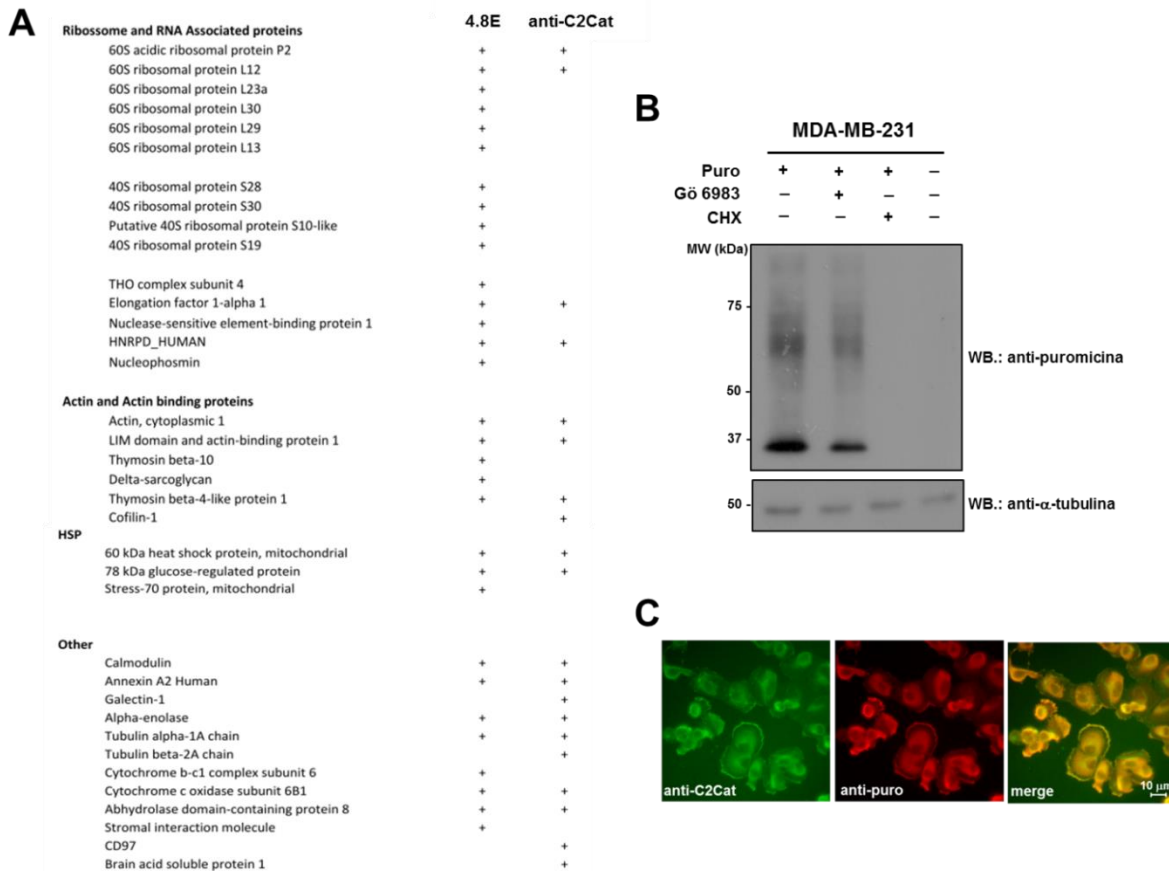
( $\Delta$ C1C2PKC $\beta$ I – domínio catalítico contendo a região V3). Em todas essas construções, a PKC $\beta$ I não possui a região do pseudo-substrato e, portanto encontra-se aberta e por consequência ativa. Além disso, observou-se que à medida que uma maior extensão do domínio regulatório foi deletado, a imunoprecipitação dessa quinase com o anticorpo 4.8E ocorreu de forma mais eficiente. Ainda, esse anticorpo não imunoprecipitou o controle negativo, que consistiu em células HEK293T transfectadas com o plasmídeo vazio pEGFP-N1 (MOCK), superexpressando a proteína GFP (Figura 23B).

Em conjunto, os resultados sugerem que o anticorpo conformacional da classe IgM, 4.8E, reconhece um epítipo específico das cPKCs que é exposto apenas após a ativação dessas quinases. Novos estudos para o mapeamento do epítipo reconhecido por esse anticorpo monoclonal serão realizados, porém os dados aqui apresentados indicam que o epítipo está presente em regiões exclusivas da região V3 ou do domínio catalítico das cPKCs.

#### **4.8 cPKCs ativas podem estar envolvidas na síntese proteica na linhagem metastática de câncer de mama MDA-MB-231**

Os anticorpos conformacionais anti-C2Cat e 4.8E foram a seguir aplicados no estudo do papel das cPKCs em células de câncer de mama triplo-negativas MDA-MB-231. Para isso, foram realizados ensaios de co-imunoprecipitação utilizando os referidos anticorpos, seguida pela identificação das proteínas co-imunoprecipitadas por espectrometria de massas. Controles negativos utilizando o

soro pré-imune foram realizados, sendo que as proteínas co-immunoprecipitadas nessa condição foram desconsideradas. Verificou-se que ambos os anticorpos ligaram às subunidades inteiras de ribossomo, proteínas associadas à RNAs, actina, proteínas que se associam à actina e proteínas de choque térmico (Figura 24A). Dessa forma, os dados de proteômica sugerem que as cPKCs podem estar envolvidas na síntese de proteínas na linhagem MDA-MB-231.

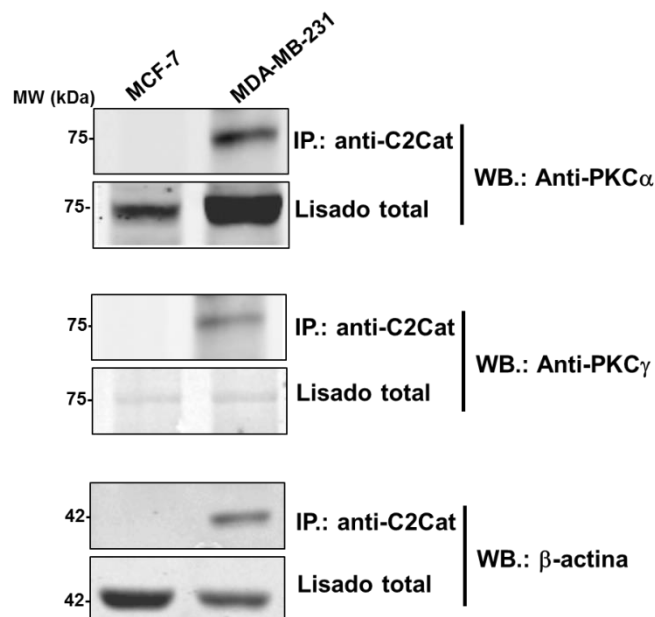


**Figura 24. cPKCs ativas podem estar envolvidas na síntese proteica na linhagem metastática de câncer de mama MDA-MB-231. (A)** As proteínas parceiras das cPKCs foram identificadas por espectrometria de massa, após a realização de ensaios de co-imunoprecipitação com os anticorpos conformacionais anti-C2Cat e 4.8E **(B)** As células MDA-MB-231 foram tratadas com o inibidor de cPKCs, gö 6983 (10  $\mu$ M por 6 horas) e as proteínas sintetizadas marcadas com puromicina (puro, 10  $\mu$ M por 5 minutos) na presença ou ausência de ciclohexamida (CHX, 30  $\mu$ M por 10 minutos). Em algumas condições as células não foram tratadas com puromicina (controle negativo). A incorporação de puromicina foi analisada por Western blot usando o anticorpo anti-puromicina. O anticorpo anti- $\alpha$ -tubulina foi utilizado como controle de carregamento de proteínas. Imagem representativa de três experimentos independentes. **(C)** As cPKCs ativas colocalizam-se com sítios ativos de síntese proteica. As células MDA-MB-231 foram tratadas com puromicina e fixadas com PFA 4 %, e marcadas com anti-C2Cat (verde) e anti-puromicina (vermelho).

Com o objetivo de validar a hipótese de que as cPKCs atuam na síntese de proteínas, as células MDA-MB-231 foram tratadas com o inibidor de cPKC gö 6983, seguido pelo tratamento com puromicina.

Como predito, a inibição das cPKCs promoveu uma diminuição na síntese de proteínas recém sintetizadas. Ainda, quando as células foram tratadas com ciclohexamida não houve incorporação de puromicina nas proteínas (Figura 24B). Além disso, observou-se intensa colocalização entre as cPKCs ativas e as proteínas contendo puromicina (recém sintetizadas) nas regiões membranas e perinuclear de células MDA-MB-231 (Figura 24C).

A seguir, a interação entre PKCs ativas e actina, uma proteína largamente envolvida na motilidade celular, foi avaliada por ensaios de imunoprecipitação utilizando o anticorpo anti-C2Cat (Figura 25). Verificou-se que PKC $\alpha$  e PKC $\gamma$  se associaram com a proteína de citoesqueleto  $\beta$ -actina em células da linhagem MDA-MB-231, mas não em células MCF-7. Esse resultado sugere que PKCs ativas, abundantemente encontradas em células MDA-MB-231, podem formar complexos com microfilamentos de actina e regular a migração dessas células.



**Figura 25. PKC $\alpha$  e  $\gamma$  se associam com  $\beta$ -actina apenas em células da linhagem MDA-MB-231.** Ensaios de imunoprecipitação com o anticorpo anti-C2Cat foram realizados visando validar a interação entre cPKCs ativas e actina. As proteínas imunoprecipitadas assim como os lisados totais foram submetidos a ensaios de Western blot com anticorpos anti-PKC $\alpha$ , PKC $\gamma$  e  $\beta$ -actina.

Em conjunto, os resultados sugerem que as cPKCs podem atuar na síntese de proteínas envolvidas na migração celular (por exemplo, actina e proteínas que se ligam à actina) durante o processo de metástase. Estudos complementares deverão ser conduzidos para a caracterização detalhada das proteínas parceiras das cPKCs e para determinar se a inibição da interação entre PKC e a proteína parceira poderá afetar a migração celular.



## 5 DISCUSSÃO

As proteína quinases C atuam na regulação de funções biológicas críticas, como proliferação, diferenciação, apoptose, adesão e migração (Reyland, 2009). Apesar de diversos estudos terem confirmado que as PKCs estão associadas com um grande número de processos patológicos como câncer, disfunções cardiovasculares, desordens metabólicas, dentre outras; ainda não se estabeleceu a relação entre estado de ativação das diferentes isoenzimas das PKCs com essas doenças. Isso se deve, em parte, a ausência de ferramentas que possibilitam a distinção das formas ativas e inativas das PKCs, sobretudo em amostras de tecidos (Garg et al., 2014).

