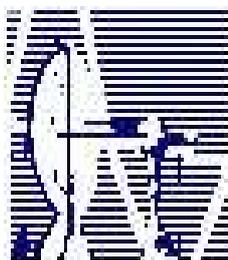


THIAGO LEMOS DE CARVALHO

**ENVOLVIMENTO DE MICRODOMÍNIOS DE MEMBRANA NA
INTERAÇÃO ENTRE ESFINGOSINA E A
FOSFATIDILINOSITOL 4-CINASE EM EPITÉLIO RENAL**

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO VISANDO A
OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOFÍSICA)



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE BIOFÍSICA CARLOS CHAGAS FILHO
2006**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ENVOLVIMENTO DE MICRODOMÍNIOS DE MEMBRANA NA INTERAÇÃO
ENTRE ESFINGOSINA E A FOSFATIDILINOSITOL 4-CINASE EM EPITÉLIO
RENAL

THIAGO LEMOS DE CARVALHO

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica) da Universidade Federal do Rio de Janeiro visando a obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas (Biofísica)

Orientador: Prof Dr. Marcelo Einicker Lamas

RIO DE JANEIRO

2006

FICHA CATALOGRÁFICA

Carvalho, Thiago Lemos

Envolvimento de microdomínios de membrana na interação entre esfingosina e a fosfatidilinositol 4-cinase em epitélio renal / Thiago Lemos de Carvalho. Rio de Janeiro: UFRJ / IBCCF, 2006.

xiii, 139f.: il.

Orientador: Marcelo Einicker Lamas

Tese (Mestrado)-UFRJ / IBCCF / Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), 2006.

Referências Bibliográficas: f. 88-104.

1. Cavéolas; 2. Esfingolípídeos; 3. Fosfoinosítídeos; 4. Sinalização Celular; 5. Lipídios Bioativos; 6. Células epiteliais; 7. Túbulos renais. I. Lamas, Marcelo Einicker. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica). III. Título.

ENVOLVIMENTO DE MICRODOMÍNIOS DE MEMBRANA NA INTERAÇÃO ENTRE ESFINGOSINA E A
FOSFATIDILINOSITOL 4-CINASE EM EPITÉLIO RENAL

Thiago Lemos de Carvalho

Orientador: Prof Dr. Marcelo Einicker Lamas

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica) da Universidade Federal do Rio de Janeiro visando a obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas (Biofísica). Aprovada por:

Prof. Dr. Marcelo Einicker Lamas

Prof Adjunto do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ

Prof Dr. Julio Scharfstein

Prof Titular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ

Prof Dr. Celso Caruso Neves

Prof Adjunto do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ

Prof Dr. Mauro Sola Penna

Prof Adjunto da Faculdade de Farmácia, UFRJ

Revisora: Prof^a. Dra. Jennifer Lowe

Prof^a. Adjunta do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

Rio de Janeiro

2006

Esta tese foi desenvolvida no período compreendido entre agosto de 2004 e julho de 2006, sob orientação do Professor Marcelo Einicker Lamas, no Laboratório de Físico-Química Biológica Aída Hassón-Voloch do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro. O trabalho foi financiado com auxílios concedidos pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Programa de Apoio aos Núcleos de Excelência (PRONEX/CNPq).

*“A filosofia se divorciou da ciência
Ao indagar com qual conhecimento
Da vida e do mundo o homem vive mais feliz.”*
Friedrich Nietzsche

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, que me deram asas e me ensinaram a voar cada vez mais alto. Eu não seria quem sou se não fosse por vocês. Amo vocês.

Aos meus irmãos, Marcos e Filipe, que agüentaram mais ou menos meus falatórios sobre as fosfofosforilases fosfatases da vida, e por não terem reclamado *muito* enquanto alugava o computador por horas a fio. Valeu o apoio. Agora vem o doutorado, e espero continuar contando com a compreensão de vocês.

Aos meus outros irmãos e amigos Edinho, Samurai, Vinícius, Anselmo e Alan, por me aturarem e apoiarem durante todo esse período, e em outros também.

A minha família – avós, tios, primos – de fato ou de consideração, por me apoiarem de forma incondicional. E por serem a minha “Grande Família”.

A minha namorada, Joana, por ser quem você é, e fazer com que eu me sinta menos perdido no mundo. E por ter uma paciência enorme. Valeu mesmo.

Aos grandes amigos Giovane Tortelote e Rafael Valverde, pela amizade e apoio durante todo o tempo, e pelo que aprendi na convivência com vocês. Vocês foram muito importantes para o meu crescimento. Obrigado.

Aos amigos do tempo da graduação, Paulo Silva, Daniele Gabriel, e o irmão Rui Miranda, que me acompanharam nessa estrada, sempre acreditando em mim.

Ao professor e amigo Fernando A.M.S. Pompeu, por me acompanhar nos primeiros passos como aprendiz de cientista, e por contribuir sobremaneira para minha formação.

Ao orientador e amigo Marcelo Einicker Lamas, que me aceitou como seu primeiro aluno de pós-graduação (espero que não esteja arrependido!), e possibilitou-me aprender mais sobre ciência, e a gostar cada vez mais desse

trabalho, aumentando minha vontade de ser um excelente pesquisador. Grande amigo Marcelo, muito obrigado.

Ao Prof. Adalberto Vieyra, por ter aberto as portas de seu laboratório, e por ter contribuído de modo ímpar para meu trabalho e minha formação.

A todos os componentes do Laboratório de Físico-Química Biológica Aída Hasson-Voloch, os atuais e os que já se despediram, por terem sido uma grande família, grandes amigos e companheiros de trabalho.

A Prof^a Jennifer Lowe, por ter puxado minha orelha toda a vez que necessário (e foram muitas!) e por ter sido uma grande amiga em todos os momentos, até quando eu sabotava inocentemente algum experimento.

A Prof^a Lucienne Lara, que apesar de pouco tempo no laboratório, se tornou uma amiga muita querida, em parte por conta dos doces que ela trazia para o laboratório (mais isso só durou poucas semanas). Obrigado pelo apoio e pelo ombro amigo quando precisei.

Às minhas estagiárias preferidas (e as únicas), Natalie Razuck e Vanessa Baldez, por me perturbarem bastante, me dando noção do que é ser orientador e pai ao mesmo tempo. Adoro vocês.

A todos os que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, seja com idéias, auxílio na parte experimental, apoio moral ou tomando (e pagando!) uma cerveja no bloco A. Muito obrigado.

RESUMO

Estudos anteriores de nosso laboratório mostram a presença de microdomínios de membrana na face basolateral (MBL) das células do túbulo proximal renal. A participação desses microdomínios no metabolismo de fosfoinosítídeos, particularmente do fosfatidilinositol-4-fosfato (PtdIns(4)P), envolvido na regulação de ATPases transportadoras de solutos, ainda não é totalmente esclarecida. A interação entre esfingolipídios e a atividade PtdIns 4-cinase (PtdIns4K) em frações de MBL nos indica uma potencial via de regulação dos níveis desse importante lipídio bioativo. Nesse estudo investigamos algumas das características da PtdIns4K presente em MBL de túbulo proximal renal. A formação de PtdIns(4)P é proporcional tanto ao tempo de incubação com [γ^{32} P]ATP quanto à concentração de proteína no meio de reação, tendo um pH ótimo em torno de 6,9-7,1, e sendo dependente de $MgCl_2$. A insensibilidade a wortmannina, a inibição por concentrações micromolares de Ca^{2+} , e seu peso molecular na faixa de 57-62 kDa, indicam que a síntese de PtdIns(4)P em MBL é devido a uma atividade PtdIns4K do tipo II. Para determinar se há compartimentalização dessa enzima na MBL, isolamos frações enriquecidas em microdomínios, através de solubilização com detergente não-iônico ($C_{12}E_9$), e centrifugação em gradiente descontínuo de sacarose (45, 35 e 5%, do fundo para o topo do tubo). Foram retiradas após a centrifugação 12 frações de 1 mL cada, do topo para o fundo. A atividade da PtdIns4K foi medida em todas as 12 frações do gradiente, sendo recuperada aproximadamente 60% desta atividade em frações de baixa densidade (frações 3-5) imunopositivas para caveolina-1. A interação entre a esfingosina (Sph), e a atividade PtdIns4K foi investigada, onde verificamos um efeito bifásico na atividade da PtdIns4K, havendo um aumento da síntese da PtdIns(4)P quando na presença de Sph 100 μ M, sendo que em concentrações mais altas (300-500 μ M) há uma diminuição na atividade da PtdIns4K, chegando próximo aos níveis controle. Há ainda, nessas concentrações de Sph (300-500 μ M), uma significativa formação de S1P, sugerindo uma interação entre a Sph cinase e a PtdIns4K. A Sph foi capaz de aumentar a fosforilação de proteínas residentes de MBL, particularmente da banda de ~55-60 kDa. O uso de inibidores de proteínas cinases sabidamente moduladas por Sph (proteína cinase dependente de Ca^{2+} (PKC), proteína cinase dependente de AMPc (PKA) e PKB/Akt) não afetou a ativação de PtdIns4K promovida por esse esfingolipídio, sugerindo uma ação direta da Sph na PtdIns4K, ou a participação de uma proteína cinase ainda não descrita. Esses dados nos mostram que a formação de PtdIns(4)P em MBL de túbulo proximal renal é dependente da atividade de uma PtdIns4K tipo II, compartimentalizada em microdomínios, sendo esta modulada pelo balanço entre os níveis de Sph/S1P, indicando importante papel das vias metabólicas de esfingo- e glicerolipídeos na rede regulatória de transportadores no epitélio renal.

ABSTRACT

Early studies from our laboratory have demonstrated the presence of membrane microdomains on the basolateral face of kidney proximal tubules cells (BLM). In addition, participation of these microdomains on the metabolism of phosphoinositides, mainly phosphatidylinositol-4-phosphate (PtdIns(4)P), that is involved in the regulation of different ion transporters, have not been clarified yet. The interaction between sphingolipids and PtdIns4K in the BLM fractions indicates a potential regulatory pathway for the control of PtdIns(4)P levels. In this study, we investigated some of the BLM-PtdIns4K functional properties. The formation of PtdIns(4)P is linear, being time- and protein concentration-dependent, when BLM is incubated with [γ - 32 P]ATP. The optimal pH observed for the PtdIns4K activity was in the range of 6.9-7.1, and the PtdIns(4)P formation depends on the presence of MgCl₂ in the medium. Furthermore, its insensibility to wortmannin, its inhibition by Ca²⁺ (at micromolar ranges), and also its molecular weight (57-62 kDa), indicate that the PtdIns(4)P formation in the BLM is due to a type II PtdIns4K activity. To verify if the BLM PtdIns4K is compartmentalized in these membranes, we had isolated microdomains-enriched fractions by using sucrose gradient and C₁₂E₉ (non-ionic detergent)-solubilized BLM. The PtdIns4K activity was measured in all the fractions (12) of the gradient, being 60% of the total PtdIns4K activity recovered in the low density fractions (3-5), which were immunopositive for caveolin-1, a marker of these lipid rafts. The interaction between sphingosine (Sph) and the PtdIns4K activity was also investigated, and we showed that Sph promoted a biphasic effect in the PtdIns4K activity, being concentrations up to 100 μ M Sph stimulatory, while higher concentrations (300-500 μ M) leads to a return to the basal activity, probably through the formation of Sph-1-phosphate. These results reinforce the interaction between Sph-kinase and PtdIns4K pathways. Sph was also able to promote the phosphorylation of BLM proteins, particularly the 55-60 kDa protein. Otherwise, the use of well-known inhibitor of different protein kinase activated by Sph (Ca²⁺-dependent protein kinase (PKC), cAMP-dependent protein kinase (PKA) and PKB/Akt), were ineffective in prevent the raise in the PtdIns4K activity, suggesting a either a direct action of Sph on PtdIns4K, or the involvement of a not related kinase activity in the BLM. Taking together the above data shown that the formation of PtdIns(4)P into BLM is due to a type II PtdIns4K, which is compartmentalized in membrane microdomains, being modulated by the balance between Sph and Sph-1-phosphate, indicating an important role for different pathways involving sphingo- and glycerolipids in a regulatory network based on the renal BLM.

SUMÁRIO

ABREVIACES USADAS	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OS MICRODOMÍNIOS DE MEMBRANA	7
2.1. SEPARAÇÃO LATERAL DE FASES E OS MICRODOMÍNIOS	8
2.2. OS MICRODOMÍNIOS CAVEOLARES	12
2.3. OS MICRODOMÍNIOS E OS EVENTOS DE SINALIZAÇÃO CELULAR	15
3. ESFINGOLIPÍDIOS	17
3.1 BASES ESFINGÓIDES E FISILOGIA CELULAR	22
4. OS FOSFOINOSITÍDEOS	26
4.1. METABOLISMO DOS FOSFOINOSITÍDEOS	29
4.1.1. AS FOSFATIDILINOSITOL CINASES E FOSFATASES	31
4.2. A FOSFOTIDILINOSITOL- 4 CINASE: ESTRUTURA E PROPRIEDADES CATALÍTICAS	34
4.2.1. REGULAÇÃO DA ATIVIDADE PTDNS4K E SEUS EFEITOS CELULARES	38
4.3. METABOLISMO DE FOSFOINOSITÍDEOS E OS MICRODOMÍNIOS DE MEMBRANA	40
5. OBJETIVOS	43
6. MATERIAL E MÉTODOS	44
6.1. OBTENÇÃO DE FRAÇÕES ENRIQUECIDAS EM MEMBRANA BASOLATERAL	45
6.2. DOSAGEM DE PROTEÍNAS	46
6.3. EXTRAÇÃO DE MICRODOMÍNIOS DE MEMBRANA	46
6.4. MEDIDA DA ATIVIDADE PTDNS4K	47
6.5. ELETROFORESE E IMUNODETECCÇÃO	48
6.6. ENSAIO DE FOSFORILAÇÃO DE PROTEÍNAS	49
6.7. BUSCA DE DOMÍNIOS FUNCIONAIS NA PTDNS4K	50
6.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA	50
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
8. CONCLUSÕES	85
9. REFERÊNCIAS	87
10. ANEXOS	104

ABREVIATURAS USADAS

$[\gamma^{32}\text{P}]$	isótopo radioativo de fósforo proveniente do ATP
$[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$	adenosina trifosfato marcado com isótopo radioativo de fósforo na posição γ
AMPC	adenosina monofosfato cíclico
Ca^{2+}	íon cálcio
DAG	diacilglicerol
Dhs	dihidroesfingosina ou esfinganina
DRM	membranas resistentes a solubilização em detergente
EGF	fator de crescimento de epiderme
IP_3	inositol-1,4,5-trifosfato
$\text{M}\beta\text{CD}$	metil- β -ciclodextrina
MBL	membrana basolateral
PDK1	proteína cinase-1 dependente de fosfoinosítideo
PIP_2	fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato
PKA	proteína cinase dependente de AMPC
PKB/Akt	proteína cinase B
PKC	proteína cinase dependente de Ca^{2+}
PtdIns	fosfatidilinositol
PtdIns(4)P	fosfatidilinositol-4-fosfato
PtdIns3K	fosfatidilinositol 3-cinase
PtdIns4K	fosfatidilinositol 4-cinase
S1P	esfingosina-1-fosfato
Sph	esfingosina
Wtm	wortmannina

1. INTRODUÇÃO

“It has to start somewhere

It has to start sometime

What better place than here?

What better time than now?”

Rage Against the Machine

(trecho da música *Guerrilla Radio*)

O conceito de homeostase, formulado pelo importante fisiologista francês Claude Bernard, considera que o meio no qual as células de um organismo se encontram, o chamado *milieu intérieur*, deve permanecer relativamente constante para o adequado funcionamento desse organismo. Certas propriedades desse meio – que nos organismos multicelulares corresponde ao meio extracelular – como pressão, volume, osmolaridade, pH e concentração iônica, entre outros, devem variar dentro de uma estreita faixa, que determina as condições de normalidade de um organismo (Malnic, 1999). Além disso, o próprio interior da célula deve permanecer constante, para que as funções celulares ocorram de modo adequado. Para isso, os organismos desenvolveram uma complexa barreira seletiva entre o meio intracelular e o meio extracelular, de forma que variações no meio extracelular não afetassem dramaticamente as condições do meio interno. De fato, o desenvolvimento de uma membrana semipermeável foi talvez o primeiro evento na origem das células (Alberts *et al.*, 2002). Sabemos hoje que as células de qualquer organismo são envoltas em uma bicamada lipídica, a membrana plasmática (Jacobson *et al.*, 1995).

