

- Membranas

26.001

INTERACTION OF ACETYLCHOLINESTERASE SUBUNITS OF TYPE T WITH THE PROLINE RICH ATTACHMENT DOMAINS (PRAD) OF COLQ AND PRiMA. Bon, S.; Noureddine, H^{**}; Leroy, J.; Massoulié, J. Neurobiologie CNRS

Objetivo:

The nervous tissue and muscles of mammals express the T splice variant of acetylcholinesterase (AChE, E.C. 3.1.1.7), which is characterized by a C-terminal t peptide of 40 residues. The functional localization of this enzyme at neuromuscular junctions and in the central nervous system depends on its association with the anchoring proteins ColQ and PRiMA, generating collagen-tailed and membrane-bound hetero-oligomers. The t peptides of four AChE subunits associate with the Proline Rich Attachment Domains (PRAD) of ColQ or PRiMA. This interaction has been studied in detail in the case of ColQ, by site-directed mutagenesis and by crystallography of a complex formed by synthetic t and PRAD peptides. In this complex, four t peptides form a coiled coil around the PRAD. The C-terminal cysteines of two t peptides are disulfide-linked to the PRAD of ColQ. The PRAD of PRiMA differs from that of ColQ, by the number of prolines and by the number and distribution of cysteines. We wish to understand the interaction between AChE and PRiMA, because it controls cholinesterasic activity in the brain, and might thus be a possible target for therapy of Alzheimer's disease.

Métodos e Resultados:

To characterize the residues of the t peptide which are involved in the interaction with the PRAD of PRiMA, we examine the effect of site-directed mutations, notably replacing aromatic residues by alanines or glycines. We find that some of these mutations had little effect on the association of AChE with a fragment of ColQ, but compromised its association with PRiMA or with the N-terminal, extracellular domain of PRiMA. We also analyze the formation of disulfide bonds between AChE and PRiMA by electrophoresis of denatured, non reduced hetero-oligomers. The protein is characterized either by metabolic labeling and immunoprecipitation with an anti-AChE antiserum, or by Western blot with anti-AChE or with a monoclonal antibody (M2) directed against a flag epitope introduced in PRiMA.

Conclusões:

The interactions of AChE T subunits with ColQ and with PRiMA are clearly different, suggesting that it may be possible to interfere specifically with each of the two modes of anchoring.

26.002

PAPEL DA PROTEÍNA KINASE C E DO CÁLCIO CITOSÓLICO NA VELOCIDADE DE EXTRUSÃO DE H⁺ DAS CÉLULAS MDCK. Oliveira-Souza, M.; Pelinson, M. S.* Fisiologia e Biofísica ICB I-USP

Objetivo:

Avaliar o efeito da interação da Angiotensina II (ANG II), Phorbol 12-myristate 13-cetate (PMA; estimulador da PKC) estaurosporina (inibidor da PKC) ou dimethyl-BAPTA/AM (quelante de Ca²⁺_i), sobre o pH intracelular (pH_i) e a distribuição das isoformas alfa (α) e epsilon (ε) da PKC em células MDCK.

Métodos e Resultados:

As medidas de pH_i são realizadas por microscopia de fluorescência, utilizando a sonda intracelular fluorescente, BCECF/AM. A distribuição das isoformas de PKC é investigada por imunofluorescência e análise por microscopia confocal, utilizando anticorpos específicos para cada isoforma. A velocidade de extrusão celular de H⁺ (dpH_i/dt) nos 2 primeiros minutos após o pulso ácido com NH₄Cl, quando as células são expostas ao meio controle é [0.184 ± 0.009 (50) unidades de pH/min]. Este parâmetro é aumentado com ANG II (10⁻¹², 10⁻⁹ ou 10⁻⁷ M) e não é alterado com ANG II (10⁻⁶ M). Ambos efeitos moduladores da ANG II sobre a dpH_i/dt são reduzidos por estaurosporina ou dimethyl-BAPTA/AM (10⁻⁵ M). O PMA (10⁻⁷ M) aumenta a dpH_i/dt, sendo esse efeito reduzido por estaurosporina. Nos estudos de imunofluorescência, encontramos que, na condição basal, há maior intensidade fluorescente (IF) da PKC_α no citosol, e da PKC_ε no núcleo. Na vigência de ANG II (10⁻⁹ M), a IF para PKC_α é aumentada, tanto no citosol como na membrana plasmática; porém, a IF para a PKC_ε desloca-se do núcleo para o citosol. Na vigência de ANG II

(10^{-6} M), a IF da PKC ζ desloca-se para a região perinuclear e, a da PKC Σ , é redirecionada para o núcleo.