Ao contrário do que ocorre em outras quinases, como ERK, AKT e JNK, as fosforilações em cPKCs não estão associadas com a ativação dessas quinases (Payne et al., 1991). Para cPKCs, as fosforilações estão presentes tanto na forma inativa, quanto ativa da enzima e fazem parte do processo de maturação/enovelamento dessa subclasse de quinases. A ativação completa ocorre apenas quando o pseudo-substrato é expulso do sítio ativo mediante a ligação de lipídios (Taylor et al., 2012; Wu-Zhang & Newton, 2013). Por tal razão, anticorpos contra resíduos fosforilados das cPKCs que estão disponíveis comercialmente, são incapazes de distinguir entre formas ativas e inativas dessas quinases. Além disso, anticorpos que reconhecem resíduos fosforilados podem gerar muitos falsos-negativos, uma vez que a fosforilação é lábil e comumente perdida durante a manipulação de amostras de tecidos (Mandell, 2003). Em virtude disso, existe

uma crescente demanda para o desenvolvimento de anticorpos que reconhecem apenas epítomos expostos após a ativação.

Na presente tese desenvolveu-se com êxito dois anticorpos conformacionais, um policlonal (anti-C2Cat) e outro monoclonal (4.8E), ambos capazes de reconhecer preferencialmente formas ativas das cPKCs. Esses anticorpos funcionaram em ensaios de ELISA e imunoprecipitação, sendo que apenas o anticorpo policlonal anti-C2Cat funcionou em ensaios de imunofluorescência e imunohistoquímica nas condições testadas.

O anticorpo policlonal anti-C2Cat foi racionalmente desenvolvido baseando-se em trabalhos anteriores de Mochly-Rosen e colaboradores que identificaram uma região nas PKCs denominada de  $\psi$ RACK, presente no domínio C2 da PKC $\beta$ . Essa região possui homologia com a RACK1, porém contém uma troca de aminoácidos que confere uma maior afinidade da PKC pela RACK do que pela  $\psi$ RACK. Estudos bioquímicos mostraram que a  $\psi$ RACK participa de uma interação intramolecular com o sítio de ligação da RACK, na quinase inativa sendo essa interação rompida após a ativação da quinase (Banci et al., 2002; Ron et al., 1995; Ron & Mochly-Rosen, 1995; Stebbins & Mochly-Rosen, 2001). Além disso, a reinterpretção da estrutura cristalográfica da PKC $\beta$ II publicada recentemente por Antal e colaboradores (Antal, Callender, et al., 2015) mostrou que a interação entre os domínios C2 e catalítico é responsável por manter as quinases inativas, uma vez que mutações em resíduos de aminoácidos envolvidos no contato entre essas regiões (K205 e E655, presentes nos domínios C2 e catalítico, respectivamente) promoveram a abertura da conformação da quinase (Antal,

Callender, et al., 2015). Partindo-se desse panorama, foi selecionado um peptídeo (C2Cat) contendo a região da  $\psi$ RACK e localizado entre as regiões de interação dos domínios C2 e catalítico. Conforme destacado, C2Cat deveria ser exposto apenas após a ativação das PKCs, o que foi confirmado na presente tese com o anticorpo anti-C2Cat.

O critério utilizado para o desenvolvimento de anticorpos monoclonais foi a imunização de camundongos com extratos proteicos provenientes de células transfectadas com a construção  $\Delta$ NPSPKC $\beta$ I que contém uma exclusão dos 30 primeiros aminoácidos onde está localizada a região do pseudo-substrato. De acordo com Pears e colaboradores, a substituição do resíduo de alanina por glutamato no pseudo-substrato, assim como a deleção completa dessa região, leva a formação de uma PKC constitutivamente ativa (Pears et al., 1990). Por conseguinte, a PKC $\beta$ I sem o pseudo-substrato apresenta uma conformação aberta com epitopos exclusivamente expostos nesta conformação. Com o propósito de minimizar alterações na conformação da PKC $\beta$ I e preservar interações proteína-proteína importantes por manter a conformação dessa quinase, as imunizações ocorreram com extratos proteicos preparados em condições brandas e sem a administração de adjuvantes.

Ambos os anticorpos conformacionais desenvolvidos na presente tese apresentaram seletividade por cPKCs ativas, o que foi demonstrado por ensaios de ELISA com diferentes PKCs purificadas e confirmado por ensaios de imunoprecipitação. É importante mencionar que nos ensaios de ELISA, o antígeno foi imobilizado aleatoriamente na superfície da placa, o que pode levar a

alterações na conformação da proteína. Dessa forma, a avaliação do reconhecimento de anticorpos por conformações específicas da proteína alvo não é precisa. Por essa razão, mesmo após a ativação das PKCs com lipídeos e cálcio, algumas proteínas podem estar presentes em uma conformação não reconhecida pelos anticorpos anti-C2Cat e 4.8E. Da mesma forma, nas condições experimentais onde as PKCs não são incubadas com lipídeos e cálcio (forma inativa), parte dessas proteínas podem ter regiões expostas, possibilitando assim o reconhecimento pelos anticorpos. Apesar disso, os resultados mostram claramente que anti-C2Cat e 4.8E possuem maior afinidade pelas formas ativas das cPKCs, o que também foi confirmado em ensaios de imunoprecipitação utilizando tanto células superexpressando PKC constitutivamente ativa ou selvagem, quanto em células expressando níveis endógenos de PKCs e estimuladas com PMA.

Os resultados obtidos nessa tese, também permitiram observar que o anticorpo anti-C2Cat foi capaz de monitorar a ativação transiente das cPKCs em linhagens de neuroblastoma (Neuro 2A e SK-N-SH) após o estímulo com morfina, ATP ou glutamato em diferentes tempos de tratamento. Por outro lado, o estímulo dessas células com PMA promoveu a ativação prolongada das cPKCs, conforme detectado pela translocação das mesmas para membranas celulares e o aumento de reatividade do anti-C2Cat. Sabe-se que o tratamento de células com PMA causa uma ativação da PKC mais prolongada do que a ativação promovida por agonistas que geram DAG (Schechtman et al., 2004), isso por que a maioria das

células não possuem esterases necessárias para a metabolização de ésteres de forbol, como PMA (Sando et al., 2003).

A duração e intensidade da atividade de quinases, como ERK e PI3K, já foi mostrado ser um importante mecanismo de regulação do destino celular (J.-Y. Chen, Lin, Cimprich, & Meyer, 2012; Ebisuya, 2005; Marshall, 1995). Por exemplo, o tratamento de células PC12 com o fator de crescimento neural (NGF) induz uma ativação prolongada da ERK e diferenciação para células semelhantes a neurônios, com emissão de prolongamentos. Em contraste, a estimulação transiente da ERK promovida por fator de crescimento epidermal (EGF) leva à proliferação celular (Marshall, 1995). Dessa forma, a utilização do anti-C2Cat para a detecção de cPKCs ativas, visando o monitoramento da dinâmica espaço-temporal da ativação das cPKCs, poderá auxiliar na compreensão de como essa ativação se correlaciona com diferentes processos biológicos, como proliferação, diferenciação, migração, dentre outros.

Existem outros métodos que permitem mensurar a atividade das PKCs em células vivas (J. D. Violin et al., 2003). Esses métodos requerem a superexpressão de PKCs em fusão com GFP e a visualização da translocação das PKCs para membranas ou compartimentos celulares após um estímulo (Sakai et al., 1997; Schechtman et al., 2004). Adicionalmente, a atividade da PKC pode também ser quantificada por FRET. Especificamente, esse método envolve a transfecção de células com uma construção que codifica um peptídeo substrato fusionado à proteína CFP, e um domínio que se liga ao peptídeo substrato fosforilado (FHA2) fusionado ao YFP. A presença da PKC ativa promove a fosforilação do substrato,

a ligação deste ao domínio FHA2 e por consequência uma redução na medida de FRET (J. D. Violin et al., 2003). Os demais métodos existentes para mensurar a atividade das PKCs, como ensaios de fracionamento celular ou radioativos, os quais permitem mensurar a fosforilação dos substratos pela incorporação de  $\gamma^{32}$ -P-ATP e ensaios de ELISA que utilizam peptídeo substrato e anticorpos contra a forma fosforilada do peptídeo substrato, envolvem o preparo de extratos proteicos e por isso não são adequadas para a realização de estudos de dinâmica de ativação e concomitantemente localização das PKCs ativas (Boyle et al., 2014; Sando et al., 2003). Nesse sentido, a determinação do papel das PKCs ao nível endógeno e sem a necessidade de transfecção de células com sondas, pode ser estabelecido com a utilização do anti-C2Cat.

PKCs têm sido associadas com câncer, isso porque demonstrou-se que essas quinases eram os receptores para o promotor de tumor éster de forbol (Castagna et al., 1982). Dessa forma, estabeleceu-se o paradigma de que a ativação das PKCs promove a formação de tumores (Griner & Kazanietz, 2007). No entanto, estudos clínicos com inibidores das PKCs não obtiveram sucesso no tratamento de câncer, como evidenciado pela ausência de fármacos aprovados tendo como alvo PKCs (Daria Mochly-Rosen et al., 2012a). Isso sugere que as PKCs podem apresentar uma dualidade funcional dependendo do contexto fisiológico, podendo funcionar como promotor ou supressor de tumores. De fato, é bem estabelecido que a ativação prolongada ou repetitiva das PKCs leva a degradação e a sua depleção (Tianyan Gao et al., 2008). Além disso, recentemente Antal e colaboradores (2015) mostraram que a expressão das PKCs

é geralmente reduzida em tumores e que a maioria das mutações nessas quinases, encontradas em diferentes tipos de câncer, causam uma diminuição ou perda da atividade das PKCs. Ainda, a correção de uma mutação na PKC $\beta$  que causava perda de função dessa PKC, em uma linhagem de câncer de cólon, promoveu restauração da atividade da PKC $\beta$ , aumento da expressão da mesma e da PKC $\alpha$ ; além da redução do tumor, indicando que as PKCs podem atuar não apenas como promotoras de tumores, mas também como supressoras (Antal, Hudson, et al., 2015). Esses trabalhos demonstram que o papel das isoenzimas das PKCs no câncer é ainda controverso e que estudos visando verificar não apenas a expressão, mas também a atividade das PKCs devem ser conduzidos.