Desde os primeiros estudos das propriedades físicas e constituição das membranas plasmáticas, diversos modelos foram apresentados: os que a descreviam como uma barreira estática entre o citossol e o meio extracelular; até os que a consideram estruturas extremamente dinâmicas, formadas por microdomínios com composição e função definida (Mayor & Rao, 2004; Lichtenberg *et al.*, 2005). Atualmente o modelo aceito de membrana plasmática (e todas aquelas que delimitam organelas intracelulares) é o formulado por Singer & Nicholson, em 1972. O assim chamado “modelo do mosaico fluído” determina que a membrana plasmática é composta por diferentes classes de lipídios, assim como diferentes

tipos de proteínas, embebidas em uma matriz lipídica bidimensional (Singer & Nicholson, 1972; Edidin, 2003). Essa membrana seria responsável por uma série de funções, como transporte de solutos, regulação do volume celular, movimento celular e comunicação com o meio externo (Alberts *et al.*, 2002).

A comunicação entre a célula e seu meio, ocorre pela interação de moléculas sinalizadoras, provenientes do meio externo, com receptores específicos, presentes na superfície celular. Nesse contexto, a membrana plasmática, antes imaginada como uma estrutura inerte, agora se mostra altamente dinâmica, participando em uma série de processos de transdução de sinais (como revisado em Edidin, 2003).

Dentre os componentes da membrana plasmática, podemos destacar os lipídios, que usualmente correspondem a 50% da área total de superfície da membrana. Em uma revisão sobre uma classe específica desses lipídios, Futerman & Hannun (2004) apontam para a importância dessas moléculas, tanto do ponto de vista quantitativo (há cerca de 10^9 moléculas de lipídios na membrana plasmática de um animal), quanto do ponto de vista funcional. Dentre as classes de lipídios, são três as principais (glicerolipídios, esfingolipídios e colesterol), sendo mais abundantes os fosfolipídios (que podem ser glicerolipídios ou esfingolipídios). Entretanto, considerando as inúmeras variações dentro de uma dessas classes (no tocante a tamanho da cadeia de ácidos graxos, grau e posição das insaturações, existência ou não de determinados grupamentos funcionais, entre outros) as seguintes questões podem ser levantadas: Cada espécie de lipídios possui função específica? Como o nível de cada espécie de lipídios é regulado? Como é determinada a distribuição intracelular desses lipídios? Como ocorre a reciclagem destes nas diferentes membranas de uma célula? (Futerman & Hannun, 2004).

A importância dessas moléculas na fisiologia da célula se torna mais evidente ao considerarmos que, os “*fosfolipídios e seus metabólitos são, de uma maneira ou de outra, fortemente acoplados a praticamente todo processo celular de interesse dos fisiologistas celulares (...)*” (revisto em Hilgemann, 2003). Além disso, novas evidências têm questionado o modelo de membranas proposto por Singer & Nicholson (1972), considerando a existência de regiões cuja composição é distinta do restante da membrana, sendo formada por lipídios e proteínas específicas (Anderson, 1998; Mayor & Rao, 2004). Essas estruturas, os microdomínios de membrana ou *rafts* lipídicos, teriam a capacidade de agrupar determinadas proteínas, favorecendo sua função ou inibindo sua atividade, sendo dessa maneira fundamentais para os eventos de sinalização celular, além de estarem envolvidas na captação de solutos (cálcio, colesterol, ácidos graxos) e no endereçamento de proteínas (Simons & Ikonen, 1997; Razani *et al.*, 2002; Lichtenberg *et al.*, 2005).

Em especial, enriquecimento de canais iônicos e transportadores ativos em microdomínios de membrana denotam o papel dessas estruturas na regulação do transporte de solutos e na regulação da composição do meio intracelular. Particularmente, os *rafts* lipídicos tem sido considerados importantes locais de regulação da homeostase do Ca^{2+} intracelular, estando esse íon envolvido na regulação de diversos eventos celulares (Isshiki & Anderson, 1999). A presença da Ca^{2+} -ATPase de membrana plasmática em microdomínios tem sido relatada em diferentes tipos celulares (Tachibana & Nawa, 1992; Fujimoto, 1993; Schnitzer *et al.*, 1995). Recentemente demonstramos, através de técnicas bioquímicas, que a Ca^{2+} -ATPase de membrana plasmática de túbulos renais é compartimentalizada em *rafts* lipídicos, sendo necessária a integridade desses microdomínios para o adequado funcionamento da bomba (Tortelote *et al.*, 2004). De fato, quando tratada com um

agente quelante de colesterol (metil- β -ciclodextrina, M β CD) a atividade Ca²⁺-ATPase é completamente abolida (Tortelote *et al.*, 2004). Além disso, já se mostrou que a ausência de uma proteína estrutural de microdomínios, a caveolina, promove alterações importantes na reabsorção renal de Ca²⁺, podendo levar quadros de hipercalcinúria e urolitíase (Cao *et al.*, 2003).

Quais seriam as moléculas envolvidas na regulação e manutenção da atividade ATPásica, em microdomínios de membrana? Notadamente, o metabolismo e função de importantes lipídios biologicamente ativos têm sido descritos em microdomínios de membrana, atribuindo a esses *rafts* uma nova função na fisiologia da célula (Igarashi & Michel, 2000; Jang *et al.*, 2001; Peres *et al.*, 2003). Particularmente, o metabolismo de fosfoinosítídeos é altamente compartimentalizado em microdomínios, sendo que diversas proteínas relacionadas com esses fosfolipídios se encontram também em *rafts* (Hope & Pike, 1996; Waugh *et al.*, 2001; Peres *et al.*, 2003). Um potente ativador da Ca²⁺-ATPase tanto de retículo sarco(endo)plasmático quanto de membrana plasmática é o fosfatidilinositol-4-fosfato (Missiaen *et al.*, 1989; Lehotsky *et al.*, 1992; Guilherme *et al.*, 1998), o que sugere que a formação deste fosfoinosítídeos também esteja relacionadas aos microdomínios. Além disso, a interação entre as vias metabólicas de esfingolipídios – constituintes de *rafts* – e os fosfoinosítídeos (especificamente, o PtdIns(4)P), já foi demonstrada em membranas isoladas de epitélio de túbulo proximal renal (Einicker-Lamas *et al.*, 2003) indicando uma importante via de regulação dos níveis de diferentes lipídios bioativos em membranas de túbulos renais.

Todos esses importantes elementos que potencialmente regulam a função renal – os microdomínios de membrana e seus lipídios constituintes, os

esfingolípídios e os fosfoinosítídeos – serão considerados nos capítulos que se seguem.

2. OS MICRODOMÍNIOS DE MEMBRANA

“Scientific research in a particular area is often marked by pivotal moments.

The ultrastructural identification of caveolae in the 1950s

and the cloning of each of the caveolin in the 1990s

are the two such moments in the caveolin field.

The next era of caveolin research has now just begun (...)”

Razani et al. (2002)

A superfície das células eucarióticas é composta de um complexo arranjo de moléculas, que funcionam como barreira seletiva, permitindo um acurado controle nas trocas de solutos, nutrientes e informações entre o meio interno e o meio extracelular (Alberts *et al.*, 2002). A organização espacial e estrutural da superfície celular – da matriz extracelular, até a membrana plasmática e o arranjo das proteínas do citoesqueleto – têm sido alvo de investigação a décadas, sendo algumas de suas peculiaridades já relativamente bem entendidas (ver Edidin, 2003; e Mayor & Rao, 2004, para revisão).

Recentemente, contudo, a organização espacial e estrutural da membrana plasmática, no que se refere à sua heterogeneidade lateral, tem chamado a atenção da comunidade científica. Essa organização lateral nas bicamadas lipídicas, denominadas *rafts* lipídicos ou microdomínios de membranas, tem sido exhaustivamente investigada, havendo diferentes modelos que tentam esclarecer sua formação, estrutura e função celular (Simons & Ikonen, 1997). Abordagens como membranas artificiais, uso de diferentes tratamentos para sua purificação e a identificação de inúmeras proteínas compartimentalizadas, tem nos ajudado a melhor entender o papel desses microdomínios na fisiologia das células (Anderson, 1998; Mayor & Rao, 2004). Nesse capítulo, faremos algumas considerações a respeito da estrutura, composição e função dos microdomínios de membrana.

2.1. SEPARAÇÃO LATERAL DE FASES E OS MICRODOMÍNIOS

Dentre os diferentes modelos propostos, o modelo do mosaico fluido é aquele atualmente aceito de organização de membranas biológicas. Esse modelo propõe que as membranas biológicas funcionariam como bicamadas lipídicas passivas, nas

quais diversas outras moléculas estariam embebidas (Singer & Nicholson, 1972). Nesse modelo, as interações entre diferentes moléculas (lipídio-lipídio, lipídio-proteína, ou proteína-proteína) teriam caráter meramente aleatório, consistente com a idéia de movimento Browniano dessas moléculas (Procópio-Araújo, 1999).

Contudo, diversas outras observações da membrana plasmática têm considerado arranjos mais complexos da bicamada lipídica. A hipótese dos microdomínios de membrana considera que uma organização lateral funcional pode ocorrer na membrana plasmática, o que sugere algum nível de regulação (Simons & Ikonen, 1997). Tem-se como base para a formação desses microdomínios a idéia de que lipídios específicos interagiriam entre si, formando plataformas que segregariam determinadas proteínas, favorecendo a ligação destas com agonistas ou com outras proteínas relevantes para sua função (Kurzchalia & Parton, 1999; Kenworthy, 2002). Essas interações entre lipídios cujas cadeias acilas são usualmente longas e saturadas (ver capítulo 3. ESFINGOLIPÍDIOS), e a molécula de colesterol faz com que esses agregados de lipídios formem fases líquidas ordenadas (L_o), de baixa fluidez e densidade, comparada com o restante da membrana plasmática, que formam uma fase líquida desordenada (L_d) (Shogomori & Brown, 2003; Lichtenberg *et al.*, 2005). São essas propriedades que permitiram o isolamento/enriquecimento dos microdomínios, possibilitando a determinação de sua composição e a caracterização bioquímica dessas estruturas (Razani *et al.*, 2002; Shogomori & Brown, 2003).

Diversos modelos de microdomínios são observados na literatura, sendo os mais recorrentes aqueles que consideram que: (1) os microdomínios são estruturas relativamente grandes, pré-formadas, ricas em esfingolipídios e colesterol (Simons & Ikonen, 1997); (2) os microdomínios são pequenos agrupamentos de lipídios associados com determinadas proteínas, sendo que a interação entre esses

agrupamentos em estruturas funcionais seria um processo dinâmico (Anderson & Jacobson, 2002); e (3) a membrana plasmática seria um mosaico de microdomínios, onde a célula regularia o tamanho e composição desses *rafts* pré-existentes (Maxfield, 2002) (Figura 2.1).

Mayor & Rao (2004), fazendo um apanhado de estudos utilizando diversos modelos de membranas artificiais e medidas termodinâmicas (*differential scanning calorimetry*), de difusão (*fluorescence recovery after photobleaching*) e espectroscópicas (*fluorescence energy transfer*), entre outros, sugerem um outro modelo de microdomínios de membrana, considerando que: (1) em células vivas, os agrupamentos de lipídios e proteínas devem existir como pequenos e dinâmicos microdomínios, o que implicaria em uma diversidade de composições destes; e (2) os microdomínios funcionais (plataformas estáveis e de maior tamanho), formado pela interação entre os diversos agrupamentos de lipídios e proteínas, seriam induzidos por eventos intra ou extracelulares. Este modelo é apresentado na Figura 2.1D.

O modelo como proposto por Mayo & Rao (2004) encontra suporte nas evidências de que o entorno lipídico de uma proteína (quantidade e qualidade dos lipídios que interagem diretamente com uma proteína integral de membrana) determina a função e localização desta (Jensen & Mouritsen, 2004). Pensando que, em membranas funcionais *in vivo*, a mobilidade lateral é uma importante propriedade, uma estrutura estática formada por domínios pré-existentes não condiz com a complexidade das funções da membrana (Jensen & Mouritsen, 2004). Sendo assim, fica a ser estabelecido a dinâmica espaço-temporal das interações lipídio-lipídio e lipídio-proteína que formarão os microdomínios (Kurzchalia & Parton, 1999; Jensen &

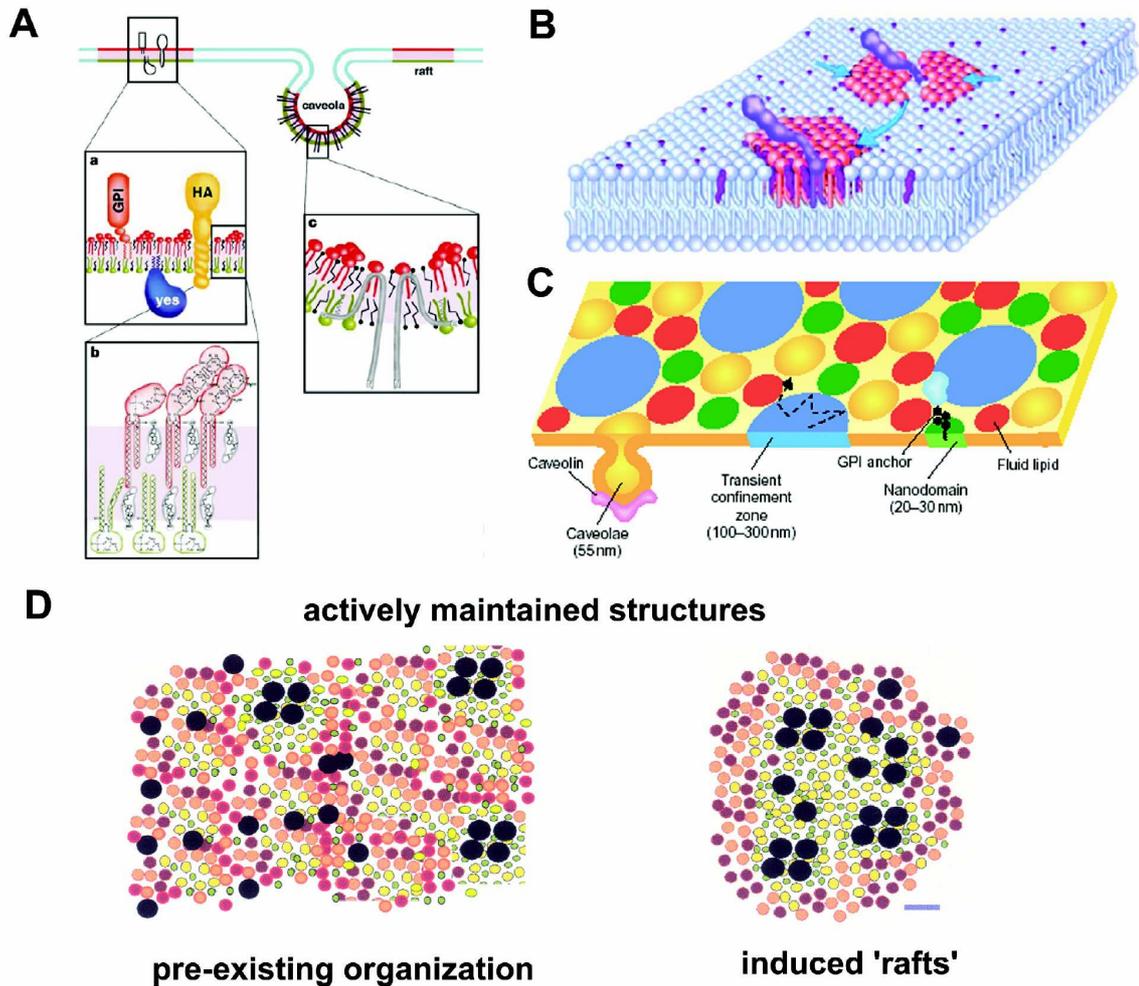


Figura 2.1. Alguns dos modelos propostos para a existência de microdomínios de membrana nas células *in vivo*. (A) *rafts* como grandes estruturas pré-existentes, enriquecidas em determinadas proteínas; (B) microdomínios seriam formados por agrupamentos de proteínas cujo entorno lipídico favoreciam sua interação; (C) a membrana plasmática como um “mosaíco de *rafts*” pré-existentes; (D) *rafts* pré-existentes seriam de pequeno tamanho, sendo agrupados em *rafts* maiores e funcionais após estímulo intra ou extracelular. De Mayor & Rao (2004).