Conclusões:

Nossos resultados indicam que nas células MDCK, tanto as isoformas α e ε da PKC, como o Ca^{2+}_i , são fatores reguladores da modulação de ANG II na extrusão de H^+ , após carga ácida por NH_4Cl .

Apoio financeiro: FAPESP.

26.003

SEGMENTO CONSENSO DO DOMÍNIO TRANSMEMBRANA M2 DO RECEPTOR P2X $_7$ EXIBE ATIVIDADE DE CANAL IÔNICO: UMA NOVA CONFIGURAÇÃO FUNCIONAL? ¹Souza, C. A. M.; ¹Teixeira, P.; ¹Faria, R. X.**; ²Krylova, O.; ²Pohl, P.; ¹Alves, L. A. ¹Imunologia FIOCRUZ; ²Max-Delbrück Center for Molecular Medicine Berlin Alemanha

Objetivo:

A ativação do receptor P2X $_7$ modula um grande espectro de eventos celulares, por exemplo apoptose, fagocitose e secreção de algumas citocinas no sistema imunológico. Uma questão que ainda não está definida é a formação do poro associado à ativação do P2X $_7$. Baseado em modelagem molecular, acredita-se que o segmento transmembrana M1 e M2 participem na formação do poro, quando estimulado com concentrações de ATP extracelular, na faixa de milimolar. Neste trabalho, investigamos, por métodos de bioinformática e eletrofisiologia a participação de uma porção do segmento M2 na formação do canal.

Métodos e Resultados:

A maioria dos trabalhos utilizando programa de predição de seqüências transmembranas prevê uma estrutura em alfa hélice para este segmento. Contudo, através de novos algoritmos de bioinformática e dinâmica molecular, realizamos uma análise refinada do segmento M2 indicando que o mesmo, não comportaria uma alfa hélice transmembrana e que uma parte consenso estaria estruturada como uma folha beta. Com o intuito de verificarmos se esse segmento consenso poderia formar um canal/poro, sintetizamos o mesmo e “aplicamos” em bicamada lipídica artificial. Nossos resultados mostraram que o canal formado é voltagem independente, seletivo a cátion mono e divalentes, com uma condutância de 10pS para o K $^+$. Esse segmento também forma um canal em membrana de células HEK (que não expressam P2X $_7$) quando analisado por *Patch Clamp* no modelo de *cell attached*.

Conclusões:

O segmento consenso analisado é potencialmente formador de canal com características de seletividade a cátions e condutância semelhantes ao canal P2X $_7$, sendo esta a primeira demonstração desse fato. Entretanto, não observamos atividade compatível com poro.

26.004

VIABILIDADE DE CEPAS DE *S. CEREVISIAE* QUE EXPRESSAM MUTANTES DA Cu^+ -ATPASE DE LEVEDURAS, ALTERADOS NA REGIÃO N-TERMINAL. ¹Ribeiro, M. G. L.; ¹Pacheco, R.S.*; ¹Lowe, J.; ²Morin, I.**; ²Cuillet, M.; ¹Einicker-Lamas, M.; ⁷Valverde, R. H. F.**; ²Mintz, E.; ²Guillain, F.; ¹Vieyra, A. R.; ¹IBCCF-UFRJ; ²CEA Grenoble França

Objetivo:

As ATPases do tipo P1 apresentam, além dos domínios característicos a todas as P-ATPases (*Biochemistry* 34: 15607-613, 1995), uma seqüência de 2 a 6 sítios de ligação de metal (*Metal Binding Domains* – MBDs) localizados no longo domínio N-terminal. Ccc2, a Cu^+ -ATPase de leveduras, tem a função de entregar o cobre ao transportador de ferro dependente de cobre localizado na membrana plasmática e apresenta 2 MBDs, enquanto a enzima homóloga em humanos apresenta 6 MBDs. Postula-se que os MBDs sejam importantes para a translocação do Cu^+ para os sítios de transporte intramembranares e/ou para determinar a correta localização intracelular da enzima (*J. Biol. Chem.* 279: 15376-384, 2004). Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi verificar a viabilidade de mutantes de Ccc2, alterados em sua região N-terminal, através da realização de curvas de crescimento em meio seletivo.