Interessantemente, poucas mutações em PKCs foram encontradas em câncer de mama (Antal, Hudson, et al., 2015), o que sugere que neste tipo de câncer as PKCs não possuem papel como supressor de tumor. Corroborando essa hipótese, o anticorpo anti-C2Cat foi capaz de detectar maior conteúdo de cPKCs ativas em células da linhagem de câncer de mama MDA-MB-231 (triplo-negativa) do que na linhagem MCF-7 (ER<sup>+</sup>), o que foi evidenciado pela maior quantidade de PKC $\alpha$  e  $\gamma$  imunoprecipitadas pelo anti-C2Cat e pela maior quantidade de PKCs ativas presentes na membrana plasmática e região perinuclear. Os resultados obtidos nos ensaios de imunoprecipitação e imunofluorescência usando o anticorpo anti-C2Cat corroboram os resultados obtidos nos ensaios de fracionamento subcelular com anticorpos comerciais, os quais mostram claramente a existência de uma maior quantidade de PKC $\alpha$  e  $\gamma$  na fração particulada. Os resultados obtidos na presente tese são consistentes com

---

os resultados previamente publicados que mostram uma maior atividade de PKC em linhagens de câncer de mama triplo-negativas do que em células ER<sup>+</sup> (Fabbro et al., 1986).

Os níveis de expressão das PKCs  $\alpha$  e  $\gamma$ , assim como a atividade das cPKCs nas amostras de tumores de câncer de mama triplo-negativos (subtipo basal) foram comparadas com amostras ER<sup>+</sup> (subtipo luminal), as quais apresentam o mesmo perfil de expressão que as linhagens MDA-MB-231 e MCF-7, respectivamente. Demonstrou-se uma maior ativação das cPKCs em tumores mais agressivos, triplo-negativos, sendo que nas amostras menos agressivas, subtipo luminal, observou-se uma distribuição heterogênea, com algumas células apresentando mais cPKCs ativas do que outras. Entretanto, verificou-se níveis de expressão semelhantes das PKC $\alpha$  e  $\gamma$  nos dois grupos de câncer de mama. Esses resultados sugerem que as PKCs podem ativar vias de sinalização que contribuem para um fenótipo mais agressivo em pacientes triplo-negativos. É conhecido que a PKC $\alpha$  tem um papel fundamental no processo de migração das células MDA-MB-231, que é uma etapa necessária para o estabelecimento da metástase tumoral (Lonne et al., 2010), entretanto o mecanismo pelo qual a atividade da PKC influencia a migração celular, ainda não é conhecido. Humphries colaboradores (2014) demonstraram que o aumento na expressão de micro-RNAs endógenos (miR-200b), conhecido por diminuir a transição epitélio mesenquimal, promoveu uma redução na expressão da PKC $\alpha$  e na ativação da GTPase Rho Rac1, levando assim a uma redução da migração de células MDA-MB-231 e da formação de metástase *in vivo*. Isso sugere que a PKC $\alpha$  contribui para um



fenótipo mais agressivo do câncer de mama, por meio da ativação da GTPase Rho Rac1, que possui papel central na reorganização dos microfilamentos de actina em focos de migração (Bass et al., 2007; Humphries et al., 2014).

Ng e colaboradores (2011) também mostraram que PKC $\alpha$  atua na regulação da dinâmica dos microfilamentos de actina, por meio da formação de um complexo molecular com seu substrato ezrina, o qual atua na ligação da membrana celular com o citoesqueleto de actina. Postula-se que uma vez fosforilada, a ezrina sofre mudanças conformacionais, passando de uma forma oligomérica inativa para uma forma monomérica ativa. Nesta conformação, ezrina é capaz de se associar com microfilamentos de actina e por consequência modula a motilidade de células tumorais (Gautreau, Louvard, & Arpin, 2000). De fato, a ezrina já foi descrita como implicada com a progressão tumoral e disseminação metastática (Saito et al., 2013). Recentemente, Weitsman e colaboradores (2014) sugeriram que a detecção da interação entre PKC $\alpha$  e ezrina por FRET poderia ser um marcador para prognóstico precoce de metástases de tumores triplo-negativos.

De acordo com os estudos acima descritos, os resultados obtidos na presente tese sugerem que cPKCs ativas formam complexos com microfilamentos de actina e regulam a motilidade celular. Isso foi evidenciado pela identificação de actina e proteínas que se associam à actina (cofilina 1, LIM domínio, timosina, dentre outras) após a realização de ensaios de co-imunoprecipitação usando células MDA-MB-231 e os anticorpos anti-C2Cat e 4.8E. Além disso, a interação entre PKCs e actina foi confirmada apenas na linhagem de câncer de mama triplo

negativa MDA-MB-231, mas não em células ER<sup>+</sup> MCF-7, suportando a hipótese de que PKCs atuem no remodelamento de microfilamentos de actina e na migração de células MDA-MB-231. Ainda, os ensaios de co-imunoprecipitação mostraram que ambos os anticorpos ligaram-se às subunidades de ribossomos e proteínas associadas à RNAs, o que sugere que as cPKCs podem também estar envolvidas na síntese de algumas proteínas na linhagem MDA-MB-231. A presença de PKC $\beta$ II ativa assim como RACK1 na subunidade ribossomal 40S já foi demonstrada (Grosso, Volta, Sala, et al., 2008; Grosso, Volta, Vietri, et al., 2008; Link et al., 1999). Além disso, foi visto que ativação de PKC $\beta$ II provoca a ligação do complexo PKC $\beta$ II/ RACK1 com ribonucleoproteínas (RNPs) associadas à poliA-mRNAs, sendo que essa quinase passa a fosforilar um grupo específico de RNPs, indicando que a PKC $\beta$ II pode modular a síntese de proteínas (Angenstein et al., 2002). Uma dos mecanismos propostos é que a fosforilação ativa a tradução de mRNAs, por exemplo daqueles codificadores de  $\beta$ -actina, em locais subcelulares específicos. Isso ocorre porque a fosforilação de ZBP1 (*Zipcode-Binding Protein 1*), uma proteína que reprime a tradução de mRNAs durante o seu transporte para locais específicos, determina a liberação e por consequência a tradução de mRNAs codificadores de  $\beta$ -actina (Ceci et al., 2012). Além disso, é bem estabelecido que a fosforilação regula a atividade de eIF6 (*Eukaryotic Initiation Factor 6*) e por consequência a síntese de proteínas (Ceci et al., 2012). Estudos subsequentes poderão determinar se essas proteínas podem ser substratos nas células MDA-MB-231.

Na presente tese, demonstrou-se que a inibição das PKCs acarretou a diminuição na síntese de proteínas recém-sintetizadas em células MDA-MB-231. Em acordo com tais resultados, Grosso e colaboradores, (2008) mostraram que a superexpressão da PKC $\beta$ II em células HeLa levou à associação dessas quinases com ribossomos e um aumento na tradução de proteínas. Ademais, a inibição da atividade de PKC $\beta$ II e de sua interação com RACK1, também provocou uma redução na síntese de proteínas, o que sugere que a PKC $\beta$ II precisa estar ativa para mediar a tradução (Grosso, Volta, Sala, et al., 2008). Adicionalmente, os resultados aqui apresentados, mostram que cPKCs ativas colocalizam com sítios ativos de tradução (contendo proteínas recém-sintetizadas) na periferia de células MDA-MB-231. Estudos mostram que a maquinaria de tradução está localizada em microdomínios de membranas em células com intensa capacidade de migração, como fibroblastos (Willett, Brocard, Davide, & Morley, 2011). Isso indica uma possível participação de cPKCs na síntese de proteínas envolvidas na migração celular, como actina e proteínas que se ligam à actina. Estudos complementares visando a identificação dos mRNAs que se associam com cPKCs ativas deverão ser conduzidos, sendo que proteínas que modulam a motilidade celular, como actina, são possíveis candidatos. Além disso, não podemos excluir a hipótese de que as cPKCs recém sintetizadas, as quais possuem uma conformação relativamente aberta, estão sendo imunoprecitadas pelos anticorpos conformacionais anti-cPKC ativa (A C Newton, 2009).

Os resultados obtidos na presente tese demonstram que estratégias baseadas em mudanças conformacionais sofridas pelas PKCs durante o processo

de ativação foram utilizadas para o desenho racional de dois anticorpos capazes de reconhecer preferencialmente formas ativas das cPKCs. Esses anticorpos foram validados em diversos modelos, apresentando sempre maior afinidade por cPKCs ativas purificadas, endógenas ou provenientes de superexpressão. O anticorpo policlonal anti-C2Cat demonstrou ser uma ferramenta apropriada para monitorar a dinâmica espaço-temporal da ativação de cPKCs independente do processo biológico em estudo ou tipo de estímulo empregado. Ainda, anti-C2Cat demonstrou ser capaz de detectar mais cPKCs ativas em amostras de tecido de câncer de mama triplo-negativas, destacando assim o potencial desse anticorpo para ser utilizado como ferramenta para prognóstico clínico da agressividade do câncer de mama. As aplicações do anticorpo monoclonal 4.8E precisam ser mais bem investigadas, porém os resultados aqui apresentados evidenciam que esse anticorpo, assim como anti-C2Cat, poderá ser utilizados em estudos futuros que visam elucidar as vias de sinalização que levam à carcinogênese, uma vez que o papel das cPKCs no câncer e particularmente nos diferentes subtipos de câncer de mama ainda é controverso.

Uma vez que alterações conformacionais durante a ativação de proteínas são eventos comuns em vias de sinalização, estratégias semelhantes às apresentadas aqui poderão ser utilizadas para o desenvolvimento de anticorpos capazes de reconhecer conformações específicas de outras proteínas. De fato, anticorpos conformacionais para receptores de fatores de crescimento ativos (ligados aos seus ligantes) tem sido explorados como novos anticorpos terapêuticos (Lee et al., 2015).

---

## 6 CONCLUSÕES

- ✓ Durante o desenvolvimento desta tese foi possível elaborar racionalmente estratégias para desenvolver dois anticorpos conformacionais, sendo um policlonal (anti-C2Cat) e outro monoclonal (4.8E).
- ✓ Anti-C2Cat mostrou-se capaz de reconhecer o domínio C2 da PKC $\beta$  e apresentou seletividade por cPKCs ativas. Esse anticorpo foi capaz de imunoprecipitar mais PKC $\beta$ I superexpressa após o estímulo de células HEK293T com PMA comparado a células transfectadas e não ativadas. Ainda, anti-C2Cat foi capaz de monitorar ao longo do tempo a ativação de cPKCs em linhagens de neuroblastoma estimuladas com diferentes compostos;
- ✓ A linhagem de câncer de mama MDA-MB-231 (triplo-negativa) apresentou maior expressão das PKCs  $\alpha$  e  $\beta$ I do que células MCF-7 (ER<sup>+</sup>), ao passo que o mesmo nível de expressão de PKC $\gamma$  e de PKC $\beta$ II foi observado em ambas as linhagens. Verificamos também que as células MDA-MB-231 apresentam maior conteúdo de cPKCs ativas do que células da linhagem MCF-7, sendo que o anticorpo anti-C2Cat foi capaz de detectar esta diferença em níveis de ativação da PKC. Além disso, anti-C2Cat detectou cPKCs ativas na membrana plasmática e região perinuclear das linhagem de câncer de mama. Ainda, anti-C2Cat revelou níveis mais elevados de cPKCs ativas em amostras de tumores de câncer de mama triplos-negativos do que em tumores ER+;
- ✓ O Anticorpo monoclonal 4.8E apresentou maior reatividade por extratos de células transfectadas com PKC $\beta$ I constitutivamente ativa do que PKC $\beta$ I selvagem.