Mouritsen, 2004; Mayor & Rao, 2004).

Entre as forças físicas envolvidas com as interações lipídio-proteína, que de certa forma devem regular a formação dos microdomínios, estão a equivalência hidrofóbica e as forças de pressão lateral (Lee, 1998; Jensen & Mouritsen, 2004; van der Brink-van der Laan *et al.*, 2004). Essas forças irão determinar primeiramente a composição do entorno lipídico de uma determinada proteína, alterando sua conformação, atividade e localização subcelular (Lee, 1998; Jensen & Mouritsen, 2004; Cascio, 2005).

2.2. OS MICRODOMÍNIOS CAVEOLARES

Apesar do exposto no tópico anterior, a presença de domínios laterais pré-existent em membranas biológicas não pode ser descartada. Nos anos 50, Yamada já havia descrito em tecido epitelial o que chamou de “pequena bolsa, vesícula, caverna ou recesso comunicantes com o exterior da célula” (Yamada, 1955). A partir daí o termo *cavéola* (de *little caves*), tem sido usado como referência para essas pequenas invaginações na membrana plasmática, de aproximadamente 50-100 nm. Um dos avanços mais significativos para o entendimento das propriedades desses microdomínios foi a identificação de uma família de proteínas marcadoras dessas regiões da membrana, as caveolinas (Anderson, 1998). Tem-se então a definição de dois tipos de microdomínios de membrana, os caveolares (que apresentam a caveolina como proteína estrutural), e os chamados microdomínios não-caveolares (onde não há presença de caveolina).

A composição das cavéolas e dos *rafts* não-caveolares é, em princípio, idêntica (com exceção da presença das caveolinas), contendo altos níveis de

esfingolípídios e colesterol. Além dos esfingolípídios, as cavéolas são também enriquecidas em glicolípídios, em particular glicosilfosfatidilinositol – as chamadas âncoras de GPI, que funcionam como âncora para uma série de proteínas presentes na face externa da membrana plasmática (Kurzchalia & Parton, 1999). A presença desses lipídios confere aos microdomínios (caveolares ou não) sua resistência a solubilização por detergentes não-iônicos, devido às forças de interação entre as cadeias acilas, longas e saturadas (Shogomori & Brown, 2003), o que levou esses domínios a serem também chamados membranas resistentes à detergente (*detergent-resistant membranes*, ou DRM).

A molécula de colesterol possui importante papel na redução da fluidez dos microdomínios, o que faz com que estes se encontrem em um estado L_o , como já mencionado. Além disso, sua associação com a caveolina estabiliza a inserção dessa proteína na membrana plasmática, onde irá desempenhar diversas funções. A relação entre as cavéolas e o colesterol vai além das associações estruturais, havendo uma dependência mútua, evidenciada pela disfunção do metabolismo de colesterol quando a expressão de caveolina é prejudicada, e a desestruturação das cavéolas, quando na presença de drogas que interferem com o conteúdo de colesterol das membranas (Anderson, 1998; Razani *et al.*, 2002).

Em uma busca por proteínas fosforiladas em resíduos de tirosina, em fibroblastos infectados, Glenney & Zokas (1989) identificaram uma proteína de 22 kDa, que parecia se distribuir de forma não homogênea na membrana plasmática dessas células. Mais tarde, trabalhos de Rothberg e colaboradores (1992) concluíam que essa proteína estava intrinsecamente relacionada as cavéolas, sendo de fato sua principal componente estrutural, conseqüentemente denominada caveolina. Em uma outra abordagem, Kurzchalia *et al.* (1992) isolaram e clonaram uma proteína, a

VIP-21 (*vesicular integral protein* de 21 kDa), envolvida com o tráfego intracelular de vesículas. Glenney (1992) por sua vez, verificou que essa proteína tinha a sua seqüência idêntica a da caveolina. A partir daí uma série de trabalhos foram realizados na tentativa de esclarecer os papéis desempenhados por essa proteína multifuncional (Anderson, 1998; van Deurs *et al.*, 2003).

A caveolina é codificada por três genes distintos, que, considerando os *splicing* alternativos, codificam um total de seis proteínas (caveolina-1 α , -1 β , -2 α , -2 β , -2 γ e -3) (van Deurs *et al.*, 2003). As caveolinas-1 e -2 possuem expressão bastante abrangente, estando presentes em adipócitos, células endoteliais, pneumócitos, entre outros, enquanto a expressão de caveolina-3 é restrita aos tecidos musculares liso, cardíaco e esquelético (revisto em Razani *et al.*, 2002).

A informação a respeito da estrutura, topologia e função das caveolinas vem de estudos da caveolina-1. Composta por cerca de 178 aminoácidos, a caveolina-1 possui domínios estruturais bem definidos, o N-terminal (resíduos 1-81), o domínio de inserção na membrana (102-134), e o C-terminal (resíduos 135-178). Além destes, há um domínio próximo do N-terminal (resíduos 82-101), chamado *scaffolding domain*, de grande importância, sendo o domínio de interação da caveolina-1 com diversas outras moléculas, como proteínas sinalizadoras e proteínas do citoesqueleto (Stahlhut & van Deurs, 2000; Liu *et al.*, 2002). Uma propriedade interessante da caveolina-1 é a formação de grandes homo-oligômeros, compondo um complexo protéico de até 350-400 kDa . Esses complexos podem conter de 14-16 moléculas de caveolina-1, associadas entre si pela chamada região de oligomerização, que compreende os resíduos 61-101, dentro do *scaffolding domain* (revisto em Razani *et al.*, 2002). Contudo, em membranas biológicas o que observamos é a formação de complexos hetero-oligoméricos, formada pelas

interações entre a caveolina-1 e -2. De fato, em condições fisiológicas, sugere-se que há uma interação constitutiva entre essas duas proteínas. Apresentando uma alta similaridade de seqüência primária com a caveolina-1, a caveolina-3 também parece se oligomerizar em um complexo de 350-400 kDa, contudo, não interage com nenhuma das outras caveolinas (revisto em Razani *et al.*, 2002; van Deurs *et al.*, 2003).

2.3. Os MICRODOMÍNIOS E OS EVENTOS DE SINALIZAÇÃO CELULAR

Das inúmeras funções atribuídas atualmente aos microdomínios de membrana, entre estas, a captação celular de ácidos graxos (Koonen *et al.*, 2005), tráfego intracelular de vesículas (van Deurs *et al.*, 2003), metabolismo celular de colesterol (Liu *et al.*, 2002), oncogênese e tumorigênese (Razani *et al.*, 2002), uma das mais importantes, e que se relaciona com todas as outras, é sua participação nos processos de transdução de sinais (Anderson, 1993; Anderson, 1998; Kurzchalia & Parton, 1999). Entre as várias moléculas já encontradas em microdomínios – seja de forma constitutiva, seja de modo transitório – diversas estão envolvidas em fenômenos de sinalização celular, atuando como receptores, moléculas de ancoragem, ou proteínas efetoras (Huang *et al.*, 1997; Anderson, 1998; Liu *et al.*, 2002).

Diversas vias de sinalização já foram descritas como presentes e ativas em microdomínios. Merecem destaque o envolvimento desses microdomínios na compartimentalização de receptores acoplados à proteínas G (GPCR), favorecendo a interação entre os vários elementos de uma cascata de sinalização (Ostrom, 2002). Já foi demonstrado que esses receptores podem ser constitutivos de

microdomínios, como parece ser o caso do receptor de EGF (Jang *et al.*, 2001; van Deurs *et al.*, 2003), ou podem ser translocados para essas regiões, como já observado para o receptor EDG₁ e o receptor de bradicinina (Igarashi & Michel, 2000; Sabourin *et al.*, 2002). Além disso, outros receptores, relacionados com atividade tirosina cinase e com a família das proteínas cinases¹ ativadas por mitógeno (MAPK), também já foram encontrados em cavéolas (revisto em Anderson, 1998; Shaul & Anderson, 1998). A participação desses microdomínios na sinalização por fosfolipídios bioativos também já foi alvo de diversas investigações (Hope & Pike, 1996; Bodin *et al.*, 2001; Jang *et al.*, 2001; Waugh *et al.*, 2001). Discorreremos sobre as vias de sinalização ativadas por lipídios bioativos e seus metabólitos, particularmente a via dos fosfoinosítídeos, mais adiante (seção 4.4. METABOLISMO DE FOSFOINOSÍTÍDEOS E OS MICRODOMÍNIOS DE MEMBRANA).

¹ Do inglês *kinase*. O radical grego *kine* é sempre traduzido em português para *cine*. A grafia *quinase*, apesar de comum, não é adequada, pois o radical *quin-*, em português, faz referência ao número cinco.

3. ESFINGOLIPÍDIOS

*“Cell membranes and lipids
are indeed crucial to the life of
the cell, but as many famous and wise
people have said before us,
`the devil is in the details`.
And the details are complicated.”*

Futerman & Hannun (2004)

A molécula que serve de arcabouço principal para os esfingolipídios é a ceramida (Cer), sendo esta composta por uma base esfingóide associada à um grupo acila, via ligação amida (Figura 3.1). Essa descrição não considera, porém, a complexidade estrutural dessa classe de lipídios. Já foram descritas mais de uma base esfingóide (variando no que se refere ao comprimento da cadeia, grau e posição das insaturações, e hidroxilações), vinte diferentes espécies de ácidos graxos associados, e pelo menos quinhentas estruturas de carboidratos distintas (revisto em Futerman & Hannun, 2004).

Entretanto, a base esfingóide comumente encontrada em mamíferos é a 1,3-dihidroxi-2-amino-4-octadeceno, ou simplesmente, esfingosina (Sph). Esse lipídio possui um comprimento de dezoito a vinte carbonos, contendo em sua estrutura uma insaturação no carbono C4, na configuração *trans*, importante para a sua atividade biológica (Liao *et al.*, 2005). Ainda, a presença de dois carbonos assimétricos conferem denominações distintas à base esfingóide, sendo os prefixos D- e L- referentes ao carbono C3, e os prefixos *eritro-* e *treo-*, referentes à assimetrias no carbono C2 (Koynova & Caffrey, 1995). Esfingolipídios de origem biológica geralmente apresentam uma configuração estereoquímica *D-eritro* (Liao *et al.*, 2005).

Há, porém, a ocorrência natural de diversas outras bases esfingóides, dependendo do organismo, ou mesmo do tecido em questão. Como exemplo, dihidroesfingosina (Dhs), ou esfinganina, pode também ser encontrada em níveis significativos em mamíferos e leveduras, sendo um importante intermediário na síntese de esfingolipídios pela via *de novo* (ver adiante). Em organismos inferiores e plantas a *D-ribo*-fitoesfingosina (phyto-Sph, ou 4-hidroxiesfingosina) é a base esfingóide mais comum (Koynova & Caffrey, 1995), sendo também encontrada

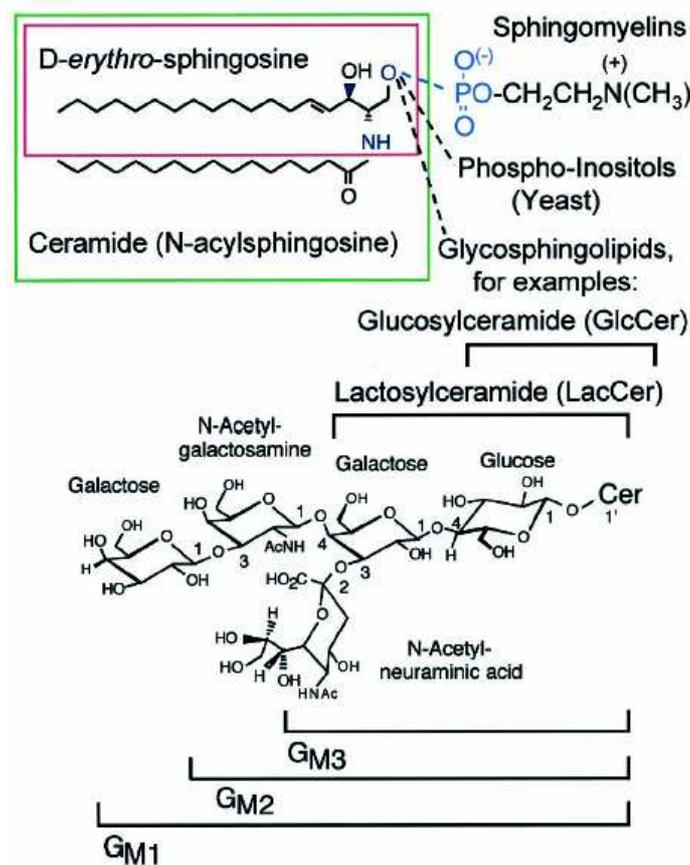


FIGURA 3.1. Estrutura dos esfingolípídios mais comuns. A esfingosina (no inglês *D-erythro-sphingosine*) é mostrado no quadro vermelho, com a cadeia acila formando a ceramida (no inglês *ceramide* ou *N-acylsphingosine*) no quadro em verde, e o grupo fosfato (em azul), formando esfingosina-1-fosfato. Modificações na cabeça polar formam os esfingolípídeos complexos. *Sphingomyelins*: esfingomielina; *Phospho-inositols (Yeast)*: fosfoinositóis (leveduras); *Glycosphingolipids*: glicoesfingolípídeos, como exemplo são mostradas as estruturas que dão origem à glicosilceramida (*glucosylceramide*), lactosilceramida (*lactosylceramide*) onde podem ser identificadas as moléculas de glicose (*glucose*), galactose e a acetil-galactosamina (*N-acetyl-galactosamine*). A adição de um ácido silálico (*N-acetyl-neuraminic acid*) dá origem aos gangliosídeos GM3, GM2 e GM1 (de Smith & Merrill, 2002).

em níveis elevados no tecido renal e intestino (Barenholz & Thompson, 1980). Organismos marinhos têm o 4,8-esfingadieno como base esfingóide comum (Koynova & Caffrey, 1995). Na Figura 3.2, vemos algumas das bases esfingóides mais comuns.

Os esfingolipídios podem ser ainda divididos em classes e subclasses, sendo estes (1) bases esfingóides e seus derivados simples (ex., esfingosina-1-fosfato), (2) ceramidas, compostas por bases esfingóides associadas, via ligação amida, a um ácido graxo (usualmente saturado ou monoinsaturado, hidroxilado em C2 e composto por cerca de 14-22 carbonos) e (3) esfingolipídios complexos.

A enorme diversidade estrutural entre os esfingolipídios se reflete nas diversas funções das diferentes espécies moleculares presentes no organismo. Evidenciam-se, com isso, mecanismos bioquímicos e celulares complexos e altamente organizados, que garantem a regulação dos níveis dessas moléculas, sua interconversão e, conseqüentemente, seu efeito na fisiologia celular (Futerman & Hannun, 2004).

