**ELISABETE RODRIGUES DO MONTE SILVA**

# CARACTERIZAÇÃO DO REPERTÓRIO PEPTÍDICO INTRACELULAR DE CÉLULAS EXPRESSANDO O PROTEASSOMO IMUNE

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

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientador: Prof. Dr. Emer Suavinho Ferro

Versão original

São Paulo
2014

# RESUMO

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

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



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

## ABSTRACT

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

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



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

# 1 INTRODUÇÃO

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

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

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

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

Os sítios ativos do proteassomo estão presentes nas subunidades catalíticas $\beta_1$, $\beta_2$ e $\beta_5$, e utilizam o grupo hidroxila da cadeia lateral da treonina amino terminal como agente nucleofílico, caracterizando esse complexo enzimático como uma hidrolase aminoterminal nucleofílica e o distinguindo de outras proteases celulares (DEMO et al., 2007; HEINK et al., 2005; KLOETZEL, 2001). Proteínas senescentes, com erros no dobramento ou que sofreram algum problema na tradução são encaminhadas para a degradação (DEMO et al., 2007; NUSSBAUM et al., 2005; YEWDELL; REITS; NEEFJES, 2003). Esses substratos podem se encontrar com o proteassomo por colisão e os produtos da sua proteólise são peptídeos com tamanho variando entre 2 a 20 aminoácidos, os quais podem, ainda, sofrer a ação de peptidases do citoplasma, núcleo ou do retículo endoplasmático. Os peptídeos que escapam da degradação podem ser apresentados como antígenos pelo complexo de histocompatibilidade maior de classe I (MHC-I) (FOSS et al., 1998; YEWDELL; REITS; NEEFJES, 2003). Cada uma dessas subunidades apresenta preferência por diferentes sítios de clivagem no substrato: a subunidade $\beta_1$ cliva após resíduos ácidos (atividade caspase-*símile*), a subunidade $\beta_2$ cliva após resíduos básicos (atividade tripsina-*símile*) e a subunidade $\beta_5$ cliva após resíduos hidrofóbicos (atividade quimiotripsina-*símile*) (CUNHA et al., 2008; GROETTRUP; KIRK; BASLER, 2009; KLOETZEL, 2001; MUCHAMUEL et al., 2009). Em condições de estresse ou resposta imune aguda, essas três subunidades podem ser substituídas por síntese *de novo*, originando as subunidades $\beta_{1i}$ (*Low Molecular Weight Protein 2* - LMP2), $\beta_{2i}$ (*Multicatalytic Endopeptidase Complex-símile 1* - MECL-1) e $\beta_{5i}$ (*Low Molecular Weight Protein 7* - LMP7), que são incorporadas cooperativamente ao complexo do proteassomo imune em formação (DAHLMANN, 2007; FOSS et al., 1998; HEINK et al., 2005; KLOETZEL, 2001).

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

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

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

O proteassomo imune propicia uma melhor apresentação de antígenos via MHC-I. Isso ocorre por que essa forma do proteassomo produz maior quantidade de peptídeos com oito a dez aminoácidos e apresenta atividade quimotripsina-*símile* aumentada, em parte, devido à substituição da subunidade $\beta_1$ pela subunidade $\beta_{1i}$, que passa a ter essa característica de catálise. Assim, a apresentação de antígenos será favorecida já que as moléculas MHC-I têm preferência por se ligarem a peptídeos com cerca de nove aminoácidos e que apresentem características hidrofóbicas ou básicas em suas regiões carboxi terminais (GROETTRUP; KIRK; BASLER, 2009; YEWDELL; REITS; NEEFJES, 2003).

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

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

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

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

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

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

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

## 1.1 Objetivo

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

## 2 CONCLUSÃO

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

# REFERÊNCIAS*

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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