Esse anticorpo também apresentou especificidade por cPKCs ativas e imunoprecipitou preferencialmente formas ativas da PKC $\beta$ I. Ainda, verificamos que o epítipo reconhecido por 4.8E está presente na região V3 ou domínio catalítico das cPKCs;

✓ A aplicação dos anticorpos conformacionais anti-C2Cat e 4.8E para desvendar vias de sinalização em que as cPKCs participam, sugere que estas quinases estão envolvidas no controle da tradução de proteínas envolvidas na migração celular em células MDA-MB-231.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dois anticorpos que reconhecem preferencialmente formas ativas das cPKCs foram produzidos a partir de estratégias baseadas em mudanças conformacionais sofridas pelas PKCs durante o processo de ativação. Esses anticorpos apresentam potencial para diversas aplicações, como monitoramento da dinâmica espaço-temporal da ativação das cPKCs, prognóstico para câncer de mama e estudo das funções das PKCs, por meio da elucidação das vias de sinalização que as cPKCs participam em diferentes processos biológicos. Sugerimos que estratégias baseadas em mudanças conformacionais poderão ser empregadas para o desenvolvimento de anticorpos capazes de reconhecer conformações específicas de outras proteínas.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Angenstein, F., Evans, A. M., Settlage, R. E., Moran, S. T., Ling, S.-C., Klintsova, A. Y., ... Greenough, W. T. (2002). A receptor for activated C kinase is part of messenger ribonucleoprotein complexes associated with polyA-mRNAs in neurons. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(20), 8827–8837. <http://doi.org/22/20/8827> [pii]
- Antal, C. E., Callender, J. A., Kornev, A. P., Taylor, S. S., & Newton, A. C. (2015). Intramolecular C2 Domain-Mediated Autoinhibition of Protein Kinase C  $\beta$ II. *Cell Reports*, 12(8), 1252–1260. <http://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.07.039>
- Antal, C. E., Hudson, A. M., Kang, E., Zanca, C., Wirth, C., Stephenson, N. L., ... Newton, A. C. (2015). Cancer-associated protein kinase C mutations reveal kinase's role as tumor suppressor. *Cell*, 160(3), 489–502. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.001>
- Bae, Y. K., Choi, J. E., Kang, S. H., & Lee, S. J. (2015). Epithelial-Mesenchymal Transition Phenotype Is Associated with Clinicopathological Factors That Indicate Aggressive Biological Behavior and Poor Clinical Outcomes in Invasive Breast Cancer. *Journal of Breast Cancer*, 18(3), 256–63. <http://doi.org/10.4048/jbc.2015.18.3.256>
- Balafanova, Z. (2002). Nitric Oxide (NO) Induces Nitration of Protein Kinase Cepsilon (PKCepsilon ), Facilitating PKCepsilon Translocation via Enhanced PKCepsilon -RACK2 Interactions. A NOVEL MECHANISM OF NO-TRIGGERED ACTIVATION OF PKCepsilon. *Journal of Biological Chemistry*, 277(17), 15021–15027. <http://doi.org/10.1074/jbc.M112451200>
- Balendran, A., Hare, G. R., Kieloch, A., Williams, M. R., & Alessi, D. R. (2000). Further evidence that 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) is required for the stability and phosphorylation of protein kinase C (PKC) isoforms. *FEBS Letters*, 484, 217–223. [http://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)02162-1](http://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)02162-1)
- Banci, L., Cavallaro, G., Kheifets, V., & Mochly-Rosen, D. (2002). Molecular dynamics characterization of the C2 domain of protein kinase Cbeta. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(15), 12988–12997. <http://doi.org/10.1074/jbc.M106875200>
- Bass, M. D., Roach, K. A., Morgan, M. R., Mostafavi-pour, Z., Schoen, T., Muramatsu, T., ... Humphries, M. J. (2007). Syndecan-4-dependent Rac1 regulation determines directional migration in response to the extracellular matrix. *Development*, 134(3), 527–538. <http://doi.org/10.1083/jcb.200610076>
- Behn-Krappa, A., & Newton, A. C. (1999). The hydrophobic phosphorylation motif of conventional protein kinase C is regulated by autophosphorylation. *Current Biology : CB*, 9(14), 728–37. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10421574>
- BLOOM, H. J., & RICHARDSON, W. W. (1957). Histological grading and prognosis

- in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *British Journal of Cancer*, 11(3), 359–77.  
<http://doi.org/10.1038/bjc.1957.43>
- Boyle, G. M., D'Souza, M. M. A., Pierce, C. J., Adams, R. A., Cantor, A. S., Johns, J. P., ... Parsons, P. G. (2014). Intra-lesional injection of the novel PKC activator EBC-46 rapidly ablates tumors in mouse models. *PloS One*, 9(10), e108887. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0108887>
- Castagna, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Sano, K., Kikkawa, U., & Nishizuka, Y. (1982). Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *The Journal of Biological Chemistry*, 257(13), 7847–51. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7085651>
- Ceci, M., Welshhans, K., Ciotti, M. T., Brandi, R., Parisi, C., Paoletti, F., ... Cattaneo, A. (2012). RACK1 Is a Ribosome Scaffold Protein for  $\beta$ -actin mRNA/ZBP1 Complex. *PLoS ONE*, 7(4), e35034. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0035034>
- Chen, D., Gould, C., Garza, R., Gao, T., Hampton, R. Y., & Newton, A. C. (2007). Amplitude control of protein kinase C by RINCK, a novel E3 ubiquitin ligase. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(46), 33776–33787. <http://doi.org/10.1074/jbc.M703320200>
- Chen, J.-Y., Lin, J.-R., Cimprich, K. A., & Meyer, T. (2012). A two-dimensional ERK-AKT signaling code for an NGF-triggered cell-fate decision. *Molecular Cell*, 45(2), 196–209. <http://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.11.023>
- Chen, L., Hahn, H., Wu, G., Chen, C. H., Liron, T., Schechtman, D., ... Mochly-Rosen, D. (2001). Opposing cardioprotective actions and parallel hypertrophic effects of delta PKC and epsilon PKC. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(20), 11114–11119. <http://doi.org/10.1073/pnas.191369098>
- Churchill, E. N., Qvit, N., & Mochly-Rosen, D. (2010). NIH Public Access. *Trends Endocrinol Metab.*, 20(1), 25–33. <http://doi.org/10.1016/j.tem.2008.10.002>. Rationally
- Clark, G. J., & Der, C. J. (1995). Aberrant function of the Ras signal transduction pathway in human breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 35(1), 133–44. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7612899>
- Cleator, S., Heller, W., & Coombes, R. C. (2007). Triple-negative breast cancer: therapeutic options. *The Lancet. Oncology*, 8(3), 235–44. [http://doi.org/10.1016/S1470-2045\(07\)70074-8](http://doi.org/10.1016/S1470-2045(07)70074-8)
- Cohen, P. (2000). The regulation of protein function by multisite phosphorylation – a 25 year update. *Trends in Biochemical Sciences*, 25(12), 596–601. [http://doi.org/10.1016/S0968-0004\(00\)01712-6](http://doi.org/10.1016/S0968-0004(00)01712-6)
- Costa-Junior, H. M., Suetsugu, M. J., Krieger, J. E., & Schechtman, D. (2009).



- Specific modulation of protein kinase activity via small peptides. *Regulatory Peptides*, 153(1-3), 11–8. <http://doi.org/10.1016/j.regpep.2008.12.002>
- Csukai, M., Chen, C. H., Matteis, M. a, Mochly-Rosen, D., & De Matteis, M. A. (1997). The coatomer protein beta'-COP, a selective binding protein (RACK) for protein kinase Cepsilon. *J Biol Chem*, 272(46), 29200–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9360998>
- Disatnik, M. H., Buraggi, G., & Mochly-Rosen, D. (1994). Localization of protein kinase C isozymes in cardiac myocytes. *Experimental Cell Research*, 210(2), 287–97. <http://doi.org/10.1006/excr.1994.1041>
- Ebisuya, M. (2005). The duration, magnitude and compartmentalization of ERK MAP kinase activity: mechanisms for providing signaling specificity. *Journal of Cell Science*, 118(14), 2997–3002. <http://doi.org/10.1242/jcs.02505>
- Emoto, Y., Manome, Y., Meinhardt, G., Kisaki, H., Kharbanda, S., Robertson, M., ... Weichselbaum, R. (1995). Proteolytic activation of protein kinase C delta by an ICE-like protease in apoptotic cells. *The EMBO Journal*, 14(24), 6148–6156.
- Fabbro, D., Küng, W., Roos, W., Regazzi, R., & Eppenberger, U. (1986). Epidermal growth factor binding and protein kinase C activities in human breast cancer cell lines: possible quantitative relationship. *Cancer Research*, 46(6), 2720–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3008998>
- Gao, T., Brognard, J., & Newton, A. C. (2008). The phosphatase PHLPP controls the cellular levels of protein kinase C. *Journal of Biological Chemistry*, 283(10), 6300–6311. <http://doi.org/10.1074/jbc.M707319200>
- Gao, T., & Newton, A. C. (2006). Invariant Leu Preceding Turn Motif Phosphorylation Site Controls the Interaction of Protein Kinase C with Hsp70. *Journal of Biological Chemistry*, 281(43), 32461–32468. <http://doi.org/10.1074/jbc.M604076200>
- Garg, R., Benedetti, L. G., Abera, M. B., Wang, H., Abba, M., & Kazanietz, M. G. (2014). Protein kinase C and cancer: what we know and what we do not. *Oncogene*, 33(45), 5225–37. <http://doi.org/10.1038/onc.2013.524>
- Gautreau, A., Louvard, D., & Arpin, M. (2000). Morphogenic effects of ezrin require a phosphorylation-induced transition from oligomers to monomers at the plasma membrane. *Journal of Cell Biology*, 150(1), 193–203. <http://doi.org/10.1083/jcb.150.1.193>
- Giorgione, J. R., Lin, J.-H., McCammon, J. A., & Newton, A. C. (2006). Increased membrane affinity of the C1 domain of protein kinase Cdelta compensates for the lack of involvement of its C2 domain in membrane recruitment. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(3), 1660–9. <http://doi.org/10.1074/jbc.M510251200>
- Gopalakrishna, R., & Jaken, S. (2000). Protein kinase C signaling and oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine*, 28(9), 1349–1361.