A via bioquímica e a topologia das enzimas envolvidas no metabolismo de esfingolipídios é relativamente bem conhecida (Futerman & Riezman, 2005), sendo notável a enorme similaridade entre praticamente todos os organismos eucariotos (Coward & Hannun, 2005). Considerando o metabolismo de esfingolipídios tendo como molécula central a Cer, podemos descrever três vias específicas, todas elas interligadas: (1) síntese de esfingolipídios pela via “*de novo*”, no retículo sarco(endo)plasmático, através da condensação de uma serina com um ácido palmítico, dando origem a uma base esfingóide; (2) a via de síntese de esfingolipídios complexos, que ocorre no aparelho e Golgi, e tem como molécula

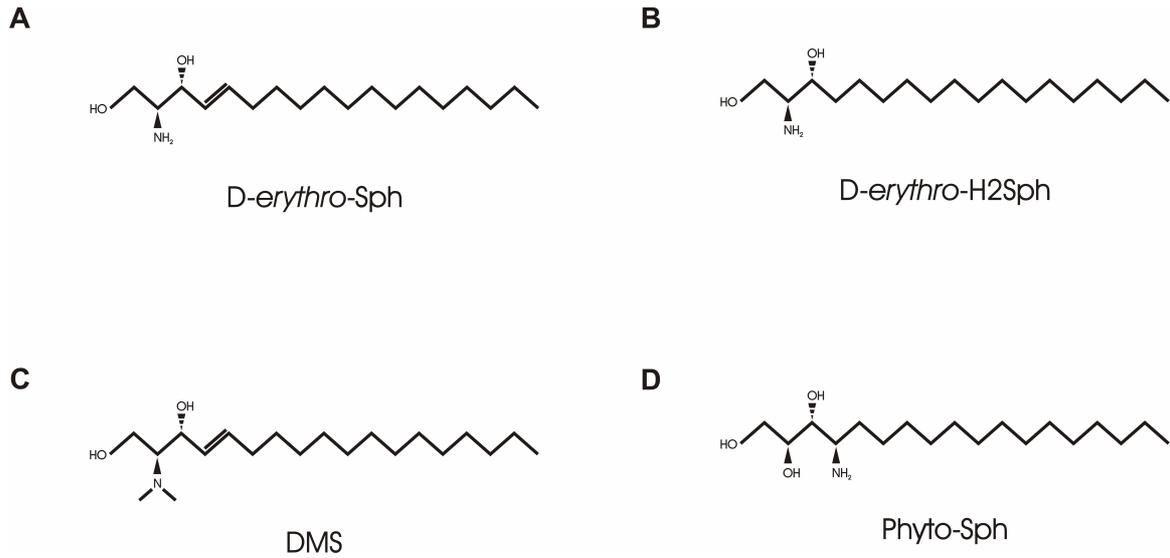


FIGURA 3.2. Estrutura de algumas das bases esfingóides mais comuns. (A) esfingosina, (B) dihidro-esfingosina, (C) dimetil-esfingosina, (D) fitoesfingosina.

precursora a Cer; e (3) a degradação desses esfingolípídios complexos (principalmente a esfingomielina, SM) à Cer e a posterior metabolização desta em outras bases esfingóides (Hannun & Obeid, 2002; Kolesnick, 2002).

3.1. BASES ESFINGÓIDES E FISIOLÓGIA CELULAR

Os estudos que indicam a participação da Sph como moléculas chave na regulação de eventos celulares não são tão numerosos quanto aqueles que elucidam os mecanismos de ação da Cer e da S1P, por exemplo. Entretanto, sabe-se que *in vivo*, os níveis de bases esfingóides formadas pela síntese *de novo* é negligenciável, sendo a metabolização de Cer, pela ação de esfingomielinases (SMases), a principal fonte de bases esfingóides em condições normais (Hannun *et al.*, 2001).

Existe o conceito bem estabelecido de que o balanço entre determinados esfingolípídios determina o evento celular a ser desencadeado (Kolesnick, 2002; van Meer & Lisman, 2002). Especificamente, o balanço entre os níveis de Cer e Sph e de S1P é determinante da sobrevivência da célula, uma vez que tanto Cer quanto Sph são clássicos promotores de morte celular programada, enquanto a S1P esta associada a proliferação e crescimento celular (Kolesnick, 2002).

Alguns estudos evidenciam a ação da Sph como agente pró-apoptótico. Tolan *et al.* (1996), sugerem o uso de Sph e seu análogo saturado, a Dhs, como potenciais agentes farmacológicos, dada a sua ação inibitória em proteínas da família das MAPK, ERK1 e ERK2. Eles observaram em células de músculo liso de vias aéreas que a ativação das ERK1 e 2 por PDGF ou por bradicinina eram abolidos na presença de Sph ou Dhs (Tolan *et al.*, 1996). A hidrólise de S1P também tem se

mostrado uma importante via de formação de bases esfingóides (Spiegel & Merrill, 1996). Mandala *et al.* (2000), superexpressando uma S1P fosfatase em células NIH 3T3 observaram que, além da redução dos níveis de S1P com concomitante elevação nos níveis de Sph, houve um aumento do número de células apoptóticas. Já Gennero *et al.* (2002) observaram um efeito apoptótico da S1P em células mesangiais em cultura. Investigando o fenômeno, foi determinado que esse efeito só era observado em culturas com baixa densidade de células (2×10^4 células/cm²), onde a hidrólise de S1P e a formação de Sph era extremamente elevada (Gennero *et al.*, 2002). Ainda em tecido renal, Iwata *et al.* (1995) sugerem um efeito citotóxico da Sph, nesse caso não através de apoptose, mais promovendo necrose celular. Ahn & Schroeder (2006) observaram em células HT-29 (de câncer de colón humano) que uma importante via pró-apoptótica, que leva a ativação de JNK2/JNK1, é estimulada por Dhs, quando em concentrações micromolares. A aparente função da Sph (e de outras bases esfingóides) na inibição de crescimento celular e promoção de apoptose deve, contudo, levar em consideração que esse fenômeno é dependente do tipo celular investigado, já que, em outros sistemas, é visto que a Sph possui forte ação mitogênica e de crescimento celular (Hannun & Linardic, 1993; Spiegel & Merrill, 1996).

Historicamente, a Sph foi identificada como uma importante inibidora da atividade da proteína cinase dependente de cálcio, a PKC (Hannun *et al.*, 1986; Smith *et al.*, 2000). Além dessa clássica ação inibitória sobre a PKC, foi demonstrado posteriormente que a Sph é também capaz de inibir uma ácido fosfatídico fosfolipase, além de ativar uma fosfolipase D e estimular a DAG cinase, sugerindo importante papel desse esfingolípido no “desligamento” da via de ativação DAG/PKC (Hannun & Linardic, 1993; Riboni *et al.*, 1997; Hannun *et al.*,

2001). Outras proteínas cinases, como a caseína cinase e cinase ativada por p21, também já foram identificadas como proteínas alvo da Sph (McDonald *et al.*, 1991; Hannun *et al.*, 2001). Uma nova classe de proteínas cinases, envolvidas com a fosforilação da família de proteínas 14-3-3, já foram descritas como cinases-dependentes de Sph (Megidish *et al.*, 2000). Contudo, Ma *et al.* (2005) demonstraram que, na verdade, essa fosforilação era decorrente da ativação de uma PKA por Sph, de forma atípica, não dependente de AMPc. Foi observado que, em macrófagos alveolares, a alta atividade da CDase estava relacionada com um maior tempo de vida dessas células (Monick *et al.*, 2004). Nesse estudo, os autores mostram que a via de ativação das ERKs, ficava prejudicada quando na presença de N-oleiletanolamina (NOE), um inibidor da atividade CDase (Monick *et al.*, 2004). Um achado importante foi feito por King e colaboradores (2000), que, em seu trabalho, demonstraram que a Sph seria um importante fator na ativação da cinase tipo I dependente de fosfoinosítídeos (*phosphoinositide-dependent kinase 1*, ou PDK1), uma enzima chave na regulação da atividade das proteínas cinases da família ABC (Newton, 2003).

A interação da via de metabolismo de esfingolipídios com outras classes de lipídios também se mostra uma importante via de ação de bases esfingóides, a exemplo da via do DAG/PKC. Notadamente, a regulação dos níveis de fosfoinosítídeos por Sph já foi demonstrado em plaquetas (Hashizume *et al.*, 1996) e frações de membrana de túbulos renais (Einicker-Lamas *et al.*, 2003). Recentemente, Kobaiyashi *et al.* (2005) na caracterização de genes relacionados à resistência a miriocina (um análogo de esfingolipídios, derivado de fungos, com ação inibitória na serina-palmitoil transferase – enzima chave na síntese *de novo* de esfingolipídios (ver Liao *et al.*, 2005) – isolaram o gen *MSS4* de levedura, que

codifica uma fosfatidilinositol-4-fosfato 5-cinase, que converte fosfatidilinositol-4-fosfato em fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato, um importante lipídio sinalizador.

Apesar desses avanços, o entendimento dos mecanismos de ação das bases esfingóides – à exceção da S1P, cuja identificação de seus receptores específicos garantiu grandes avanços na compreensão de sua função – ainda está por ser elucidada. A existência de ferramentas farmacológicas (como antagonistas de enzimas da síntese *de novo*) que possibilitam manipular os níveis endógenos de determinados esfingolipídios (Menaldino *et al.*, 2003), assim como a identificação e clonagem de quase todas as enzimas envolvidas no seu metabolismo (Futerman & Riezman, 2005), permitirão o uso de novas abordagens para o estudo dessa complexa classe de lipídios.

4. Os FOSFOINOSITÍDEOS

“The phosphorylation of protein has long been regarded as the star mechanism of signal transduction. So why locus on the phosphorylation of phosphoinositides? Basically, because they’re better than binary.”

Overduin *et al.* (2001)

Além dos esfingolipídios, outro importante lipídio presente nas diferentes membranas celulares é o fosfatidilinositol (PtdIns, Figura 4.1), fosfolipídio que ocorre em animais, plantas, fungos e ainda algumas bactérias, e cuja cabeça polar é uma molécula de *myo*-inositol (revisto em Gardocki *et al.*, 2005). O PtdIns é, por sua vez, precursor de outras moléculas, como PtdIns mono- e poli-fosfatos, inositol mono- e poli-fosfato, além de alguns esfingolipídios complexos (Nikawa & Yamashita, 1997; Gardocki *et al.*, 2005). O PtdIns, ou 1,2-diacilglicerol-3-fosfato-1'-*myo*-inositol, ocorre em todos os tecidos já observados, sendo notadamente maior sua concentração em tecido neural (Rossiter, 1968). No que diz respeito ao presente estudo, trataremos dos derivados fosforilados do PtdIns, chamados coletivamente de fosfoinositídeos.

Presentes no folheto citossólico da bicamada lipídica, os fosfoinositídeos são pouco abundantes, perfazendo somente 2-20 % dos fosfolipídios totais de membrana – dependendo do tipo celular e dos métodos utilizados para quantificação – sendo porém essenciais a sobrevivência de um organismo (Chapelle & Gilles-Baillien, 1983; Antonsson, 1997), por estarem envolvidos na regulação de importantes eventos celulares, como ancoragem de proteínas nas diferentes membranas da célula (Nikawa & Yamashita, 1997), alteração nas propriedades de transporte através da membrana, através da regulação de canais e transportadores ativos (Hawthorne, 1964; Balzer-Yost & Nofziger, 2005), além de aumentar a atividades de ATPases do tipo P, transportadoras de íons (Starling *et al.*, 1995, Guilherme *et al.*, 1998), tráfego intracelular de vesículas (Cockcroft & De Matteis, 2001; Czech, 2003), processos de endocitose e exocitose (Odorizzi *et al.*, 2000; Takenawa & Itoh, 2001), rearranjo do citoesqueleto (Takenawa & Itoh, 2001), exportação de mRNA do núcleo (Gardocki *et al.*, 2005), entre outros.

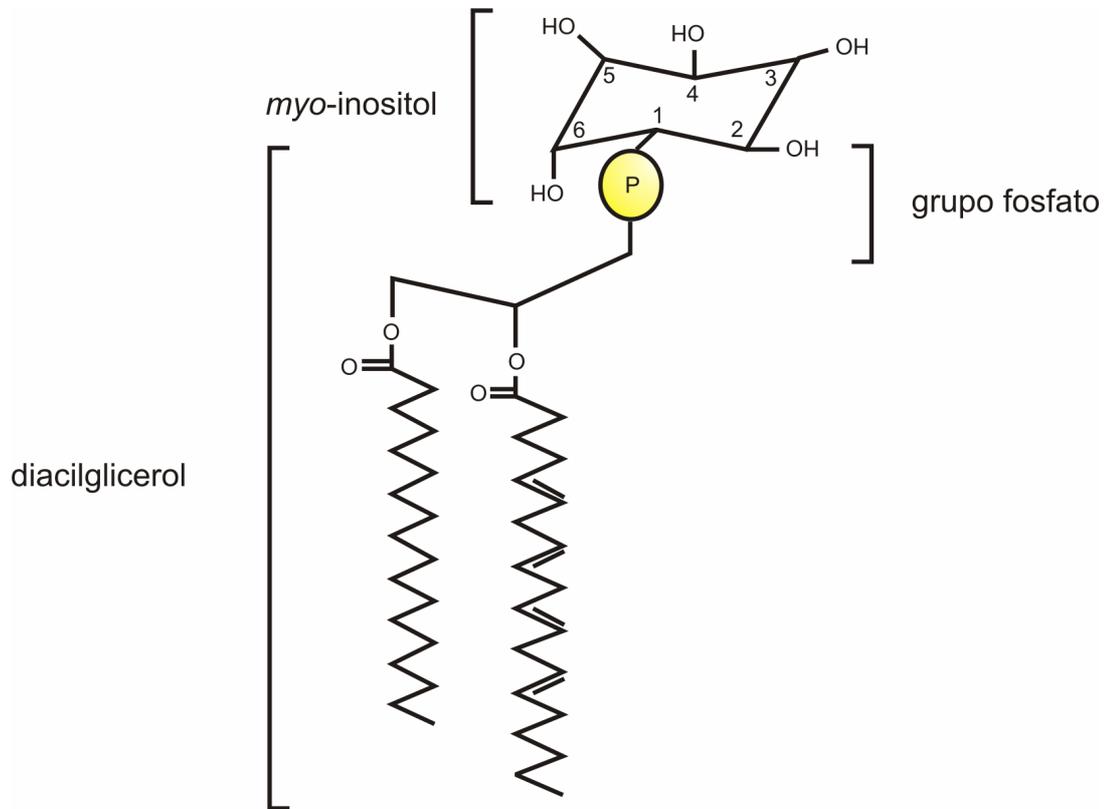


Figura 4.1. Estrutura do fosfatidilinositol (PtdIns), cuja base é composta por uma molécula de diacilglicerol, e sua cabeça polar, por uma molécula de *myo*-inositol, associados através de uma ligação fosfodiéster (adaptado de Lang, 2003).

Inicialmente, o interesse pelos fosfoinosítídeos era focado unicamente na geração de segundos mensageiros intracelulares. Mais especificamente, a demonstração pelo grupo do Dr. Yatsutomi Nishizuka, no final dos anos 70, e do grupo do Dr. Michael Berridge, nos anos 80, de que a hidrólise da molécula de fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP_2) gerava diacilglicerol (DAG) e inositol-1,4,5-trifosfato (IP_3), que levavam a ativação de uma proteína cinase dependente de cálcio (PKC), e a aumentos da concentração intracelular de cálcio, respectivamente, atraiu a atenção de grande parte dos pesquisadores (revisto em Nishizuka, 1992, e Berridge, 1997). Entretanto, a descoberta de domínios de reconhecimento e ligação de fosfoinosítídeos mono- e poli-fosfatos em uma série de proteínas, que permitiria seu recrutamento para as diferentes membranas celulares e a conseqüente regulação de sua atividade (Overduin *et al.*, 2001), trouxe uma nova dimensão ao estudo do metabolismo de fosfoinosítídeos. Dentro deste contexto, fica cada vez mais evidente que tanto desequilíbrios nos níveis de determinados fosfoinosítídeos quanto mutações ou deleções nos seus domínios de ligação em proteínas podem suscitar graves patologias no organismo (Overduin *et al.*, 2001; Pendaries *et al.*, 2003).

4.1. METABOLISMO DOS FOSFOINOSÍTÍDEOS

O conceito que vigorava inicialmente a respeito dos fosfoinosítídeos era de que estes não passavam de componentes inertes, estruturais, das membranas biológicas. Entretanto, esse conceito mudou, uma vez demonstrado o complexo metabolismo responsável pela regulação dos níveis dessas moléculas em diferentes tipos celulares. Merece destaque os trabalhos do casal Hokin, que nos anos 50 nos

deram a primeira evidência de regulação dos níveis de fosfolipídios por interação de hormônios com seus receptores (Hokin & Hokin, 1953; Hokin & Hokin, 1958). Em seu trabalho, Hokin & Hokin (1953) observaram que, quando estimuladas por acetilcolina, fatias de pâncreas incorporavam sete vezes mais ^{32}P que fatias não estimuladas, e que esta incorporação do ^{32}P ocorria principalmente em fosfoinosítídeos.

A partir desses trabalhos, postulou-se a existência de um *pool* de fosfoinosítídeos envolvidos em processos de sinalização celular, cujo metabolismo seria influenciado por diversos fatores externos (também chamado de *pool* hormônio-sensível), e outros (hormônio-insensível) relacionados com diversas outras funções (Antonsson, 1997).