Métodos e Resultados:

Mutantes delta 1, M1 e delta 3 foram construídos a partir do gene CCC2 e correspondem respectivamente à deleção do MBD1, MBD2 e de ambos. Os diferentes genes foram inseridos em plasmídeos contendo o gene de seleção LEU2, de forma a facilitar a detecção de clones positivos

em meio DO⁻ Leu após a transformação de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* que não expressam o gene o gene CCC2 (denominadas delta Ccc2). Inóculos de cada uma das cepas foram submetidos a crescimento “overnight” em meio seletivo sem adição de cobre, a 30°C e 200 rpm. Depois de 16 h, as pré-culturas foram diluídas para uma densidade óptica (D.O.) 0,1 (600 nm) e alíquotas foram retiradas periodicamente durante 24 h para leitura da D.O. e contagem de células em câmara de Neubauer. As cepas mutantes apresentaram taxa de crescimento diferenciado, sendo que a cepa delta 1 apresentou a menor taxa, inclusive quando comparada à cepa delta Ccc2.

Conclusões:

No meio seletivo utilizado, existem concentrações de cobre e ferro suficientes para promover o crescimento de todas as cepas analisadas, mesmo aquelas que não expressam a Cu⁺-ATPase funcional. Testes de complementação realizados em presença de concentrações variadas de cobre e ferro demonstraram a incapacidade de crescimento das cepas mutantes, evidenciando que a região N-terminal íntegra é essencial para a atividade Cu⁺-ATPásica. Os resultados aqui obtidos indicam que a ausência de um MBD essencial para o funcionamento e/ou localização de Ccc2, pode levar à alteração do metabolismo da levedura, de forma a comprometer a correta atividade das proteínas dependentes de cobre.

26.005

ENVOLVIMENTO DE PROTEÍNAS KINASES NA REGULAÇÃO DA ATIVIDADE DA CU⁺-ATPASE DE *S. CEREVISIAE* EM SISTEMA Sf9 ¹ Valverde, R. H. F.; ¹ Lowe, J.; ¹ Ribeiro, M. G. L. ^{**}; ² Morin, I. ^{**}; ¹ Einicker-Lamas, M.; ² Cuillel, M.; ² Guillain, F.; ² Mintz, E.; ¹ Vieyra, A. R.; ¹ IBCCF-UFRJ; ² CEA/Grenoble - França

Objetivo:

A fosforilação por proteínas kinases e defosforilação por fosfatases é de grande importância na modulação de processos biológicos incluindo alteração na afinidade de enzimas por substratos, atividade e tráfego entre compartimentos subcelulares de diferentes proteínas, incluindo enzimas transportadoras de íons. Neste estudo visamos definir um possível efeito das kinases: PKC, CaM-kinase II e tirosina kinase na atividade de da Cu⁺-ATPase de *S. cerevisiae* (Ccc2) homóloga daquelas encontradas em humanos, denominadas ATPases de Menkes e de Wilson.

Métodos e Resultados:

120 ml de meio de cultura contendo células Sf9 (~2 x 10⁶ células/ml) foram infectados com baculovírus recombinantes contendo os genes selvagem (CCC2) ou mutante deletado na região N-terminal (Δ MBD). Ccc2 selvagem e Δ MBD foram super-expressas e as membranas que as continham posteriormente fracionadas. A atividade Cu⁺-ATPásica foi medida na presença de quelantes de cobre (Lowe *et al.*, 2004) e na presença de diferentes drogas de acordo com a via de sinalização a ser testada. Seqüências consenso para fosforilação foram identificadas com auxílio do banco de dados PROSITE. Na presença de KN-93 (1 μ M), inibidor de CaM-kinase II, a atividade de Ccc2 foi diminuída em 50%, indicando presença de uma CaM-kinase II endógena nesta preparação capaz de modular Ccc2. KN-93 não causou efeito algum em Δ MBD. Em presença do inibidor de PKC, GF109 (50 nM) pode ser constatada 60% de inibição na atividade Cu⁺-ATPásica, um efeito aditivo ao de ácido okadaico, inibidor de fosfatases. Na presença de genisteína a atividade de Ccc2 sofreu uma queda de 40%.