- [http://doi.org/16/S0891-5849\(00\)00221-5](http://doi.org/16/S0891-5849(00)00221-5)
- Gould, C., & Newton, A. (2008). Autophosphorylation of Protein Kinase C Facilitates its Ubiquitination and Down-regulation. *FASEB J*, 22(1\_MeetingAbstracts), 1048.4–. Retrieved from [http://www.fasebj.org/cgi/content/meeting\\_abstract/22/1\\_MeetingAbstracts/1048.4](http://www.fasebj.org/cgi/content/meeting_abstract/22/1_MeetingAbstracts/1048.4)
- Graybill, C., Wee, B., Atwood, S. X., & Prehoda, K. E. (2012). Partitioning-defective Protein 6 (Par-6) Activates Atypical Protein Kinase C (aPKC) by Pseudosubstrate Displacement. *Journal of Biological Chemistry*, 287(25), 21003–21011. <http://doi.org/10.1074/jbc.M112.360495>
- Gresset, A., & Harden, T. K. (2012). *Phosphoinositides I: Enzymes of Synthesis and Degradation* (Vol. 58). <http://doi.org/10.1007/978-94-007-3012-0>
- Griner, E. M., & Kazanietz, M. G. (2007). Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 7(4), 281–94. <http://doi.org/10.1038/nrc2110>
- Grosso, S., Volta, V., Sala, L. a, Vietri, M., Marchisio, P. C., Ron, D., & Biffo, S. (2008). PKC $\beta$ 1 modulates translation independently from mTOR and through RACK1. *The Biochemical Journal*, 415(1), 77–85. <http://doi.org/10.1042/BJ20080463>
- Grosso, S., Volta, V., Vietri, M., Gorrini, C., Marchisio, P. C., & Biffo, S. (2008). Eukaryotic ribosomes host PKC activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 376(1), 65–69. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.08.118>
- Harden, T. K., & Sondek, J. (2006). Regulation of phospholipase C isozymes by ras superfamily GTPases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 46, 355–79. <http://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.46.120604.141223>
- Hernandez, a. I., Blace, N., Crary, J. F., Serrano, P. a., Leitges, M., Libien, J. M., ... Sacktor, T. C. (2003). Protein kinase M zeta synthesis from a brain mRNA encoding an independent protein kinase C zeta catalytic domain. Implications for the molecular mechanism of memory. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(41), 40305–40316. <http://doi.org/10.1074/jbc.M307065200>
- Hommel, U., Zurini, M., & Luyten, M. (1994). Solution structure of a cysteine rich domain of rat protein kinase C. *Nature Structural Biology*, 1(6), 383–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7664052>
- Humphries, B., Wang, Z., Oom, A. L., Fisher, T., Tan, D., Cui, Y., ... Yang, C. (2014). MicroRNA-200b targets protein kinase C $\alpha$  and suppresses triple-negative breast cancer metastasis. *Carcinogenesis*, 00(00), 1–10. <http://doi.org/10.1093/carcin/bgu133>
- Ikenoue, T., Inoki, K., Yang, Q., Zhou, X., & Guan, K.-L. (2008). Essential function of TORC2 in PKC and Akt turn motif phosphorylation, maturation and signalling. *The EMBO Journal*, 27(14), 1919–1931.

<http://doi.org/10.1038/emboj.2008.146>

- Inoue, M., Kishimoto, A., Takai, Y., & Nishizuka, Y. (1977). Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. II. Proenzyme and its activation by calcium-dependent protease from rat brain. *The Journal of Biological Chemistry*, 252(21), 7610–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/199594>
- Jones, M. L., Craik, J. D., Gibbins, J. M., & Poole, A. W. (2004). Regulation of SHP-1 tyrosine phosphatase in human platelets by serine phosphorylation at its C terminus. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(39), 40475–83. <http://doi.org/10.1074/jbc.M402970200>
- Kaibuchi, K., Takai, Y., & Nishizuka, Y. (1981). Cooperative roles of various membrane phospholipids in the activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 256(14), 7146–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7251589>
- Kazanietz, M. G., Krausz, K. W., & Blumberg, P. M. (1992). Differential irreversible insertion of protein kinase C into phospholipid vesicles by phorbol esters and related activators. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(29), 20878–86. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1400402>
- Kemp, B. E., Pearson, R. B., & House, C. M. (1991). Pseudosubstrate-based peptide inhibitors. *Methods in Enzymology*, 201, 287–304. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1943770>
- Keranen, L. M., Dutil, E. M., & Newton, a. C. (1995). Protein kinase C is regulated in vivo by three functionally distinct phosphorylations. *Current Biology*, 5(12), 1394–1403. [http://doi.org/10.1016/S0960-9822\(95\)00277-6](http://doi.org/10.1016/S0960-9822(95)00277-6)
- Keshamouni, V. G., Mattingly, R. R., & Reddy, K. B. (2002). Mechanism of 17-beta-estradiol-induced Erk1/2 activation in breast cancer cells. A role for HER2 AND PKC-delta. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(25), 22558–65. <http://doi.org/10.1074/jbc.M202351200>
- Kobe, B., & Kemp, B. E. (1999). Active site-directed protein regulation. *Nature*, 402(6760), 373–6. <http://doi.org/10.1038/46478>
- Kraft, A. S., & Anderson, W. B. (1983). Phorbol esters increase the amount of Ca<sup>2+</sup>, phospholipid-dependent protein kinase associated with plasma membrane. *Nature*, 301(5901), 621–3. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6828143>
- Krieger, E., Darden, T., Nabuurs, S. B., Finkelstein, A., & Vriend, G. (2004). Making optimal use of empirical energy functions: force-field parameterization in crystal space. *Proteins*, 57(4), 678–83. <http://doi.org/10.1002/prot.20251>
- LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685. <http://doi.org/10.1038/227680a0>

- Laurinaviciene, A., Plancoulaine, B., Baltrusaityte, I., Meskauskas, R., Besusparis, J., Lesciute-Krilaviciene, D., ... Laurinavicius, A. (2014). Digital immunohistochemistry platform for the staining variation monitoring based on integration of image and statistical analyses with laboratory information system. *Diagnostic Pathology*, 9 Suppl 1, S10. <http://doi.org/10.1186/1746-1596-9-S1-S10>
- Lee, S., Greenlee, E. B., Amick, J. R., Ligon, G. F., Lillquist, J. S., Natoli, E. J., ... Schlessinger, J. (2015). Inhibition of ErbB3 by a monoclonal antibody that locks the extracellular domain in an inactive configuration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(43), 13225–30. <http://doi.org/10.1073/pnas.1518361112>
- Leonard, T. A., Różycki, B., Saidi, L. F., Hummer, G., & Hurley, J. H. (2011). Crystal Structure and Allosteric Activation of Protein Kinase C  $\beta$ II. *Cell*, 144(1), 55–66. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2010.12.013>
- Link, A. J., Eng, J., Schieltz, D. M., Carmack, E., Mize, G. J., Morris, D. R., ... Yates, J. R. (1999). Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nature Biotechnology*, 17(7), 676–82. <http://doi.org/10.1038/10890>
- Lonne, G. K., Cornmark, L., Zahirovic, I. O., Landberg, G., Jirström, K., & Larsson, C. (2010). PKC $\alpha$  expression is a marker for breast cancer aggressiveness. *Molecular Cancer*, 9, 76. <http://doi.org/10.1186/1476-4598-9-76>
- Makowske, M., & Rosen, O. M. (1989). Complete activation of protein kinase C by an antipeptide antibody directed against the pseudosubstrate prototope. *The Journal of Biological Chemistry*, 264(27), 16155–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2777783>
- Mandell, J. W. (2003). Phosphorylation state-specific antibodies: applications in investigative and diagnostic pathology. *The American Journal of Pathology*, 163(5), 1687–98. [http://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63525-0](http://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63525-0)
- Marshall, C. J. (1995). Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell*, 80(2), 179–85. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7834738>
- Martiny-Baron, G., & Fabbro, D. (2007). Classical PKC isoforms in cancer. *Pharmacological Research : The Official Journal of the Italian Pharmacological Society*, 55(6), 477–86. <http://doi.org/10.1016/j.phrs.2007.04.001>
- Medzihradszky, K. F. (2005). In-solution digestion of proteins for mass spectrometry. *Methods in Enzymology*, 405(05), 50–65. [http://doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)05003-2](http://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)05003-2)
- Messerschmidt, A., Macieira, S., Velarde, M., Bädeker, M., Benda, C., Jestel, A., ... Blaesse, M. (2005). Crystal structure of the catalytic domain of human atypical protein kinase C- $\iota$  reveals interaction mode of phosphorylation site

- in turn motif. *Journal of Molecular Biology*, 352(4), 918–31.  
<http://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.07.060>
- Mochly-Rosen, D. (1995). Localization of protein kinases by anchoring proteins: a theme in signal transduction. *Science (New York, N.Y.)*, 268(5208), 247–51.  
<http://doi.org/10.2307/2886685>
- Mochly-Rosen, D., Das, K., & Grimes, K. V. (2012a). Protein kinase C, an elusive therapeutic target? *Nature Reviews. Drug Discovery*, 11(12), 937–57.  
<http://doi.org/10.1038/nrd3871>
- Mochly-Rosen, D., Das, K., & Grimes, K. V. (2012b). Protein kinase C, an elusive therapeutic target? *Nature Reviews Drug Discovery*, 11(12), 937–957.  
<http://doi.org/10.1038/nrd3871>
- Mochly-Rosen, D., & Gordon, a S. (1998). Anchoring proteins for protein kinase C: a means for isozyme selectivity. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 12(1), 35–42.  
 Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9438408>
- Mochly-Rosen, D., Khaner, H., & Lopez, J. (1991). Identification of intracellular receptor proteins for activated protein kinase C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(9), 3997–4000.  
 Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=51580&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Montenegro, M., Garcia-Viloca, M., González-Lafont, A., & Lluch, J. M. (2007). Comparative study of the prereactive protein kinase A Michaelis complex with kemptide substrate. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 21(10-11), 603–15. <http://doi.org/10.1007/s10822-007-9143-x>
- Moscat, J., Diaz-Meco, M. T., Albert, A., & Campuzano, S. (2006). Cell signaling and function organized by PB1 domain interactions. *Molecular Cell*, 23(5), 631–40. <http://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.08.002>
- Mosior, M., & Newton, A. C. (1996). Calcium-independent binding to interfacial phorbol esters causes protein kinase C to associate with membranes in the absence of acidic lipids. *Biochemistry*, 35(5), 1612–23.  
<http://doi.org/10.1021/bi952031q>
- Newton, A. C. (1995). Protein Kinase C: Structure, Function, and Regulation. *Journal of Biological Chemistry*, 270(48), 28495–28498.  
<http://doi.org/10.1074/jbc.270.48.28495>
- Newton, A. C. (2003). Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm. *The Biochemical Journal*, 370(Pt 2), 361–71.  
<http://doi.org/10.1042/BJ20021626>
- Newton, A. C. (2009). Lipid activation of protein kinases. *J Lipid Res*, 50 Suppl, S266–71. <http://doi.org/R800064-JLR200> [pii]r10.1194/jlr.R800064-JLR200