O que torna os fosfoinosítídeos particularmente atraentes como mediador de processos como a transdução de sinal e tráfego de membranas é a sua cabeça polar “multifuncional”, pois a molécula de *myo*-inositol pode ser fosforilada em diferentes posições (no C3, C4 e C5), e em diferentes combinações, o que faz com que os fosfoinosítídeos possam existir em pelo menos sete formas distintas: o PtdIns(3)P; PtdIns(4)P; PtdIns(5)P; PtdIns(3,4)P₂; PtdIns(3,5)P₂; PtdIns(4,5)P₂; e PtdIns(3,4,5)P₃

Merece destaque o fato de que, após a mobilização e mesmo hidrólise dos diferentes fosfoinosítídeos, promovida por estímulos extracelulares, o *pool* de PtdIns mono- e polifosfato da membrana plasmática deve ser rapidamente repostado, mantendo os níveis basais desses lipídios na membrana (Antonsson, 1997). Isso pode ocorrer pela síntese *de novo* de PtdIns, via ação da fosfatidilinositol síntase (PIS) na própria membrana plasmática. Contudo, a presença dessa enzima na membrana plasmática ainda é questão de debate (Antonsson, 1997). O modo mais caracterizado de reabastecimento de PtdIns é através do transporte do retículo

sarco(endo)plasmático para a membrana plasmática, via proteínas especiais chamadas fosfoinosítideo transferases (PITP) (Cockcroft & De Matteis, 2001; Vance & Vance, 2005), que possuem afinidade tanto para fosfoinosítídeos quanto também para fosfatidilcolina, funcionando ainda como um transportador de esfingomiéline (Vance & Vance, 2005).

As ações biológicas atribuídas aos fosfoinosítídeos são possíveis graças a existência de domínios funcionais, encontrados em várias proteínas e conservados em famílias de proteínas, capazes de interagir com maior ou menor afinidade com os diferentes fosfoinosítídeos (Parker, 2004). De maneira geral, a interação das proteínas com os fosfoinosítídeos, através desses domínios, confere potencial de recrutamento para as diferentes membranas da célula, regulando a localização subcelular de uma determinada proteína, e também a sua atividade, seja por alterar a disponibilidade de substratos, seja acarretando em mudanças conformacionais, afetando diretamente suas propriedades catalíticas (Cockcroft & De Matteis, 2001; Parker, 2004). Uma vez que um dado domínio possui relativa especificidade por um determinado fosfoinosítídeo, a ocorrência de diferentes domínios em diferentes proteínas dá a essa classe de lipídios funções únicas.

4.1.1. AS FOSFATIDILINOSITOL CINASES E FOSFATASES

Sabemos hoje que os derivados fosforilados do PtdIns se encontram em reduzidas quantidades nas membranas biológicas, tendo pequenas variações em seus níveis, efeitos dramáticos na fisiologia celular (Pendaries *et al.*, 2003; Gardocki *et al.*, 2005). Já é possível, também, considerarmos que cada “espécie” de fosfoinosítídeo possui funções específicas, sendo a função de um dado

fosfoinosítídeo dependente da regulação espacial e temporal de seus níveis celulares. Essa regulação, por sua vez, é determinada pela distribuição subcelular e pela atividade das diferentes lipídio cinases e fosfatases.

Uma série de proteínas fosfatases envolvidas com o metabolismo de fosfoinosítídeos tem sido descritas em diversos organismos, sendo algumas específicas para um determinado fosfoinosítídeo, e outras não apresentando nenhum tipo de especificidade (Odorizzi *et al.*, 2000; Nozawa, 2002). Estas fosfatases têm sido recentemente implicadas em uma série de doenças em humanos, como câncer, miopatias, desordem neurodegenerativa, diabetes, entre outros (Pendaries *et al.*, 2003).

Contudo, as proteínas do metabolismo de fosfoinosítídeos de maior interesse, e por isso, muito mais estudadas são, sem dúvida, as fosfoinosítídeo cinases. Além dos trabalhos pioneiros do casal Hokin (1953; 1958), algumas das primeiras evidências apontando a participação de mais de uma proteína no processo de fosforilação do PtdIns nos é fornecida por Brockerhoff & Ballou (1962), que demonstraram que a formação de fosfoinosítídeos mono- e polifosfato ocorre por sucessivas transferências do grupo fosfato do ATP para o PtdIns. A variedade de proteínas cinases envolvidas na geração de diferente fosfoinosítídeos, além de esclarecer alguns pontos, tem também tornado mais complexo o entendimento de como os diferentes fosfoinosítídeos são formados (Tabela 4.1).

Tabela 4.1. Proteínas cinases envolvidas com o metabolismo de fosfoinosítídeos em mamíferos

Família	Tipo/ Classe	Substrato	Produto	Enzima*	Mr (kDa)
PtdIns Cinases					
PtdIns 3-Cinase	I _A	PI(4,5)P ₂	PI(3,4,5)P ₃	p110 α/β/δ	119-123
	I _B	PI(4,5)P ₂	PI(3,4,5)P ₃	p110 γ	120
	II	PtdIns/PI(4)P	PI(3)P/PI(3,4)P ₂	PI3K-C2 α/β/γ	170-210
	III	PtdIns	PI(3)P	VPS 34	101
PtdIns 4-cinase	II	PtdIns	PI(4)P	97KDa PI4Kα**	97
				PI4K IIα	54
				PI4K IIβ	55
	III	PtdIns	PI(4)P	PI4K IIIα	231
				PI4K IIIβ	82
PIP Cinases					
PI(3)P 5-Cinase		PI(3)P	PI(3,5)P ₂	PIKfyve	233
PI(4)P 5-Cinase		PI(4)P	PI(4,5)P ₂	PI(4)P5Kα	61
				PI(4)P5Kβ	60
				PI(4)P5Kγ	70-72
PI(5)P 4-Cinase		PI(5)P	PI(4,5)P ₂	PI(5)P4Kα	47
				PI(5)P4Kβ	47
				PI(5)P4Kγ	47

*homólogas em mamíferos; *Mr*, mobilidade relativa; PI, fosfatidilinositol; PIP, fosfatidilinositol fosfato; ** 97KDa PI4Kα é um *splice* alternativo da PI4K IIIα; adaptado de Kanaho & Suzuki (2002).

Considerando os inúmeros fosfoinosítídeos encontrados, as diversas formas de regulação dos seus níveis intracelulares, e as diferentes proteínas que se

associam com eles, via domínios de reconhecimento específico, pode-se ter um quadro da enorme variedade de fenômenos celulares nas quais esses fosfoinosítídeos estão envolvidos. Contudo, podemos destacar funções ou processos fisiológicos que parecem ser centrais ao considerarmos o metabolismo dos fosfoinosítídeos. Primeiro, observando a literatura recente, fica evidente a importância dessas moléculas para o adequado funcionamento dos processos de endocitose e exocitose, e de tráfego intracelular de membrana de modo geral (Takenawa & Itoh, 2001; Czech, 2003; De Matteis & Godi, 2004). Segundo, e que nos traz maior interesse, é a participação dos diversos fosfoinosítídeos em fenômenos de transdução de sinal, o que faz com que esses lipídios estejam relacionados com a fisiopatologia de determinadas doenças, com a regulação do transporte transepitelial de solutos, ou com alterações na dinâmica da membrana plasmática durante uma infecção, entre tantos outros (Payraastre *et al.*, 2001; Hilgemann, 2003; Pendaries *et al.*, 2003; Blazer-Yost & Nofziger, 2005).

Nos concentraremos nas funções fisiológicas de um fosfoinosítídeo em particular, o PtdIns(4)P, dada sua participação como precursor de um importante lipídio sinalizador, o PtdIns(4,5)P₂, e sua participação na regulação do transporte transepitelial de solutos, um dos mais importantes aspectos da fisiologia renal (Starling *et al.*, 1995; Guilherme *et al.*, 1998; Blazer-Yost & Nofziger, 2005). Discorreremos então, sobre a enzima que o sintetiza, a PtdIns 4-cinase.

4.2. A FOSFATIDILINOSITOL 4- CINASE: ESTRUTURA E PROPRIEDADES CATALÍTICAS

Estudos nos anos 60 relataram uma atividade enzimática capaz de catalisar a transferência de um grupo fosfato para uma molécula de PtdIns, e ainda mostraram

que havia diferentes atividades PtdIns cinase, sugerindo a existência de um grupo de proteínas relacionadas (revisto em Balla, 1998). Baseados nas diversas propriedades dessas proteínas, como (1) diferenças cinéticas das enzimas presentes em diferentes membranas subcelulares; (2) na sensibilidade ao uso de detergentes não-iônicos; e (3) na inibição da atividade por adenosina (Carpenter & Cantley, 1990), estas foram classificadas inicialmente como PtdIns cinases tipo I e II. Descobriu-se posteriormente que se tratavam de duas enzimas com atividades distintas, sendo a tipo I uma PtdIns 3-cinase, e a tipo II uma PtdIns 4-cinase (a partir de agora PtdIns4K, ver Carpenter & Cantley, 1990). Observou-se, mais tarde, que a PtdIns4K compreende uma família de enzimas cujas propriedades estruturais e catalíticas, assim como a distribuição subcelular e os processos de regulação são bem distintos.

Usando métodos de fracionamento celular, Endemann *et al.*(1987) separou duas proteínas com atividade PtdIns4K, com peso molecular aparente de 55 kDa, característica do tipo II, já descrita na época, e outra de 230 kDa. Esta última passou a ser considerada uma PtdIns4K do tipo III (Carpenter & Cantley, 1990; Balla, 1998).

O primeiro clone de uma PtdIns4K, com cerca de 125 kDa, foi obtida em *S. cerevisiae*, sendo codificada pelo gene *PIK1*, tendo características enzimáticas de uma PtdIns4K tipo III. Ainda em leveduras, foi posteriormente identificado o gene *STT4*, que também codifica uma proteína tipo III, com peso molecular de ~216 kDa (Gerhmann & Heilmeyer, 1998). Em mamíferos, a primeira PtdIns4K a ser clonada foi uma de 97 kDa, possuindo alta similaridade com a proteína Stt4p de leveduras, mais cuja sensibilidade a adenosina e à um anticorpo específico para PtdIns4Ks do tipo II, caracterizou-a como uma proteína do tipo II (Balla, 1998).

Foram identificados em roedores uma PtdIns4K tipo III de 230 kDa, sendo esta descrita como a isoforma PtdIns4K III α . Outra proteína, de 92 kDa semelhante à Pik1p, também foi descrita em roedores, sendo descrita como uma PtdIns4K III β (Balla, 1998, Gerhmann & Heilmeyer, 1998). As duas enzimas com atividade PtdIns4K identificada em leveduras (Pik1p e Stt4p) são homólogas das isoforma PtdIns4K III β e PtdIns4K III α , respectivamente (Cockcroft & De Matteis, 2001). A deleção do gene *PIK1* e *STT4*, além de promover reduções significativas na atividade PtdIns4K da célula, torna inviável sua sobrevivência. Há ainda, em *S. cerevisiae*, uma proteína com atividade PtdIns4K com peso molecular de 45-55 kDa, sendo provavelmente um homólogo da PtdIns4K tipo II de mamíferos.

A atividade PtdIns4K tipo II é caracterizada por sua associação a membranas, sendo geralmente uma proteína integral de membrana plasmática (Barylko *et al.*, 2001), onde sua atividade é, em princípio, mais abundante (Balla, 1998). Recentemente, Barylko *et al.* (2001), clonaram uma proteína PtdIns cinase de tecido adrenal bovino, com atividade PtdIns4K – distinta da PtdIns4K α 97 kDa – e de aproximadamente 54 kDa. Com características de uma PtdIns4K do tipo II (ver mais adiante) esta proteína não apresenta os domínios funcionais marcantes da maioria das proteínas e lipídios cinases, não revelando também, nenhum domínio transmembrana aparente. Contudo, foi comprovada que sua inserção em frações de membrana dependente de uma seqüência rica em cisteína, típica região de palmitoilação. Os autores mostram ainda, que essa proteína possui alta homologia com as proteínas de *D. melanogaster*, *S. cerevisiae*, e de humanos.

Marcante no tipo II de PtdIns4K é o aumento na sua eficiência catalítica quando reconstituída em micelas contendo PtdIns e detergente (Carpenter & Cantley, 1990). Sua atividade é dependente de íons divalentes, especificamente

Mg²⁺ e Mn²⁺, sendo, entretanto, inibida na presença de Ca²⁺ (Gerhmann & Heilmeyer, 1998). A PtdIns4K tipo II é distinta por sua alta afinidade pelos seus substratos (K_m para ATP na faixa de 10-50 μ M), e sua sensibilidade para adenosina (K_i ~10-70 μ M) (Carpenter & Cantley, 1990). Além disso, o uso de anticorpos monoclonais específicos para PtdIns4K tipo II (o anticorpo 4C5G) inibe em até 90 % sua atividade (Carpenter & Cantley, 1990). A PtdIns4K do tipo II apresenta três isoformas: PtdIns4K α 97 kDa (*splice* alternativo da PtdIns4K III α), PtdIns4K II α e PtdIns4K II β (Kanaho & Suzuki, 2002). Baseada na migração em SDS-PAGE, o peso molecular dessas duas últimas se encontra em torno de 45-55 kDa (Kanaho & Suzuki, 2002).

Como já mencionado, são duas as isoformas da PtdIns4K tipo III: PtdIns4K III α (de 210-230 kDa) e PtdIns4K III β (de 92-110 kDa) (Kanaho & Suzuki, 2002). Estas são caracterizadas pelo seu alto peso molecular, baixa afinidade por ATP (K_m ~700 μ M) e sua relativa insensibilidade à adenosina e à detergentes não-iônicos. Contudo, esse tipo de PtdIns4K é sensível ao inibidor clássico de PtdIns3K, wortmannina, e ao LY294002, quando usado em altas concentrações (IC₅₀ entre 50-100 nM, e 50-100 μ M, respectivamente). As PtdIns4K do tipo III são principalmente enzimas solúveis, ou então fracamente associadas a membranas (Kanaho & Suzuki, 2002).

A PtdIns4K apresenta distribuição ubíqua, com exceção da PtdIns4K III α , predominante em cérebro (Balla, 1998). A presença de diferentes isoformas de PtdIns4K nas diversas membranas intracelulares indica um potencial de regulação, tanto da atividade enzimática quanto da localização de uma determinada isoforma (Carpenter & Cantley, 1990). Destaca-se o fato de que três dessas isoformas apresentam um domínio PH de reconhecimento de fosfoinosítídeos, próximo ao C-

terminal (a PtdIns4K α 97 kDa, a PtdIns4K III α , e a PtdIns4K homóloga de levedura, Stt4p, Kanaho & Suzuki, 2002).

A atividade da PtdIns4K – especialmente as do tipo III – em determinados tipos celulares se encontram predominantemente nas membranas do aparelho de Golgi, estando presentes também em lisossomas, e membranas plasmáticas – ainda que nessa última a PtdIns4K tipo II seja mais comumente encontrada (Carpenter & Cantley, 1990).