Conclusões:

Motivos reconhecidos por três kinases diferentes: CaM-kinase II, PKC e tirosina kinase foram encontrados na estrutura primária de Ccc2. A atividade da ATPase se mostrou suscetível a modulação quando as seqüências presentes na parte N-terminal se encontravam intactas (Ccc2) efeito cancelado na presença da ATPase Δ MBD. O papel destes processos de fosforilação pode ajudar a decifrar os mecanismos de regulação da atividade, modulação da afinidade por Cu⁺ e tráfego intracelular da Cu⁺-ATPase.

26.006

MODULAÇÃO DA CA⁺²-ATPASE DE TÚBULOS PROXIMAIS RENAIIS POR CERAMIDAS. Raibolt-Barbosa, N. ^{*}; Cabral, L. M. P. ^{**}; Francescutti, G. S. ^{*}; Wengert, M. ^{**}; Caruso-Neves, C.; Vieyra, A. R.; Einicker-Lamas, M. IBCCF-UFRJ

Objetivo:

Resultados anteriores do nosso grupo tem demonstrado que diferentes lipídeos de membrana possuem potencial modulatório sobre as ATPases transportadoras de íons. O objetivo deste trabalho foi identificar o efeito dos lipídeos sinalizadores ceramida (Cer) e ceramida 1-P (C1P), seu produto fosforilado, na atividade da Ca^{+2} -ATPase de membrana basolateral (MBL) de túbulo proximal renal, assim como estudar o possível envolvimento de uma proteína cinase C (PKC).

Métodos e Resultados:

O trabalho foi realizado utilizando-se frações purificadas de MBL de túbulos proximais de rins de porco obtidas como anteriormente descrito (*Eur. J. Biochem.*, 263: 71-78.1999). Concentrações crescentes de Cer levam a um efeito bifásico sobre a atividade Ca^{+2} -ATPásica. A máxima estimulação (~200 %) foi obtida na presença de 50 nM de Cer. Dados da literatura indicam que Cer ativa PKC em alguns sistemas, o que nos levou a investigar o efeito de Cer sobre a PKC de MBL. Verificamos que 50 nM de Cer aumenta em ~150 % a atividade de PKC. Medida da atividade da Ca^{+2} -ATPase na presença de calfofostina, inibidor da PKC, e de 50 nM de Cer, revela a persistência do estímulo da Ca^{+2} -ATPase, indicando uma via independente de PKC. Ceramida-1P não exerce qualquer efeito sobre a PMCA.

Conclusões:

O efeito de Cer sobre a Ca^{+2} -ATPase é independente da ativação de PKC. Experimentos estão sendo desenvolvidos para verificar a participação de outra proteína cinase, ou ainda, se Cer se liga diretamente à Ca^{+2} -ATPase.

26.007

CROSSTALK ENTRE ESFINGOSINA-1-FOSFATO E FOSFATIDILINOSITOL-4-FOSFATO: ENVOLVIMENTO DE MICRODOMÍNIOS DE MEMBRANA. Lemos, T.; Tortelote, G. G.*; Razuck, N. A.*; Valverde, R. H. F.**; Vieyra, A. R.; Einicker-Lamas, M. IBCCF-UFRJ

Objetivo:

Foi demonstrado em nosso laboratório que a Ca^{2+} ATPase de membrana plasmática (PMCA) de células epiteliais renais é encontrada exclusivamente em microdomínios caveolares (*FEBS Lett.* 576:31-5, 2004). Nossos estudos também mostram a presença de uma fosfatidilinositol-4-cinase (PI-4K), cujo produto, fosfatidilinositol-4-fosfato (PtdIns4P), é um potente ativador da PMCA em frações de membrana basolateral (MBL) dessas células. A regulação da síntese de PtdIns4P por esfingolipídeos (*J Biochem.* 134:529-36, 2003) pode indicar compartimentalização desse processo. Nesse estudo, investigamos (1) se a localização da PI-4K, e a síntese de PtdIns4P, se encontra compartimentalizada em cavéolas, e (2) se esfingosina modula de forma diferenciada a formação de PtdIns4P em microdomínios caveolares.