- Newton, A. C. (2010). Protein kinase C: poised to signal. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 298(3), E395–E402. <http://doi.org/10.1152/ajpendo.00477.2009>
- Ng, T., Parsons, M., Hughes, W. E., Monypenny, J., Zicha, D., Gautreau, A., ... Parker, P. J. (2001). Ezrin is a downstream effector of trafficking PKC-integrin complexes involved in the control of cell motility. *The EMBO Journal*, 20(11), 2723–41. <http://doi.org/10.1093/emboj/20.11.2723>
- Nishizuka, Y. (1988). The heterogeneity and differential expression of multiple species of the protein kinase C family. *BioFactors (Oxford, England)*, 1(1), 17–20. Retrieved from <http://europepmc.org/abstract/MED/3076428>
- Ochoa, W. F., Garcia-Garcia, J., Fita, I., Corbalan-Garcia, S., Verdaguer, N., & Gomez-Fernandez, J. C. (2001). Structure of the C2 domain from novel protein kinase Cepsilon. A membrane binding model for Ca(2+)-independent C2 domains. *Journal of Molecular Biology*, 311(4), 837–49. <http://doi.org/10.1006/jmbi.2001.4910>
- Ono, Y., Kikkawa, U., Ogita, K., Fujii, T., Kurokawa, T., Asaoka, Y., ... Nishizuka, Y. (1987). Expression and properties of two types of protein kinase C: alternative splicing from a single gene. *Science (New York, N.Y.)*, 236(4805), 1116–20. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3576226>
- Pappa, H., Murray-Rust, J., Dekker, L. V, Parker, P. J., & McDonald, N. Q. (1998). Crystal structure of the C2 domain from protein kinase C-delta. *Structure (London, England : 1993)*, 6(7), 885–94. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9687370>
- Payne, D. M., Rossomando, A. J., Martino, P., Erickson, A. K., Her, J. H., Shabanowitz, J., ... Sturgill, T. W. (1991). Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). *The EMBO Journal*, 10(4), 885–92. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=452730&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Pears, C. J., Kour, G., House, C., Kemp, B. E., & Parker, P. J. (1990). Mutagenesis of the pseudosubstrate site of protein kinase C leads to activation. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 194, 89–94. <http://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1990.tb19431.x>
- Prabakaran, S., Lippens, G., Steen, H., & Gunawardena, J. (2012). Post-translational modification: nature's escape from genetic imprisonment and the basis for dynamic information encoding. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Systems Biology and Medicine*, 4(6), 565–83. <http://doi.org/10.1002/wsbm.1185>
- Reyland, M. E. (2009). Protein kinase C isoforms: Multi-functional regulators of cell life and death. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 14, 2386–99. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19273207>

- Ron, D., Chen, C. H., Caldwell, J., Jamieson, L., Orr, E., & Mochly-Rosen, D. (1994). Cloning of an intracellular receptor for protein kinase C: a homolog of the beta subunit of G proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(3), 839–43. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=521407&tool=pmc.ncbi&rendertype=abstract>
- Ron, D., Luo, J., & Mochly-Rosen, D. (1995). C2 region-derived peptides inhibit translocation and function of beta protein kinase C in vivo. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(41), 24180–24187. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7592622>
- Ron, D., & Mochly-Rosen, D. (1995). An autoregulatory region in protein kinase C: the pseudoanchoring site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(2), 492–6. <http://doi.org/10.1073/pnas.92.2.492>
- Saito, S., Yamamoto, H., Mukaisho, K., Sato, S., Higo, T., Hattori, T., ... Sugihara, H. (2013). Mechanisms Underlying Cancer Progression Caused by Ezrin Overexpression in Tongue Squamous Cell Carcinoma. *PLoS ONE*, 8(1), e54881. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0054881>
- Sakai, N., Sasaki, K., Ikegaki, N., Shirai, Y., Ono, Y., & Saito, N. (1997). Direct visualization of the translocation of the gamma-subspecies of protein kinase C in living cells using fusion proteins with green fluorescent protein. *The Journal of Cell Biology*, 139(6), 1465–76. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2132627&tool=pmc.ncbi&rendertype=abstract>
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F. & MANIATIS, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. (2<sup>a</sup> ed.). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sando, J. J., Beals, J. K., & Hussaini, I. M. (2003). Subcellular Translocation of Protein Kinase C. In *Methods in Molecular Biology - Protein Kinase C: Protocols* (pp. 77–85).
- Schechtman, D., Craske, M. L., Kheifets, V., Meyer, T., Schechtman, J., & Mochly-Rosen, D. (2004). A Critical Intramolecular Interaction for Protein Kinase C?? Translocation. *Journal of Biological Chemistry*, 279(16), 15831–15840. <http://doi.org/10.1074/jbc.M310696200>
- Schechtman, D., & Mochly-Rosen, D. (2001). Adaptor proteins in protein kinase C-mediated signal transduction. *Oncogene*, 20(44), 6339–47. <http://doi.org/10.1038/sj.onc.1204778>
- Schechtman, D., & Mochly-Rosen, D. (2002). Isozyme-specific inhibitors and activators of protein kinase C. *Methods in Enzymology*, 345, 470–89. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11665630>
- Schechtman, D., Murriel, C., Bright, R., & Mochly-Rosen, D. (2003). Overlay method for detecting protein-protein interactions. *Methods in Molecular*

- Biology (Clifton, N.J.)*, 233, 351–7. <http://doi.org/10.1385/1-59259-397-6:351>
- Shirai, Y., Kashiwagi, K., Yagi, K., Sakai, N., & Saito, N. (1998). Distinct effects of fatty acids on translocation of gamma- and epsilon-subspecies of protein kinase C. *The Journal of Cell Biology*, 143(2), 511–521. <http://doi.org/10.1083/jcb.143.2.511>
- Souroujon, M. C., Yao, L., Chen, H., Endemann, G., Khaner, H., Geeraert, V., ... Mochly-Rosen, D. (2004). State-specific monoclonal antibodies identify an intermediate state in epsilon protein kinase C activation. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(17), 17617–24. <http://doi.org/10.1074/jbc.M400962200>
- Stebbins, E. G., & Mochly-Rosen, D. (2001). Binding specificity for RACK1 resides in the V5 region of beta II protein kinase C. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(32), 29644–50. <http://doi.org/10.1074/jbc.M101044200>
- Steinberg, S. F. (2008). Structural Basis of Protein Kinase C Isoform Function, 1341–1378. <http://doi.org/10.1152/physrev.00034.2007>.
- Steinberg, S. F. (2010). NIH Public Access, 88(4), 1341–1378. <http://doi.org/10.1152/physrev.00034.2007.Structural>
- Sutton, R. B., & Sprang, S. R. (1998). Structure of the protein kinase C beta phospholipid-binding C2 domain complexed with Ca<sup>2+</sup>. *Structure (London, England : 1993)*, 6(11), 1395–405. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9817842>
- Takai, Y., Kishimoto, A., Inoue, M., & Nishizuka, Y. (1977). Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. I. Purification and characterization of an active enzyme from bovine cerebellum. *The Journal of Biological Chemistry*, 252(21), 7603–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/199593>
- Takai, Y., Yamamoto, M., Inoue, M., Kishimoto, A., & Nishizuka, Y. (1977). A proenzyme of cyclic nucleotide-independent protein kinase and its activation by calcium-dependent neutral protease from rat liver. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 77(2), 542–50. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/901486>
- Taylor, S. S., Keshwani, M. M., Steichen, J. M., & Kornev, A. P. (2012). Evolution of the eukaryotic protein kinases as dynamic molecular switches. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 367(1602), 2517–2528. <http://doi.org/10.1098/rstb.2012.0054>
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., & Ross, J. (1995). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 59(3), 423–450. <http://doi.org/10.1002/bies.950190612>
- Ubersax, J. A., & Ferrell, J. E. (2007). Mechanisms of specificity in protein



- phosphorylation. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 8(7), 530–41.  
<http://doi.org/10.1038/nrm2203>
- Urtreger, A. J., Kazanietz, M. G., & Bal de Kier Joffé, E. D. (2012). Contribution of individual PKC isoforms to breast cancer progression. *IUBMB Life*, 64(1), 18–26. <http://doi.org/10.1002/iub.574>
- Verdaguer, N., Corbalan-Garcia, S., Ochoa, W. F., Fita, I., & Gómez-Fernández, J. C. (1999). Ca(2+) bridges the C2 membrane-binding domain of protein kinase C $\alpha$  directly to phosphatidylserine. *The EMBO Journal*, 18(22), 6329–38. <http://doi.org/10.1093/emboj/18.22.6329>
- Violin, J. D., Zhang, J., Tsien, R. Y., & Newton, A. C. (2003). A genetically encoded fluorescent reporter reveals oscillatory phosphorylation by protein kinase C. *The Journal of Cell Biology*, 161(5), 899–909. <http://doi.org/10.1083/jcb.200302125>
- Violin, J., & Newton, A. (2003). Pathway Illuminated: Visualizing Protein Kinase C Signaling. *IUBMB Life (International Union of Biochemistry and Molecular Biology: Life)*, 55(12), 653–660. <http://doi.org/10.1080/152165401310001642216>
- Weitsman, G., Lawler, K., Kelleher, M. T., Barrett, J. E., Barber, P. R., Shamil, E., ... Ng, T. (2014). Imaging tumour heterogeneity of the consequences of a PKC $\alpha$ -substrate interaction in breast cancer patients. *Biochemical Society Transactions*, 42(6), 1498–505. <http://doi.org/10.1042/BST20140165>
- Willett, M., Brocard, M., Davide, A., & Morley, S. J. (2011). Translation initiation factors and active sites of protein synthesis co-localize at the leading edge of migrating fibroblasts. *The Biochemical Journal*, 438, 217–227. <http://doi.org/10.1042/BJ20110435>
- Wu-Zhang, A. X., & Newton, A. C. (2013). Protein kinase C pharmacology: refining the toolbox. *The Biochemical Journal*, 452(2), 195–209. <http://doi.org/10.1042/BJ20130220>
- Xu, Z.-B., Chaudhary, D., Olland, S., Wolfrom, S., Czerwinski, R., Malakian, K., ... Mosyak, L. (2004). Catalytic domain crystal structure of protein kinase C- $\theta$  (PKC $\theta$ ). *The Journal of Biological Chemistry*, 279(48), 50401–9. <http://doi.org/10.1074/jbc.M409216200>
- Yokoyama, W. M., Christensen, M., Santos, G. Dos, Miller, D., Ho, J., Wu, T., ... Neethling, F. A. (2013). Production of Monoclonal Antibodies. *Current Protocols in Immunology*, (August), 2.5.1–2.5.29. <http://doi.org/10.1002/0471142735.im0205s102>
- Zhang, G., Kazanietz, M. G., Blumberg, P. M., & Hurley, J. H. (1995). Crystal structure of the cys2 activator-binding domain of protein kinase C delta in complex with phorbol ester. *Cell*, 81(6), 917–24. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7781068>