4.2.1. REGULAÇÃO DA ATIVIDADE PTDINS4K E SEUS EFEITOS CELULARES

Balla (1998) fazendo um apanhado dos estudos até o final da década de 90, identifica três principais formas nas quais a PtdIns4K pode influenciar a fisiologia da célula: (1) via geração de 2^o mensageiros, principalmente IP₃ e DAG, via ressíntese do *pool* de PIP₂ sensível à estímulo extracelular – a presença da PtdIns4K do tipo II (o tipo mais abundante) na membrana plasmática denota sua função na geração do precursor de PIP₂; (2) na manutenção estrutural e funcional do Golgi (De Matteis & Godi, 2004; Shin & Nakayama, 2004), via regulação da proteína GTPase monomérica, como a ARF (*ADP-Ribosylation Factor*) – a presença predominante da PtdIns4K tipo III α e III β nas membranas do Golgi mostram a importância do metabolismo de fosfoinosítídeos nessa organela; (3) na via secretória de células especializadas, terminais pré-sinápticos (Cremona & De Camilli, 2001), e leveduras (Odorizzi *et al.*, 2000); e no rearranjo do citoesqueleto de actina, envolvida com processos de migração celular, e mesmo endocitose e exocitose (Takenawa & Itoh, 2001; Czech, 2003)

Contudo, apesar da extensa caracterização de suas isoformas, a regulação da atividade das PtdIns4K é ainda pouco compreendida (Carpenter & Cantley, 1990). Há indícios de modulação por diferentes substâncias, como o AMPc, DAG e seu análogo, o éster de forbol PMA (indicando possível participação de uma PKC), concanavalina A, ionóforos de Ca^{2+} , além de $\text{GTP}\gamma\text{S}$ (Carpenter & Cantley, 1990). Mais bem definido está a regulação da atividade de algumas isoformas da PtdIns4K por EGF, via atividade tirosina cinase de seu receptor (EGF_R) (Hsuan & Tan, 1997). Sabidamente, estímulos extracelulares, levando à ativação de outros receptores, como aqueles acoplados a proteínas G heterotrimérica podem estimular indiretamente (pela lei de ação de massas), ou diretamente (via fosforilação em resíduos de serina ou tirosina) a atividade PtdIns4K (Kanaho & Suzuki, 2002). Estudos mais recentes mostram a participação de vias envolvendo receptores sensíveis ao Ca^{2+} (Huang et al., 2002) e receptores de IgE (Naveen *et al.*, 2005), regulando positivamente a atividade PtdIns4K, em diferentes tipos celulares.

O PtdIns(4)P é o principal fosfoinosítídeo presente no Golgi, servindo como um sinal de endereçamento para proteínas que se associam a esse compartimento celular (Shin & Nakayama, 2004). Diminuição dos níveis de PtdIns(4)P, em leveduras mutantes para Pik1p apresentam déficit na secreção de proteínas, consistentes com deformações na estrutura e função do Golgi (Odorizzi *et al.*, 2000). Vesículas secretórias também apresentam atividade PtdIns4K, característica de tipo II. Contudo, dada a dependência de altas concentrações de ATP para processos de secreção, e a sua inibição por wortmannina, é sugerido também o envolvimento de uma PtdIns4K tipo III. Interessante notar que diversas proteínas envolvidas na liberação de neurotransmissores, e na internalização de membranas em terminais

pré-sinápticos possuem domínios de reconhecimento para diversos fosfoinosítídeos (Cremona & De Camilli, 2001).

A função do PtdIns(4)P envolve assim, uma série de proteínas efetoras, cuja localização e atividade são determinadas pela presença de PtdIns(4)P nas diferentes membranas subcelulares. Contudo, ao considerarmos a complexa dinâmica das membranas biológicas, e a existência de regiões heterogêneas nessas, vemos que a compartimentalização dos diversos sistemas de sinalização celular observada em diferentes modelos biológicos é considerada uma vantagem evolutiva, tornando o processo de transdução de sinal mais eficiente (Lichtenberg *et al.*, 2005; Waugh *et al.*, 2001).

4.3. METABOLISMO DE FOSFOINOSÍTÍDEOS E OS MICRODOMÍNIOS DE MEMBRANA

A compartimentalização do metabolismo de fosfoinosítídeos vem sendo relatada desde meados dos anos 90 (Hope & Pike, 1996; Pike & Casey, 1996). De fato, os fosfoinosítídeos – e as proteínas relacionadas a sua função – não são distribuídos em toda a face citossólica da membrana, mais parecem formar domínios funcionais (Shin & Nakayama, 2004). Diferentes abordagens experimentais já demonstraram que a síntese dos principais fosfoinosítídeos envolvidos em sinalização celular (em especial PtdIns(4)P e PIP₂) ocorrem principalmente em microdomínios de membrana, o que permite a formação rápida e reversível de regiões enriquecidas em “espécies” específicas de fosfoinosítídeos (Overduin *et al.*, 2001; Pendaries *et al.*, 2003).

Hope & Pike (1996), no que parece ser o primeiro estudo do metabolismo de PtdIns em microdomínios, observaram o enriquecimento de diversos fosfoinosítídeos

e de uma proteína fosfoinosítídeo fosfatase, em frações de um gradiente de sacarose imunopositivas para caveolina-1. Os autores relacionaram as funções de tráfego de vesículas atribuídas à cavéola, a presença de grandes quantidades de fosfoinosítídeos nesses microdomínios – até 20% do PIP₂ foram verificados nas frações contendo caveolina-1. Nenhuma outra enzima relacionada ao metabolismo de fosfoinosítídeos foi detectada em microdomínios. No mesmo ano, Pike & Casey (1996), investigando o metabolismo do PIP₂ em células A431 (fibroblastos), puderam identificar quase 50% do total desse fosfolípido em regiões de baixa densidade insolúveis em detergente não-iônico. Além disso, as exposições dessas células a PMA ou bradicinina reduziam o conteúdo de PIP₂ nos microdomínios, não havendo alteração de seus níveis no restante da membrana. Em experimentos subsequentes, utilizando MβCD, Pike & Miller (1998) demonstraram que, com a desestruturação dos microdomínios a metabolização do PIP₂ induzida por PMA ou bradicinina ficava prejudicado.

Comum a esses trabalhos é o fato de que nenhuma proteína da família das PtdIns cinases foi descrita em microdomínios de membrana. Uma vez que o metabolismo desses lipídios estaria relacionado com a função sinalizadora desses microdomínios, a distribuição das enzimas cinases responsáveis pela síntese dos diferentes fosfoinosítídeos em outras regiões da membrana tornaria menos eficiente a iniciação dos eventos sinalizadores mediados por essa classe de lipídios. Investigando essa questão, Waugh *et al.* (1998), fazendo uso de um tratamento com alta força iônica e alto pH (livre de detergentes), com as mesmas células A431, observou um enriquecimento de cerca de 62% no conteúdo de PtdIns(4)P e 61% do conteúdo de PIP₂, em frações imunopositivas para caveolina-1. Verificou ainda, que aproximadamente 60% da atividade PtdIns4K se encontrava em microdomínios,

sendo este enzima passível de ativação por EGF nessas regiões da membrana. Seus resultados mostram ainda que a atividade PtdIns4K era encontrada predominantemente em microdomínios não-caveolares, que co-migram com as cavéolas para regiões de baixa densidade.

Desse modo, há algumas evidências que sugerem que tanto a metabolização quanto a síntese de fosfoinosítídeos ocorreria em microdomínios de membrana, o que tornaria mais eficiente a resposta desse sistema a estímulos intra e extracelulares. Entretanto, maiores estudos nessa área precisam ser realizados, uma vez que os dados da literatura continuam conflitantes.

Nesse sentido, Einicker-Lamas *et al.* (2003) mostraram uma interação entre a atividade da PtdIns4K e metabolitos da via dos esfingolipídios, notadamente a esfingosina-1-fosfato (S1P), utilizando preparações da membrana de túbulos renais. Foi verificado que o aumento dos níveis de PtdIns(4)P estavam relacionados à presença de esfingosina/esfingosina-1-fosfato presentes no meio, sugerindo a regulação da PtdIns4K por essas bases esfingóides. Mais recentemente demonstramos que nessas mesmas membranas de túbulos renais há quantidades significativas de caveolina-1, indicando a presença de microdomínios caveolares nesse segmento do néfron, e que a Ca^{2+} -ATPase de membrana plasmática encontra-se exclusivamente localizada e ativa nesses microdomínios (Tortelote *et al.*, 2004). O uso de M β CD, que sabidamente desestrutura os *rafts* lipídicos, leva a total inibição da atividade Ca^{2+} -ATPase de membrana plasmática. O enriquecimento de esfingolipídios e fosfoinosítídeos em microdomínios de membrana (Anderson, 1998; Golub & Pico, 2005) sugere uma interação entre essas diferentes classes de lipídios. De que forma essas vias metabólicas interagem entre si é uma questão a ser resolvida.

5. OBJETIVOS

O objetivo geral desta tese é investigar se a atividade PtdIns 4-cinase de membrana basolateral de células epiteliais de túbulo proximal renal se encontra enriquecida em microdomínios de membrana, e, uma vez que esses domínios possuem altos níveis de esfingolípídios, determinar se há interação entre as vias metabólicas dessas diferentes classes de lipídios.

Os objetivos específicos são:

- (1) Caracterizar a PtdIns4K presente em membrana basolateral de túbulo proximal renal.
- (2) Investigar se há compartimentalização da PtdIns4K em microdomínios de membrana em epitélio renal.
- (3) Verificar se há regulação da PtdIns4K por esfingosina.
- (4) Investigar se esfingosina promove fosforilação nas proteínas presentes na membrana basolateral de túbulos renais.
- (5) Verificar se PKC, PKA ou Akt , conhecidas cinases moduladas por Sph estão envolvidas na modulação da PtdIns 4-cinase por esfingosina.

6. MATERIAL E MÉTODOS

“O método constitui característica tão importante da ciência que, não raro, identificamos ciência com seu método”

Ruiz, 1980

6.1. OBTENÇÃO DE FRAÇÕES ENRIQUECIDAS EM MEMBRANA BASOLATERAL

As frações de membrana basolateral de túbulos proximais renais (MBL) foram purificadas segundo o método adaptado de Scalera *et al.* (1980). Rins frescos de porco (4-8 pares em cada preparação) foram obtidos de matadouros regulamentados. Os rins foram transportados até o laboratório em solução 1 [sacarose 0,25 M, Hepes-Tris 10 mM (pH 7,6), EDTA 2 mM, PMSF 1 mM e inibidor de tripsina II 0,15 mg x L⁻¹], onde foram dissecados sobre uma plataforma de vidro resfriada, retirando-se a porção externa do córtex (*córtex-corticis*), cuja população de células corresponde predominantemente a túbulos contornados proximais (Whittembury & Provérbio, 1970).

As fatias de córtex foram pesadas, e o volume correspondente a 1 mL de solução 1 por grama de tecido foi adicionado para o passo seguinte, onde a suspensão foi homogeneizada 30 vezes a 2.000 rpm em homogeneizador de tecido tipo Potter. Este homogeneizado foi centrifugado por 10 min a 1.100g em centrífuga refrigerada (Sorvall RC-5B, rotor GSA), sendo o sobrenadante retirado, e o precipitado submetido a uma segunda homogeneização e centrifugação, nas mesmas condições. O primeiro e segundo sobrenadante foram reunidos e centrifugados por 30 min a 48.000g em ultracentrífuga Hittachi (rotor 45Ti). A porção mais externa do precipitado (fração microssomal) foi delicadamente ressuspensa em 6 mL de solução II [sacarose 0,25 M, Hepes-Tris 10 mM (pH 7,6), PMSF 1 mM e inibidor de tripsina II 0,15 mg x L⁻¹] sendo então acrescentado Percoll (concentração final 12% v/v). Após homogeneização e centrifugação (70 min a 40.000g em ultracentrífuga Hittachi, com rotor 70Ti), de um total de 26 mL foram retirados e

descartados os primeiros 7,8 mL (do topo para a base do tubo), sendo coletados 4,3 mL seguintes, sendo descartado o restante.

As frações do gradiente foram homogeneizadas e submetidas a centrifugação por 60 min a 200.000g em ultracentrífuga Hittachi (rotor 65Ti) para retirada do Percoll. Os fragmentos e as vesículas, formadas a partir da membrana basolateral, foram ressuspensos em um volume de sacarose 0,25 M, de modo que a concentração final de proteínas ficasse em torno de 25 mg x mL⁻¹, ficando armazenadas em N₂ líquido, e utilizadas em até 3 meses.

A cada preparação foi medida a atividade da (Na⁺+K⁺)ATPase, que, além de estar presente em grande quantidade em células de túbulo proximal, se encontra exclusivamente na membrana basolateral, sendo considerada enzima marcadora dessa fração (Scalera *et al.*, 1980). Usualmente, trabalhamos com preparações de MBL nas quais o enriquecimento da atividade (Na⁺+K⁺)ATPásica em relação ao homogenato total era de 8-10 vezes.

6.2. DOSAGEM DE PROTEÍNAS

O conteúdo proteico das amostras foi determinado por colorimetria, utilizando o reagente de Folin-fenol, através do método modificado de Lowry *et al.* (1951), tendo a albumina bovina (0,1%) como padrão.

6.3. EXTRAÇÃO DE MICRODOMÍNIOS DE MEMBRANA

Os microdomínios de membrana, caracterizados pela resistência a solubilização em detergente não iônico em baixas temperaturas, e por apresentar

baixa densidade (ver Os MICRODOMÍNIOS DE MEMBRANA), foram obtidos através de um gradiente descontínuo de sacarose, como já descrito (Tortelote *et al.*, 2004). Para isso, 15-20 mg de MBL forma solubilizadas em 2 mL de tampão de lise [Tris-HCl 20 mM (pH 8,0), NaCl 150 mM, C₁₂E₉ (polidocanol) 1%], sendo homogeneizadas por agitação (6 x 10") e então sonicadas (3 x 10"). Posteriormente as amostras foram colocadas em um tubo com mais 2 mL de sacarose 90% [Mes 25 mM (pH 7,0), NaCl 150 mM], sendo a proporção final de sacarose 45%. Foram adicionados mais 4 mL de sacarose 30% [Mes 25 mM (pH 7,0), NaCl 150 mM], e então 4 mL de sacarose 5% [Mes 25 mM (pH 7,0), NaCl 150 mM]. Após centrifugação (180000g, 16-18 horas, em rotor SW 41 Ti) foram retiradas 12 alíquotas de 1 mL cada. Estas, após dosagem de proteínas (ver tópico 6.2.), foram utilizadas para eletroforese e imunodeteção, e para dosagem de atividade da PtdIns 4-cinase.

6.4. MEDIDA DA ATIVIDADE PTDINS4K

A atividade PtdIns 4-cinase foi medida pela incorporação de [γ^{32} P], como descrito anteriormente (Einicker-Lamas *et al.*, 2003). Cerca de 100 μ g de MBL foram incubadas em 1 mL de meio de reação 1 [MRC₁: Mes-Tris 30 mM (pH 7,0), MgCl₂ 5 mM, NaN₃ 1 mM, ouabaína 1 mM, EGTA 500 μ M]. A reação foi iniciada com a adição de MRC₂ ([γ^{32} P]ATP 1 mM, 10⁸ cpm x mL⁻¹). Após período de incubação de 20 min (37° C), a reação foi parada com 4 mL de solução clorofórmio:metanol:ácido clorídrico (67:33:0,03, v/v).

A extração de lipídios foi realizada como descrita em Horowitz & Perlman (1987). Após parada a reação, foi adicionado 1 mL de HCl 0,6M, sendo as amostras centrifugadas por 10 min (2000 rpm). Removeu-se a fase aquosa (superior) e a

interface (rica em proteínas) e adicionou-se à fase orgânica (inferior) 1 mL de clorofórmio:metanol:ácido clorídrico (3:48:47, v/v). Após nova centrifugação, remoção da fase aquosa e interface, a fase orgânica foi evaporada em fluxo constante de N₂ gasoso. Os lipídios então foram ressuspensos em 90 µL de clorofórmio:metanol:água (75:25:2, v/v).

Os lipídios foram separados por cromatografia de camada fina (TLC) em cromatoplaças de sílica gel (60F254, Merck) previamente ativadas (110° C por 10 min). A corrida unidimensional foi realizada em solvente clorofórmio:acetona:metanol:ácido acético:água (80:30:26:24:16, v/v). O autoradiograma foi obtido expondo-se a cromatoplaça a um filme para raio X (Kodak X-Omat) por 72-96 horas. O filme então foi revelado e as áreas correspondentes aos fosfolipídios de interesse foram marcadas, cuidadosamente raspadas, e colocadas em *vials* contendo solução de cintilação (POPOP 0,1 g x L⁻¹, em tolueno). A radioatividade foi medida em um contador de cintilação líquida (Packard, Tri-carb 2100TR).

6.5. ELETROFORESE E IMUNODETECÇÃO

Após eletroforese das amostras de interesse, em SDS-PAGE, as proteínas foram transferidas por *western blotting* para uma membrana de nitrocelulose POTRAN[®] (Hybond, Amersham, Buckinghamshyre, U.K.) e incubadas com anticorpos primários específicos. Os anticorpos anti-caveolina-1 e anti-PtdIns 4-cinase foram adquiridos da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Após lavagem com solução tampão, as membranas foram incubadas com anticorpos secundários (poli- ou monoclonais, dependendo do anticorpo primário utilizado). Os anticorpos secundários (conjugados a uma peroxidase) foram detectados pelo

sistema ECL[®] usando um filme Hyperfilm[®] (Amershan, Buckinghamshyre, U.K.). A membrana foi corada com vermelho de *ponceau* para posterior determinação do peso molecular das proteínas de interesse.