Métodos e Resultados:

MBL de células epiteliais de túbulo proximal obtidas a partir de córtex renal de rim de porco, como descrito (*Eur J Biochem.* 263:71-8, 1999), foram submetidas a um gradiente descontínuo de sacarose (5-45%) para obtenção de frações enriquecidas em cavéolas. As frações do gradiente foram agrupadas em caveolares (C, imunopositivas para caveolina-1) e não-caveolares (NC). O anticorpo anti-PI-4K α reconheceu a enzima nas frações C e NC, havendo, entretanto, cerca de 50% a mais de marcação nas primeiras. Foram realizados ensaios de fosforilação de lipídios, como já descrito (*Int J Biochem Cell Biol.* 37:79-90,2005), na ausência e na presença de esfingosina (Sph), extração, separação em cromatografia de camada fina (TLC) e quantificação das áreas radioativas. Na ausência de Sph observamos a formação de PtdIns4(³²P) em ambas as frações, com apenas 9,8% de diferença entre C e NC. Na presença de 100 μM de Sph, as frações C apresentaram 66% a mais de formação de PtdIns4P, em relação às frações NC.

Conclusões:

Nossos dados sugerem que microdomínios caveolares estão envolvidos na regulação do metabolismo de esfingolipídeos e fosfoinosítídeos envolvidos na modulação da PMCA. O enriquecimento em cavéolas de diversas proteínas envolvidas com o *turnover* e a sinalização de fosfolipídeos facilitaria a interação entre esses elementos.

26.008

EFEITO DA ALDOSTERONA NA REGULAÇÃO DO pH INTRACELULAR DO SEGMENTO S3 DO TÚBULO PROXIMAL DE RATOS. Leite-Dellova, D.; Malnic, G.; Mello-Aires, M. Fisiologia e Biofísica ICB I-USP

Objetivo:

A proposta deste trabalho foi investigar o efeito da aldosterona sobre os mecanismos de regulação do pH intracelular (pHi) do segmento S3 proximal de ratos.

Métodos e Resultados:

Com auxílio de microscópio estereoscópico, o segmento S3 de ratos, machos, Wistar, 90g, foi microdissecado a partir da papila renal. O pHi foi mensurado através de microscopia fluorescente (utilizando BCECF/AM), acoplada a um sistema de aquisição de dados por câmara de vídeo, durante superfusão com solução externa controle ($\text{Na}^+=140\text{Mm}$) ou solução isenta de Na^+ . Nossos dados indicaram que o pHi basal do segmento S3 foi 7.17 ± 0.020 ($n=47$). Na presença de Na^+ extracelular, a velocidade de recuperação do pHi (dpHi/dt), após o pulso intracelular ácido, foi de 0.175 ± 0.007 ($n=37$) unidades de pHi/min e com aldosterona (10^{-8} ou 10^{-6} M; 1 hora de pré-incubação) a velocidade de recuperação do pHi aumentou para 0.342 ± 0.007 ($n=10$) unidades de pHi/min ou diminuiu para 0.110 ± 0.016 ($n=19$) unidades de pHi/min, respectivamente ($p<0.05$). Na ausência de Na^+ extracelular, a velocidade de recuperação do pHi após o pulso intracelular ácido, foi de 0.061 ± 0.005 ($n=28$) unidades de pHi/min e com aldosterona (10^{-8} ou 10^{-6} M; 1 hora de pré-incubação) a velocidade de recuperação do pHi aumentou para 0.130 ± 0.011 ($n=18$) unidades de pHi/min ou para 0.076 ± 0.030 ($n=21$) unidades de pHi/min, respectivamente ($p<0.05$).