## 9 ANEXOS

### 9.1 SÚMULA CURRICULAR

#### DADOS PESSOAIS

Nome: Darlene Aparecida Pena

Local e data de nascimento: Alvinópolis (Minas Gerais) no dia 23/10/1984

#### EDUCAÇÃO

✓ Doutorado *stricto sensu* em Bioquímica, com projeto de tese intitulado “Desenvolvimento de anticorpos conformacionais contra Proteínas Quinases C e suas aplicações” sendo desenvolvido no Laboratório de Bioquímica da Sinalização Celular do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, sob orientação da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Deborah Schechtman. Estágio de pesquisa no exterior realizado no Mount Sinai Hospital (Department of Pharmacology and Systems Therapeutics – Nova York/EUA) sob o período de outubro de 2014 a agosto de 2015 sob orientação da prof. Dr<sup>a</sup> Lakshmi Devi. Início em 2011 e conclusão em 2016.

✓ Mestrado *stricto sensu* em Biotecnologia, com dissertação intitulada “Caracterização biológica e celular cepas de *Trypanosoma cruzi* isoladas durante o surto de doença de Chagas Aguda”, desenvolvido no Laboratório de Protozoologia do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal de Santa Catarina, sob orientação do Prof. Dr. Mário Steindel. Início em 2008 e conclusão em 2010.

✓ Graduação modalidade bacharelado em Bioquímica pela Universidade Federal de Viçosa. Realização de Iniciação Científica no laboratório de Genética de Microrganismos do Departamento de Microbiologia e com projeto intitulado “Análise da Diversidade Genética de isolados de *Pisolithus* spp. por meio de PCR-RFLP, BOX-PCR e ERIC-PCR”, sob orientação da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Elza Fernandes de Araújo. Início em 2003 e conclusão em 2007.

---

## FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

✓ Monitoria junto à disciplina Bioquímica: **Metabolismo e Biologia Molecular (QBQ0230 Diurno) para o curso de graduação em Biologia** pelo Programa de Aperfeiçoamento do Ensino (PAE). As atividades foram realizadas sob supervisão dos professores Dr. Maurício Baptista e Dr. Walter Ribeiro Terra do Departamento de Bioquímica – USP, no período de agosto de 2013 a dezembro de 2013.

✓ Monitoria junto à disciplina Bioquímica: **Metabolismo e Biologia Molecular (QBQ0314 Diurno) para o curso de graduação em Nutrição** pelo Programa de Aperfeiçoamento do Ensino (PAE). As atividades foram realizadas sob supervisão da prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Deborah Schechtman do Departamento de Bioquímica – USP, no período de agosto de 2012 a dezembro de 2012.

✓ Organização do VII Curso de Verão Teórico/Prático em Bioquímica e Biologia Molecular, onde **ministrou aulas teóricas e práticas** no Departamento de Bioquímica – USP, no período de 09 a 20 de janeiro de 2012.

✓ Organização do VI Curso de Inverno Temas Avançados de Bioquímica e Biologia Molecular, onde **ministrou aulas teóricas e práticas** no Departamento de Bioquímica – USP, no período de 04 a 15 de julho de 2011.

✓ **Monitor nível I da disciplina Biologia Celular (BIO 111) para vários cursos de graduação**, oferecida pelo Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa. As atividades foram realizadas sob supervisão da prof<sup>a</sup> Sílvia das Graças Pompolo, no período de março de 2005 a dezembro de 2005.

## PUBLICAÇÕES (Artigos Completos)

1. **PENA, D.A.**; ANDRADE, V.P.; SILVA, G.A.F; NEVES, J.I.; BARROSO, I.G.; OLIVEIRA, P.; ALVES, M.J.M.; DEVI, L.A.; SCHECHTMAN, D. Rational design and validation of an anti-protein kinase C activation specific antibody based on

conformational changes. **Paper em fase de análise na revista Scientific Reports do grupo Nature.**

2. OLIVEIRA, P.; FERRAZ, F.; **PENA, D.A.**; SCHECHTMAN, D. Revisiting Protein kinase Substrate Interactions: What we have learned and where we can go from here. **Paper de revisão em fase de análise na Science Signaling do grupo Science.**

3. \*DUARTE, M. L.; \***PENA, D. A.** ; \*NUNES FERRAZ, F. A. ; BERTI, D. A.; PASCHOAL SOBREIRA, T. J. ; COSTA-JUNIOR, H. M. ; ABDEL BAQUI, M. M.; DISATNIK, M.H.; Xavier-Neto, J. ; LOPES DE OLIVEIRA, P. S. ; Schechtman, D. Protein folding creates structure-based, noncontiguous consensus phosphorylation motifs recognized by kinases. *Science Signaling*, v. 7, p. 1-8, 2014. *\*Contribuição igualitária no desenvolvimento do trabalho. Pesquisa foi divulgada como capa da revista Science Signaling do grupo Science.*

4. GARAVELLO, N.M.; **PENA, D.A.**; BONATTO, J.M.C.; DUARTE, M.L.; COSTA-JUNIOR, H.M.; SCHUMACHER, R.I.; FORTI, F.L.; SCHECHTMAN, D. Activation of protein kinase C delta by  $\psi\delta$ RACK peptide promotes embryonic stem cell proliferation through ERK 1/2. *Journal of Proteomics (Print)*, v. 94, p. 497-512, 2013.

5. **PENA, D. A.**; EGER, I.; NOGUEIRA, L.; HECK, N.; MENIN, A.; BAFICA, A.; STEINDEL, M. Selection of TcII *Trypanosoma cruzi* Population Following Macrophage Infection. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 204, p. 478-486, 2011.

6. CAMELINI, C.M.; **PENA, D. A.**; GOMES, A.; STEINDEL, M.; ROSSI, M.J.; GIACHINI, A.J.; MENDONÇA, M.M. An efficient technique for *in vitro* preservation of *Agaricus subrufescens* (=A. *brasiliensis*). *Annals of Microbiology*, v.62, p.1279-1285, 2011.

7. ARAUJO, R. R.; PENA, L. J.; **PENA, D. A.**; DIAS, F. M.; MORAES, M. P. Ocorrência de Anticorpos anti-Brucella spp. em equídeos da Região da Zona da Mata de Minas gerais, Brasil. *Arquivos do Instituto Biológico (Online)*, v. 76, p. 681-684, 2009

8. BARRIOS, P. R. ; MORAES, M. P. ; SANTOS, B. M. ; SOUZA, F. O. ; PENA, L. J.; **PENA, D. A.** ; NEVES, C. A. ; ALMEIDA, M. R. ; GOMEZ, S. Y. M. Comparison of pathogenicity in IBDV isolates in embryonic eggs. *World's Poultry Science Journal*, v. 66, p. 1-4, 2009.

9. COSTA, P. R. S. ; CONCEICAO, L. G. ; MORAES, M. P. ; TSIOMIS, A. ; PRADO, R. F. S. ; PENA, L. J. ; BARRIOS, P. R. ; **PENA, D. A.** Gengivite/Estomatite Linfocítico-plasmocitárias em Gatos - Relato de Quatro Casos. *Clínica Veterinária (São Paulo)*, p. 28-34, 2007.

10. PENA, L. J. ; **PENA, D. A.** ; BARRIOS, P. R. ; DALE, R. ; ALMEIDA, M. R. ; MORAES, M. P. . Levantamento soro-epidemiológico da infecção pelo vírus da Anemia Infecciosa Equina, da Influenza Eqüina-2 e do Herpesvírus Eqüino-1 em rebanhos do sul do Estado do Pará, Brasil. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science (Impresso), v. 43, p. 537-542, 2006.

#### **PUBLICAÇÕES** (Resumos em Congressos)

1. **PENA, D.A.**; ANDRADE, V.P.; SILVA, G.A.F.; NEVES, J.I., ALVES, M.J.M.; DEVI, L.A.; SCHECHTMAN, D. Activation specific antibody based on conformational changes in classical protein kinase C: development and validation. In: Annual Meeting of American Society for Cell Biology. 2015, San Diego.
2. **PENA, D. A.** ; Alves MJM ; Schechtman, D. Development of antibodies that recognize active cPKCs Darlene Aparecida Pena, Maria Júlia Manso Alves and. In: Protein Kinase C Signalling in Health and Disease Biochemica Society Meeting, 2014, Dublin. Protein Kinase C Signalling in Health and Disease, 2014.
3. **PENA, D.A.**; BERTI D.A.; ALVES M.J.M.; SCHECHTMAN, D. Strategies to develop conformational antibodies against active forms of classical Protein Kinase C. In: XLII Reunião anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2013, Foz do Iguaçu. XLII Reunião anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2013.
4. BERTI, D. A.; **PENA, D. A.**; Schechtman, D . Mechanisms of Nuclear Translocation of PKC beta I. In: XLII Annual Meeting of SBBq, 2013, Foz do Iguaçu. XLII Annual Meeting of SBBq, 2013.
5. **PENA, D. A.**; BERTI, D. A.; Alves, M.J.M.; Schechtman, D. . Strategies to develop conformational antibodies against active forms of classical Protein Kinase C. In: XLII Annual Meeting of SBBq, 2013, Foz do Iguaçu. XLII Annual Meeting of SBBq, 2013.
6. **PENA, D. A.**; BERTI, D. A.; Silva, G.A.F.; Schechtman, D. Desenvolvimento de anticorpos conformacionais contra a proteína quinase C beta II. In: II Congresso Institucional do Instituto de Química, 2012, Guarujá. II Congresso Institucional do Instituto de Química, 2012.
7. Rimoldi, A ; Nascimento, JD; Alves, R.T.; **PENA, D. A.**; STEINDEL, M.; Rosa, J.A. Caracterizacao Morfologica entre Linhagens I e II de Trypanosoma cruzi CHAGAS, 1909 (Kinetoplastida, Trypanosomatidae). In: 57 Jornada Farmaceutica da UNESP, 2010, Araraquara. 57 Jornada Farmaceutica da UNESP, 2010.