6.6. ENSAIO DE FOSFORILAÇÃO DE PROTEÍNAS

Para ensaio de fosforilação de proteínas, utilizamos um método adaptado de Capasso *et al.* (1985). Frações de MBL (100 µg de proteína) foram pré-incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente em meio (volume final 70 µL) contendo sacarose 0,25 M, Tris 10 mM (pH 7,5), MgCl₂ 1 mM, ouabaína 0,5 mM, NaF 1 mM, na ausência e presença de diferentes concentrações de Sph (100 e 500 µM). Após pré-incubação, acrescentou-se [γ ³²P]ATP (0,5 mM, 5 x 10⁷ cpm por tubo). Ao final do período de incubação com o ATP (10 min à 37° C), a reação foi parada com a adição de tampão de amostra concentrado [glicerol 75%, SDS 6%, azul de bromofenol 0,03%, β-mercaptoetanol 0,15%, Tris 1,5 m (pH8,8)].

As amostras foram então fervidas (1 min 100° C) e aplicadas em gel de poliacrilamida (10%), sendo então submetidas à corrida eletroforética. O gel foi exposto a uma malha sensível a radiação β, e após 24-48 horas, a malha foi escaneada em aparelho específico (Storm 860, GE Biosciences). A quantificação das bandas de interesse forma realizadas em *software* apropriado (*Imagequant*, GE Biosciences), sendo o valor da incorporação de [γ ³²P] corrigido pela marcação da banda com vermelho de *ponceau*.

6.7. BUSCA DE DOMÍNIOS FUNCIONAIS NA PTDINS4K

A presença de domínios passíveis de fosforilação por proteínas cinases na Ptdln4K foi identificada através de programa disponível na internet (*Eukariotic Linear Motif-ELM*, <http://elm.eu.org>), que se utiliza por sua vez de extenso banco de dados sobre domínios funcionais em proteínas. Para tanto, fizemos uso de diversas seqüências de aminoácidos de diferentes isoformas da Ptdlns 4-Cinase, restringindo a busca para aquelas identificadas em humanos (*Entrez Protein*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>).

6.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística foram utilizadas análise de variância de uma ou duas entradas, além teste t de *Student*, dependendo do bloco de experimentos a serem analisados. Nesse estudo foi estabelecido um $\alpha \leq 0,05$. Os resultados são mostrados como média \pm erro padrão da média (EPM).

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A presença de atividade de diferentes lipídios cinases em tecido renal já havia sido verificada, em estudos anteriores de nosso grupo (Guilherme *et al.*, 1998; Einicker-Lamas *et al.*, 2003, Nogaroli *et al.*, 2005). Esses trabalhos mostraram que, quando incubamos as frações de MBL com [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP e realizamos extração e separação de lipídios, vemos a formação de pelo menos três fosfolipídios distintos, já identificados por meio de sua mobilidade relativa (M_r) e por cromatografia líquida de alta *performance* (HPLC) (Guilherme *et al.*, 1998; Einicker-Lamas *et al.*, 2003; Nogaroli *et al.*, 2005). Na Figura 7.1 podemos facilmente identificar o ácido fosfatídico (PA), lipídio com maior M_r ; a S1P, de M_r intermediário; e o PtdIns(4)P, de M_r mais baixa. A marcação na base da cromatoplaça corresponde à origem, que se trata de resíduos de [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP não incorporado a moléculas lipídicas.

A formação desses fosfolipídios em MBL indica a presença de lipídios cinases funcionais em membrana isolada de túbulos proximais renais. Dentre os fosfolipídios identificados, o PtdIns(4)P tem sido descrito como um importante modulador da atividade da Ca^{2+} -ATPase de membrana plasmática (Missiaen *et al.*, 1989; Lehotsky *et al.*, 1992; Guilherme *et al.*, 1998), tendo então um importante papel na regulação do transporte de Ca^{2+} e do ajuste fino da concentração intracelular desse íon. Além disso, os fosfoinosítídeos tem se mostrado importantes reguladores de diversos canais iônicos presentes tanto na membrana apical quanto na membrana basolateral de células epiteliais renais (revisto em Balzer-Yost & Nofziger, 2005). De fato, o tecido renal possui um *turnover* de fosfoinosítídeos extremamente elevado, se comparado com outros tecidos (Tou & Huggins, 1977). A existência de um complexo metabolismo de lipídios bioativos em MBL de túbulos renais vista por nosso grupo

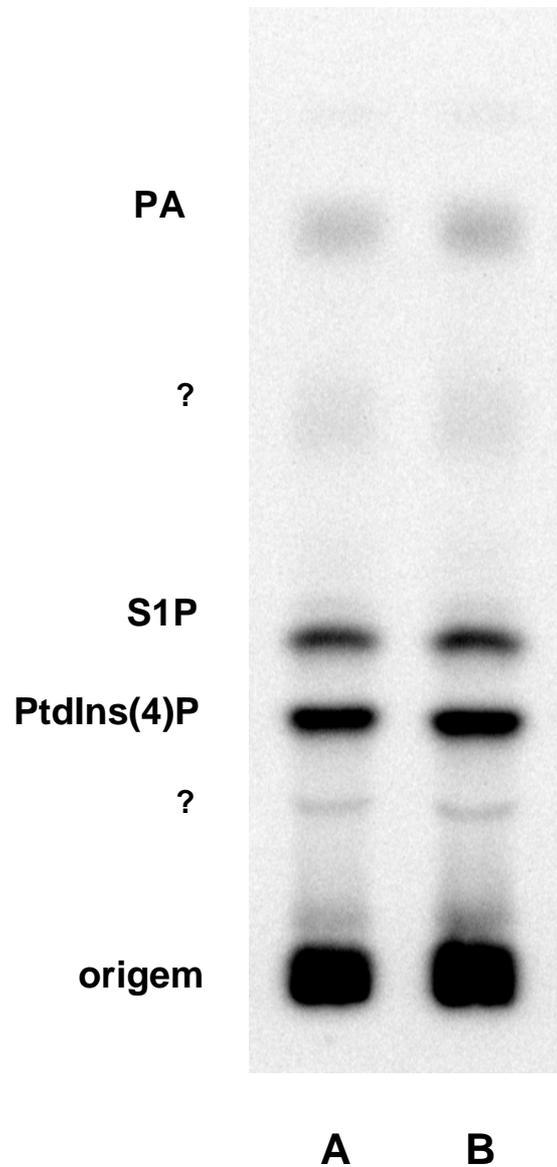


Figura 7.1. Formação de fosfolipídeos em frações de membrana basolateral de túbulo proximal renal (MBL). As MBL foram incubadas com $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ e esfingosina, em condições basais. A formação de PtdIns(4)P, S1P e DAG indicam a presença das enzimas PtdIns 4-cinase, esfingosina cinase e DAG cinase. PtdIns(4)P: fosfatidilinositol-4-fosfato; S1P: esfingosina -1-fosfato; PA: ácido fosfatídico; ?: lipídeos ainda não identificados. A e B se referem à diferentes preparações de MBL.

(Rangel *et al.*, 2001, 2005; Einicker-Lamas *et al.*, 2003; Nogaroli *et al.*, 2005), indica uma importante função destes na regulação nos fenômenos de transporte característicos do epitélio renal. Com base neste papel do PtdIns(4)P, decidimos estudar as características funcionais da PtdIns4K residente na MBL renal.

Na Figura 7.2A, vemos um aumento progressivo na formação desse fosfolípido quando aumentamos a quantidade de proteína no meio de reação. Nota-se que quando submetemos previamente as frações de membrana a altas temperaturas (100° C), desnaturando as proteínas dessa preparação, não vemos mais a formação de PtdIns(4)P (ver seta na Figura 7.2A), coerente com a participação de uma enzima na síntese deste fosfolípido. A dependência do tempo para formação do PtdIns(4)P é mostrada na Figura 7.2B, onde temos claramente uma relação linear entre a síntese de PtdIns(4)P e o período de incubação das frações de MBL com o [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP. Não há registros na literatura de incorporação de grupos fosfatos em moléculas lipídicas não catalisada por enzimas. Sabe-se que as moléculas de inositol-pirofosfato (IP₇ e IP₈) são capazes de transferir um grupo fosfato a determinados resíduos de serina, em diversas proteínas (Saiardi *et al.*, 2004). Nos clássicos trabalhos do casal Hokin (Hokin & Hokin, 1953; 1958) fatias de pâncreas são incubados com ³²P livre, e é vista a formação de fosfoinosítídeos. Porém nesse sistema, mais complexo que membranas basolaterais isoladas, há a síntese continuada de ATP, sendo as reações de fosforilação catalisadas por proteínas ou lipídios cinases.

A atividade da PtdIns4K atinge um máximo quando o pH se encontra na faixa de 6,9-7,1, próxima do pH fisiológico (Figura 7.3A). A dependência de MgCl₂ como co-fator na formação de PtdIns(4)P também foi avaliada, sendo que na ausência

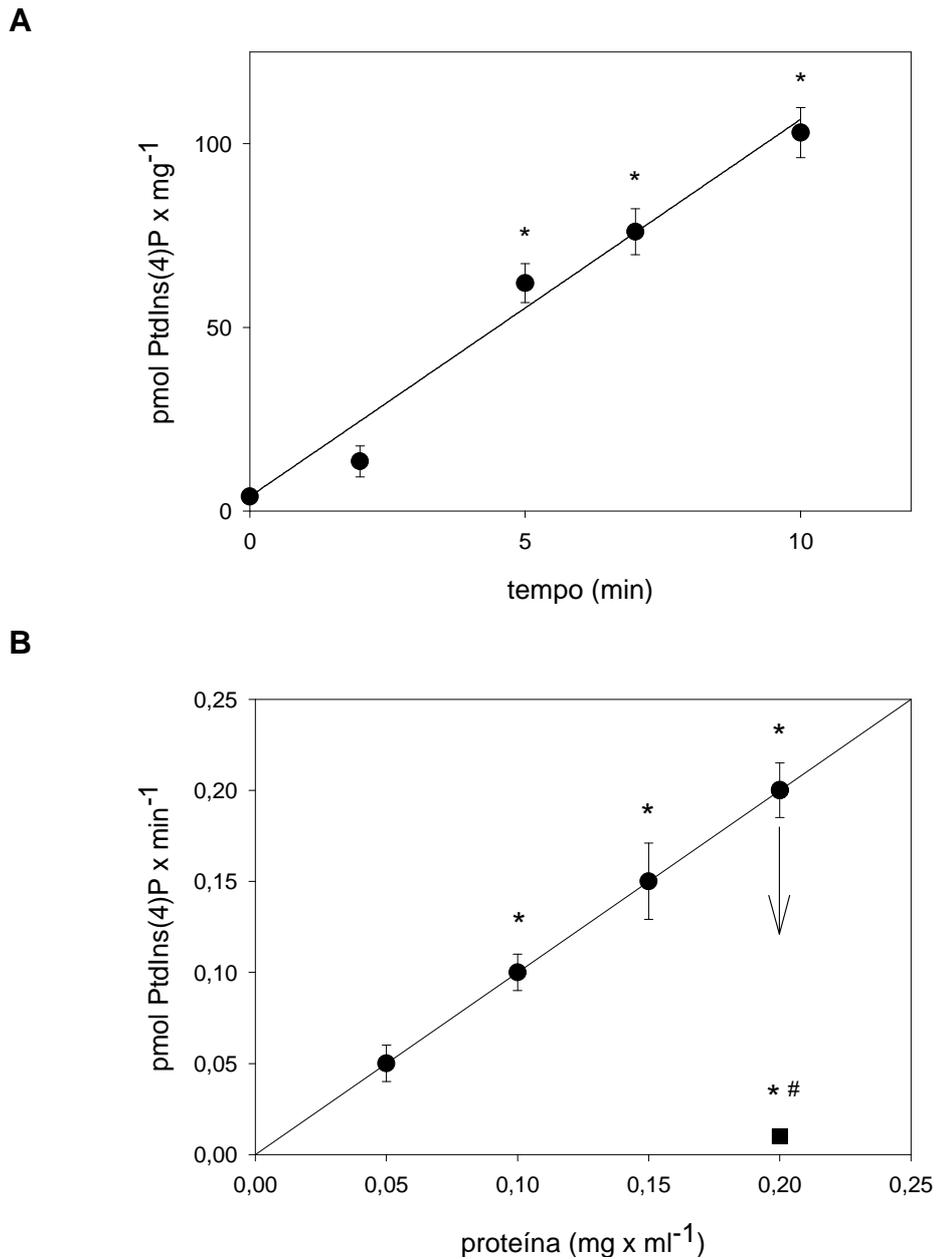


Figura 7.2. (A) relação linear entre o tempo de incubação com $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ e a atividade PtdIns 4-cinase; (B) dependência da concentração de proteína na formação da Ptdins(4)P. Ao submetermos a fração de MBL à altas temperaturas (100°C), não há formação de PtdIns(4)P (ver seta), indicando a participação de atividade enzimática nessa reação. * significativamente diferente do tempo zero (em A), e de $0,05\text{ mg x ml}^{-1}$ (em B). # diferença significativa comparada com a condição pré-aquecimento (média \pm EPM de três experimentos em duplicata).

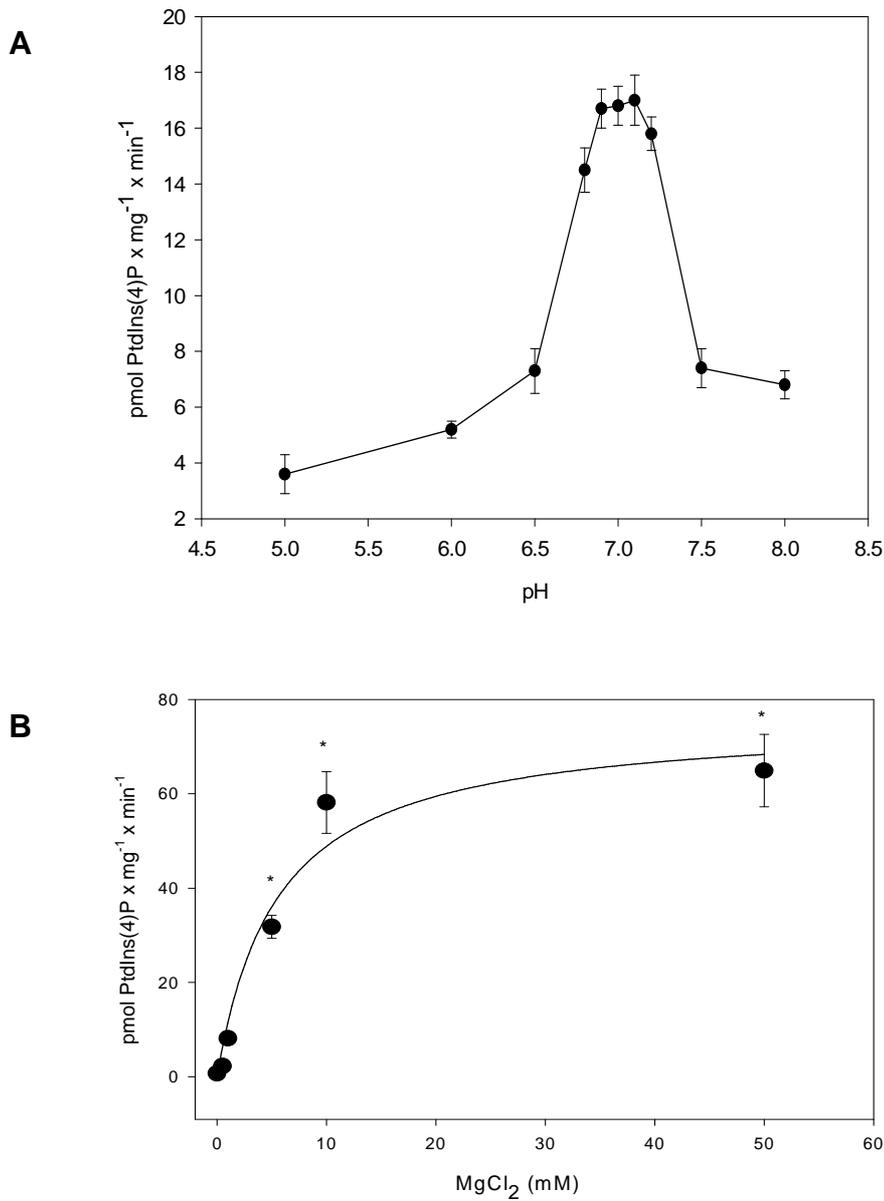


Figura 7.3. (A) curva de pH indica valor ótimo para atividade PtdIns 4-cinase próximo ao pH fisiológico (6,9-7,1 unidades de pH); (B) efeito da adição de MgCl₂ na síntese de PtdIns(4)P, sendo que 10 mM já se mostra saturante. * diferença significativa quando comparado com condição sem MgCl₂ (média ± EPM de três experimentos em duplicata).

desse sal não há atividade da PtdIns4K, estando a atividade dessa enzima saturada em concentrações iguais ou maiores que 10 mM (Figura 7.3B). Esses resultados sugerem que a PtdIns4K depende do complexo $Mg.ATP^{2-}$ para transferência do grupo fosfato para o PtdIns, ou ainda que o ATP livre age como inibidor da atividade dessa enzima.