Conclusões:

Nossos dados indicam que a aldosterona atua no processo de regulação do pHi do segmento S3 proximal, através de um mecanismo dose dependente bifásico (estimulatório/inibitório) sobre o trocador Na^+/H^+ e através de um efeito estimulatório sobre os transportadores independentes de Na^+ .

26.009

EFEITO DE CHOQUE HIPOSMÓTICO SOBRE A CAPACITÂNCIA DA MEMBRANA DE MELANOMA MURINO S-91. Salomão, L. C.; Bodi, E. C. Fisiologia IB Universidade Presbeteriana Mackenzie

Objetivo:

As células de melanoma murino submetidas a choques hiposmóticos agudos sofrem rápido aumento de volume, seguindo-se de lenta redução regulatória de volume (regulatory volume decrease, RVD). O aumento da superfície celular freqüentemente ultrapassa os valores de elasticidade descritos para membranas biológicas, isto é, cerca de 3%. Uma provável explicação relaciona-se com a eventual incorporação de novos fragmentos de membrana durante a fase de inchamento osmótico, o que implicaria em aumento de capacitância. Neste estudo descrevemos as variações de capacitância durante choques hiposmóticos.

Métodos e Resultados:

Um aumento médio de volume da ordem de 27% foi observado em células de melanoma murino agudamente submetidas a choque hiposmótico (de 290 a 190 mOsm.kgH₂O-1). Durante este choque, mediu-se a capacitância destas células através da técnica de voltage clamp na configuração whole cell. A voltagem de repouso foi fixada em -90mV, sendo aplicados estímulos de ondas quadradas despolarizantes de 20mV de amplitude e 100 Hz. A corrente gerada foi posteriormente processada utilizando-se um programa por nós desenvolvido, baseado na técnica PSD (Phase-Sensitive Detector), para a determinação da capacitância celular. Os resultados indicam um aumento de capacitância total da ordem de 60%, ou seja de 50pF para 80pF.

Conclusões: Os resultados sugerem um aumento da área da superfície celular a partir da incorporação de novos fragmentos de membrana.

26.010

IDENTIFICATION OF NOVEL BINDING PARTNER(S) FOR THE PROLINE RICH MEMBRANE ANCHOR (PRIMA) OF ACETYLCHOLINESTERASE ¹Nunes-Tavares, N ²Leroy, J. ^{**}; ²Perrier, N ^{**}; ²Massoulié, J.; IBCCF-UFRJ; ²Neurobiologie CNRS

Objetivo:

Acetylcholinesterase (AChE, E.C. 3.1.1.7) is responsible for the hydrolysis of the neurotransmitter acetylcholine and thus plays an essential role in cholinergic mechanisms. AChE is a target for drugs to improve the condition of Alzheimer's patients. Several studies have shown that AChE induces aggregation of the amyloid peptide A β , responsible for the formation of plaques in AD, and

increases its neurotoxicity (J.Mol.Biol. 272: 348; 1997). Other studies showed that membrane-associated AChE tetramers diminish in AD. This AChE isoform is anchored by a protein called PRiMA (*Proline Rich Membrane Anchor*), recently cloned in our group (Neuron, 33: 275, 2002). PRiMA contains a *Proline-Rich Attachment Domain* (PRAD), which organizes AChE tetramers and is a single-pass ~20 kDa transmembrane protein which allows the attachment of these tetramers on the plasma membrane surface.

Métodos e Resultados:

To identify novel PRiMA partners, presumably involved in the localization and/or the stabilization of AChE at the cell surface, we started yeast Two-hybrid screen with the intracellular part of PRiMA (40a.a. residues) as bait and a human brain cDNA library for prey. The Bait/Prey interaction is observed by transcription of reporter genes (*LacZ*, *His3* and \square -*GAL*). The protein-protein interaction is indicated by growth in selective media and by revelation of \square -*GAL* activity. Plasmids from positive yeast clones were isolated and interaction with PRiMA was confirmed by re-introduction into PRiMA-expressing yeast. They were then analyzed by DNA sequencing and database searching. This screening led to the identification of several positive clones.

Conclusões:

We find that positive double hybrid interactions occur with very short protein motifs, and we are trying to assess their specificity and possible relevance to AChE localization, through an association of PRiMA with cytoplasmic partners.