8. **PENA, D. A.**; STOCO, P. H.; GRISARD, E. C. Comparative Characterization of Trypanosoma rangeli GP63 metalloproteases coding genes. In: XXVI Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology, 2010, Foz do Iguaçu. XXVI Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology, 2010.
9. GARCIA, L. C.; FERNANDES, A.; **PENA, D. A.**; PILOTTO, M.R.; FERREIRA, E. C.; EGER, I.; STEINDEL, M. Avaliação do Perfil Sorológico e Parasitológico de Pacientes do Surto de doença de Chagas Aguda em Santa Catarina e Genotipagem das cepas de Trypanosoma cruzi Isoladas dos Pacientes com Falha Terapêutica. In: XXV Reunião Anual de Pesquisa Aplicada em doença de Chagas e XIII Reunião Anual de Pesquisa Aplicada em Leishmanioses, 2009, Uberaba. Reunião Anual de Pesquisa Aplicada em doença de Chagas e XIII Reunião Anual de Pesquisa Aplicada em Leishmanioses, 2009.
10. FERREIRA, E. C.; FERNANDES, A.; **PENA, D. A.**; GARCIA, L. C.; PILOTTO, M.R.; GREINERT-GOULART, J.; EGER, I.; STEINDEL, M.; MATTOS, M. Clínico-epidemiológicos da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) Autóctone no Município de Blumenau-SC período de 2005 a 2008. In: XXV Reunião Anual de Pesquisa Aplicada em doença de Chagas e XIII Reunião Anual de Pesquisa Aplicada em Leishmanioses, 2009, Uberaba. XXV Reunião Anual de Pesquisa Aplicada em doença de Chagas e XIII Reunião Anual de Pesquisa Aplicada em Leishmanioses, 2009.
11. FERNANDES, C. D.; **PENA, D. A.**; GARCIA, L. C.; ROMANHA, A. J.; STEINDEL, M. Two Trypanosoma cruzi subgroup Infect Chronic Chagasic Patients from the State of Rio Grande do Sul, Brazil. In: XIII International Congress of Protistology, 2009, Buzios. XIII International Congress of Protistology, 2009.
12. **PENA, D. A.**; GARCIA, L. C. ; GRISARD, E. C. ; STEINDEL, M. . Oral Transmission of Chagas Disease in Santa Catarina: Molecular Characterization of Trypanosoma cruzi Isolated from Humans Before and After Treatment Failure. In: XIII International Congress of Protistology, 2009, Buzios. XIII International Congress of Protistology, 2009.
13. **PENA, D. A.**; FURTADO, G. P.; RODRIGUES, J. M.; PAIER, C. R. K.; Paula, M. B.; Costa, C. L. L.; Queiroz, J. H.; Rezende, S. T. Produção, Purificação e Caracterização Bioquímica Parciais de uma Invertase de Kluyveromyces lactis. In: XVI Simpósio de Iniciação Científica, 2007, Viçosa. Anais do XVI Simpósio de Iniciação Científica, 2007.
14. PENA, L. J.; SANTOS, B. M.; **PENA, D. A.**; GOMEZ, S. Y. M. Validação de um ensaio imunoenzimático para a detecção de anticorpos contra infecção pelo Metapneumovírus aviário. In: XV Simpósio de Iniciação Científica, 2006, Viçosa. Anais do XV Simpósio de Iniciação Científica, 2006.

15. BARRIOS, P. R.; MORAES, M. P.; SANTOS, B. M.; SOUZA, F. O.; PENA, L. J.; **PENA, D. A.**; MAFRA, V. S.; NEVES, C. A.; ALMEIDA, M. R. Comparison of Patogenicity in IBDV Isolates in Embrionic Eggs. In: European Poultry Conference, 2006, Verona. Anais do XII European Poultry Conference, 2006.
16. BONFA, G.; BARRIOS, P. R.; MORAIS, M. P.; SOUZA, F. O.; PENA, L. J.; **PENA, D. A.**; MAFRA, V. S.; NEVES, C. A.; ALMEIDA, M. R. Comparison of Patogenicity in IBDV Isolates in Embrionic Eggs. In: XVI Encontro Nacional de Virologia e III Simpósio de Oncovirologia, 2005, Salvador. VIRUS- Review & Research, 2005. v. 10. p. 97-97.
17. **PENA, D. A.**; ARAUJO, R. R.; PENA, L. J.; GOMEZ, S. Y. M.; DIAS, F. M.; DALE, R.; MORAIS, M. P. Detection of Neutralizing Antibodies Against Equine Herpesvirus Type-1 in the Metropolitan Region of Espirito Santo State, Brazil. In: XXX Meeting of the Brazilian Society of Immunology, 2005, São Pedro-SP. XXX Meeting of the Brazilian Society of Immunology, 2005.
18. **PENA, D. A.**; PENA, L. J.; ARAUJO, R. R.; DALE, R.; MORAIS, M. P. Serologic Survey of Anti-Brucella abortus antibodies in Equines Serum from Mata Mineira Region, Brazil. In: XXX Meeting of the Brazilian Society of Immunology, 2005, São Pedro-SP. XXX Meeting of the Brazilian Society of Immunology, 2005.
19. ARAUJO, R. R.; PENA, L. J.; **PENA, D. A.**; GOMEZ, S. Y. M.; DALE, R.; MORAIS, M. P. . Leptospirosis: Serological Finding in Equines from Metropolitan Region of Espirito State, Brazil. In: XXX Meeting of the Brazilian Society of Immunology, 2005, São Pedro-SP. XXX Meeting of the Brazilian Society of Immunology, 2005.
20. ARAUJO, R. R.; PENA, L. J.; **PENA, D. A.**; DALE, R.; MORAIS, M. P. Seroepidemiology of Brucella abortus Infection in Equines from Metropolitan Region of Espirito Santo State, Brazil. In: XXX Meeting of the Brazilian Society of Immunology, 2005, São Pedro-SP. XXX Meeting of the Brazilian Society of Immunology, 2005.
21. MILAGRES, B. S.; MAFRA, C.L.; MORAES, M. P.; **PENA, D. A.**; PENA, L. J.; SOUZA, C. E.. Perfil sorológico de algumas infecções em capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) capturadas nos estados de São Paulo e Minas Gerais, Brasil.. In: 6 C Encontro Nacional de Biólogos, 2005, Rio de Janeiro. Anais do 6 C Encontro Nacional de Biólogos, 2005.
22. COSTA, P.R.S. ; CONCEICAO, L.G.; MORAIS, M.P.; TSIOMIS, A.; PRADO, R. F. S.; PENA, L. J.; BARRIOS, P. R.; **PENA, D. A.** Estomatite/Faucite Linfoplasmocitária Felina. In: XXV Congresso Brasileiro de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais, 2004, Gramado. Congresso Brasileiro de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais, 2004.

- 
23. **PENA, D. A.**; PENA, L. J.; BARRIOS, P. R.; MORAIS, M. P.; ALMEIDA, M. R.; MILAGRES, B. S. Levantamento Sorológico para o Herpesvírus Equino na Microrregião de Viçosa. In: XIV Simpósio de Iniciação Científica, 2004, Viçosa. XIV Simpósio de Iniciação Científica, 2004.
  24. **PENA, D. A.**; PENA, L. J.; BARRIOS, P. R.; MORAIS, M. P.; ALMEIDA, M. R.; MILAGRES, B. S. Antibodies Against Equine Herpesvirus in the Mata Mineira Region. In: XXIX Meeting of the Brazilian Society of Immunology, 2004, Ouro Preto. XXIX Meeting of the Brazilian Society of Immunology, 2004.
  25. PENA, L. J.; SANTOS, B. M.; **PENA, D. A.**; BARRIOS, P. R.; SOSSAI, S.; MILAGRES, B. S.; MORAIS, M. P.; SALCEDO, J. H. P. Padronização de Ensaio Iminoenzimático para a Detecção de Anticorpos Contra Pneumovírus Aviário. In: XIV Simpósio de Iniciação Científica, 2004, Viçosa. XIV Simpósio de Iniciação Científica, 2004.
  26. PENA, L. J.; SANTOS, B. M.; BARRIOS, P. R.; SOUZA, F. O.; **PENA, D. A.**; MORAIS, M. P.; ALMEIDA, M. R. Diagnóstico Molecular da Síndrome da Cabeça Inchada. In: XIV Simpósio de Iniciação Científica, 2004, Viçosa. XIV Simpósio de Iniciação Científica, 2004.
  27. PENA, L. J.; **PENA, D. A.**; BARRIOS, P. R.; MORAIS, M. P.; ALMEIDA, M. R.; MILAGRES, B. S. Seroepidemiological Survey of Infection of Equine Infectious Anemia, equine Influenzavirus type 2 and Equine Herpesvirus Type 1 in Herds of South Pará State Brazil. In: XXIX Meeting of Brazilian Society of Immunology, 2004, Ouro Preto. XXIX Meeting of Brazilian Society of Immunology, 2004.
  28. PENA, L. J.; **PENA, D. A.**; BARRIOS, P. R.; MORAIS, M. P.; ALMEIDA, M. R.; MILAGRES, B. S. Detection of Antibodies Against Equine Influenza Virus in the Mata Mineira Region. In: XXIX Meeting of the Brazilian Society of Immunology, 2004, Ouro Preto. XXIX Meeting of the Brazilian Society of Immunology, 2004.
  29. PENA, L. J.; MORAES, M. P.; Silva, A. J.; **PENA, D. A.**; ALMEIDA, M. R.; MILAGRES, B. S. Inquérito soro-epidemiológico da infecção pelo vírus da Influenza Equina na região da Zona da Mata Mineira. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência-SBPC, 2004, Cuiabá. In: 56º Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência-SBPC, 2004.
  30. PENA, L. J.; MORAIS, M. P.; JUNIOR, A.; **PENA, D. A.**; ALMEIDA, M. R. Inquérito soro-epidemiológico da Infecção pelo vírus da Influenza Equina na Região da Zona da Mata Mineira. In: XIII-Simpósio de Iniciação Científica-SIC, 2003, Viçosa. Anais do XIII-Simpósio de Iniciação Científica-SIC, 2003.



31. PENA, L. J.; MORAIS, M. P.; JUNIOR, A.; **PENA, D. A.** ; ALMEIDA, M. R. .  
Levantamento Sorológico da Infecção pelo vírus Influenza Equina no Sul do  
Estado do Pará. In: XIII-Simpósio de Iniciação Científica-SIC, 2003, Viçosa.  
Anais do XIII-Simpósio de Iniciação Científica-SIC.