O efeito da adição de substrato exógeno na atividade PtdIns4K foi também investigado. Vemos que a adição de 50 nM de PtdIns promove aumento de cerca de 2 vezes na formação de PtdIns(4)P, sendo que a adição de 10 vezes essa concentração (500 nM), não promove efeitos adicionais na atividade da PtdIns4K (Figura 7.4). Isso sugere que flutuações nos níveis endógenos de PtdIns, apesar de suficientes para manutenção da atividade PtdIns4K, se encontram abaixo dos níveis necessários para ativação máxima da enzima. Em condições fisiológicas, os níveis de PtdIns presentes em membrana plasmática é regulada pela atividade de uma fosfatidilinositol sintase (Antonsson, 1997); ou pelo transporte do PtdIns do retículo sarco(endo)plasmático para a membrana plasmática, através da fosfoinositídeo transferase (PITP) (Vance & Vance, 2005, ver seção 4.1. METABOLISMO DOS FOSFOINOSITÍDEOS). A PITP é a principal via de reabastecimento de PtdIns para a membrana plasmática, havendo evidências de um aumento na atividade PtdIns4K quando ocorre associação entre essas proteínas (revisto em Hsuan & Tan, 1997). Nosso modelo de estudo é a MBL isolada de túbulos proximais renais. O procedimento de separação e enriquecimento de frações de MBL pode acarretar a dissociação entre a PITP e a PtdIns4K, fazendo com que a atividade da PtdIns4K seja sensível à adição de substratos exógenos.

As enzimas da família da PtdIns4K são divididas em duas classes ou tipos, que apresentam diferenças estruturais – ainda não muito bem elucidadas – e

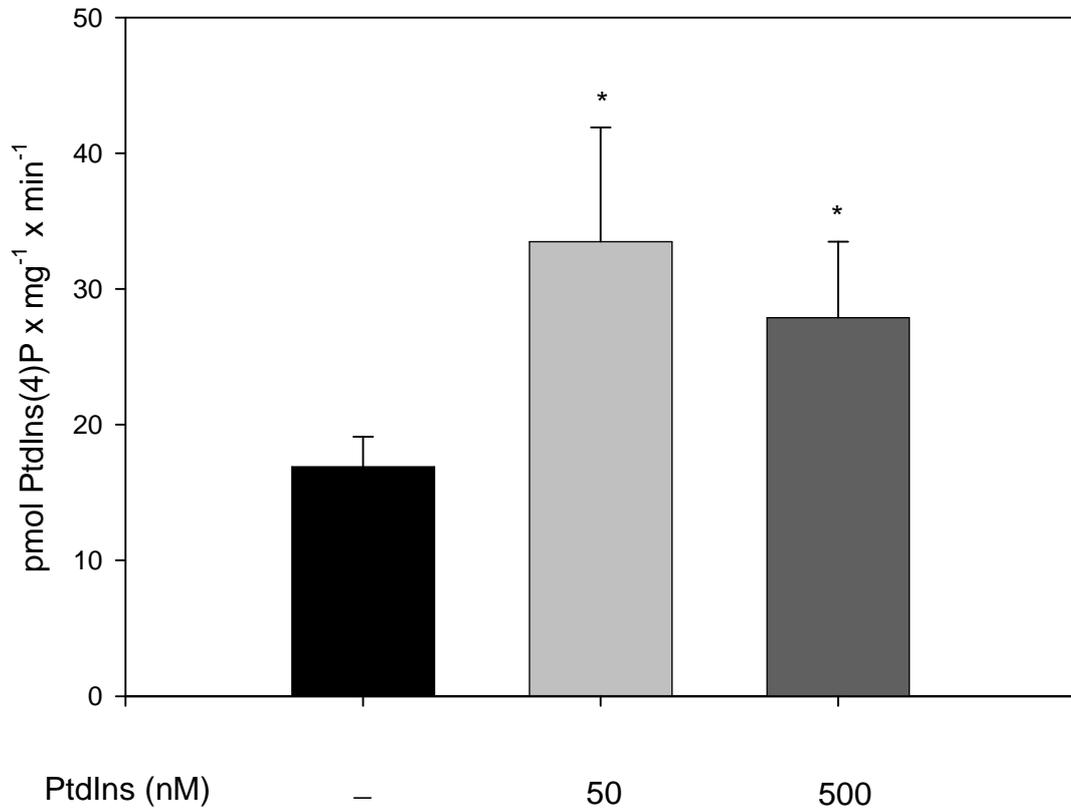


Figura 7.4. Efeito de PtdIns exógeno na atividade PtdIns 4-cinase, mostrando que adição de baixas concentrações do substrato promovem ativação máxima da enzima. * significativamente diferente do controle (média \pm EPM de três experimentos em duplicata).

funcionais, já bem descritas, sendo o parâmetro mais usual de identificação do tipo de PtdIns4K presente em um determinado tipo celular ou organela (Gehrmann & Heilmeyer, 1998; Kanaho & Suzuki, 2002). A PtdIns4K predominante em células de eucarioto é a do tipo II, residente em membrana plasmática, estando também presente em outras membranas intracelulares (Carpenter & Cantley, 1990). Entretanto, a PtdIns4K do tipo III também já foi identificada em membrana plasmática (Ekblad & Jergil, 2001), sendo este o tipo predominante de membrana em células COS-7 (Balla *et al.*, 2005). Na intenção de identificar qual o tipo de PtdIns4K se encontra presente em membrana basolateral de túbulos proximais renais, utilizamos algumas das características descritas para essas proteínas, especificamente: a sensibilidade à Wtm; sensibilidade ao Ca^{2+} ; e peso molecular.

O IC_{50} da PtdIns4K para Wtm se encontra na faixa de 50-100 nM (Balla, 1998). Quando adicionamos concentrações acima do IC_{50} (100 e 200 nM) de Wtm nos ensaios de atividade da PtdIns4K, não vemos qualquer inibição significativa (Figura 7.5). O Wtm, inibidor clássico da PtdIns3K (Fruman *et al.*, 1998), tem ação inibitória na PtdIns4K do tipo III (Carpenter & Cantley, 1990). Portanto, o resultado da Figura 7.5 nos indica que a formação de PtdIns(4)P em frações de MBL de epitélio renal é decorrente de uma atividade PtdIns4K tipo II, dada a insensibilidade a esse composto. Outra característica das PtdIns4K do tipo II é a sua inibição quando na presença de Ca^{2+} na faixa micromolar (Porter *et al.*, 1988; Wetzker *et al.*, 1991). Utilizamos uma ampla faixa de concentrações de Ca^{2+} livre para avaliar seus efeitos na atividade PtdIns4K. A concentração de Ca^{2+} livre foi determinada através de um programa, levando em consideração as concentrações de EGTA, Ca^{2+} , ATP, Mg^{2+} e H^+ , como descrito em Sorenson *et al.* (1986). Vemos na Figura 7.6 que há uma inibição de 40% na síntese de PtdIns(4)P em concentrações acima de 10 μM

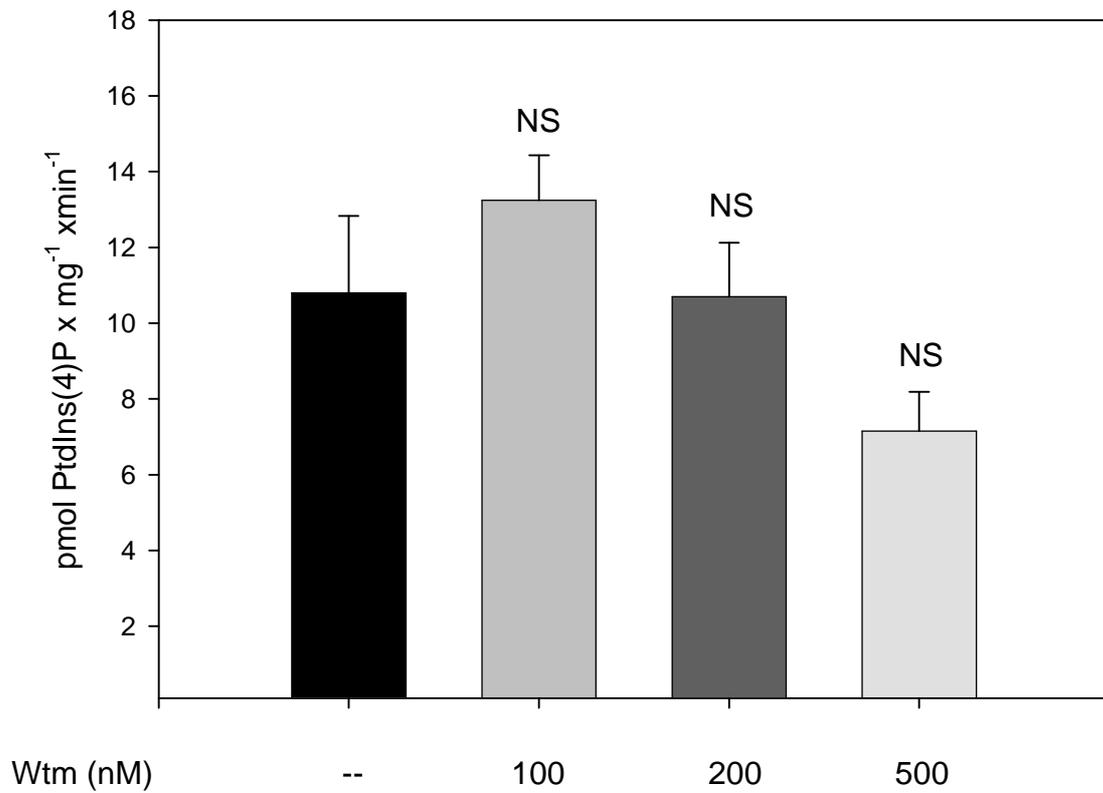


Figura 7.5. Atividade PtdIns 4-cinase na presença de concentração crescentes de Wtm. Insensibilidade a esse composto indica atividade PtdIns 4-cinase característica do tipo II. NS não há diferença significativa (média \pm EPM de três experimentos em duplicata).

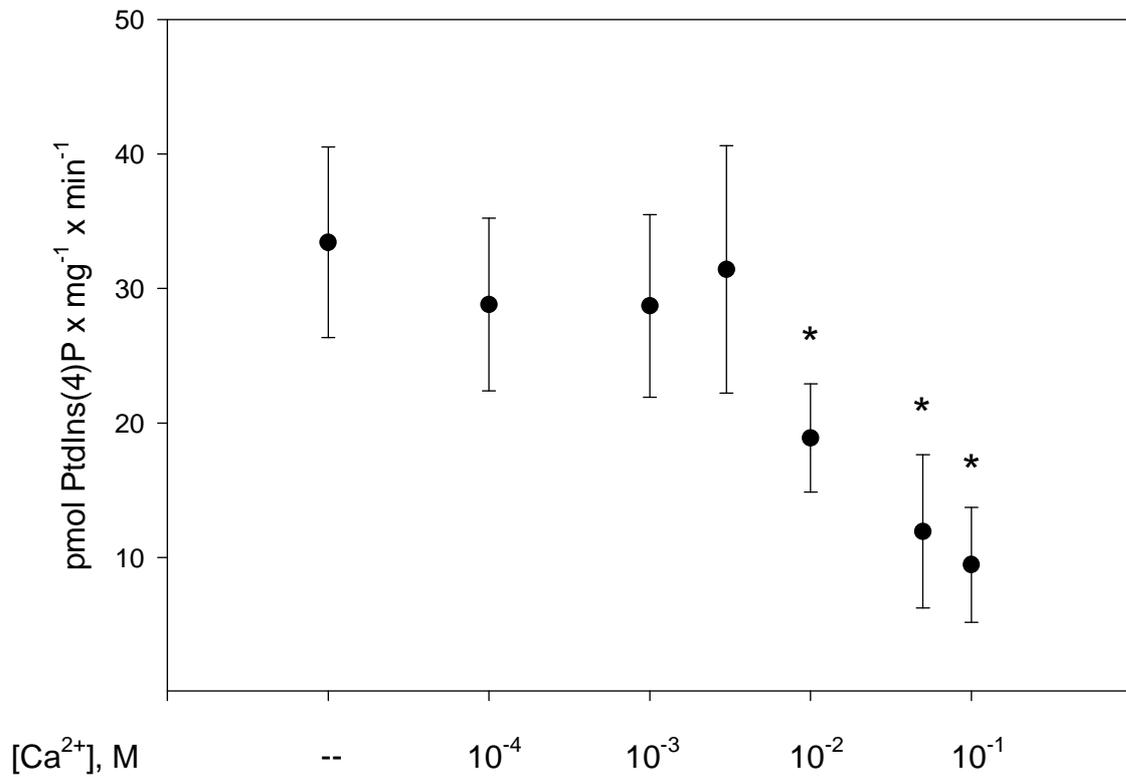


Figura 7.6. Concentrações crescentes de Ca²⁺ livre inibem a atividade PtdIns 4-cinase. A concentração de Ca²⁺ livre foi obtida através de solução de CaCl equilibrado com EGTA (ver texto). * sinificativamente diferente da condição controle (média ± EPM de três experimentos em duplicata).

de Ca^{2+} livre, embora concentrações mais altas promovam uma inibição adicional, de cerca de 70% da atividade controle.

Em vista desses resultados, resolvemos verificar através de imunodeteção a presença de uma PtdIns4K tipo II em frações de MBL de epitélio renal. Para isso, fizemos uso do anticorpo anti-PtdIns4K α (sc-10799, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Esse anticorpo, sintetizado contra uma região próxima do N-terminal da proteína PtdIns4K α de humanos, compreendida entre os resíduo 113-254, é capaz de reconhecer PtdIns4K na faixa de 43-97 kDa, correspondentes às isoformas de PtdIns4K tipo II já descritas. Quando incubamos as membranas de nitrocelulose com o anticorpo sc-10799, identificamos pelo menos duas bandas, de aproximadamente 57-62 kDa (Figura 7.7). Em cerebelo de rato, usado como controle positivo, também é visível uma banda nesta faixa de peso molecular (ver Figura. 7.7).

Tendo em vista o conjunto de resultados acima descritos, podemos afirmar então que o PtdIns(4)P presente em frações de membrana basolateral de túbulo proximal renal é sintetizado por uma PtdIns4K do tipo II.

Diversos trabalhos na literatura mostram que diferentes fosfoinosítídeos se encontram compartimentalizados em microdomínios de membrana, onde também se localizariam as enzimas envolvidas em seu metabolismo, sendo esses lipídios preferencialmente metabolizados nesses *rafts* (Liu *et al.*, 1998; Bodin *et al.*, 2001; Jang *et al.*, 2001; Peres *et al.*, 2003). A hipótese sugerida é de que a compartimentalização das enzimas (cinases e/ou fosfatases), e o conseqüente enriquecimento de determinadas espécies de fosfoinosítídeos nesses *rafts* lipídicos favoreceria a interação dos lipídios sinalizadores com suas moléculas-alvo (Payrastre *et al.*, 2001). Principalmente, os trabalhos do grupo da Dr^a. Linda Pike

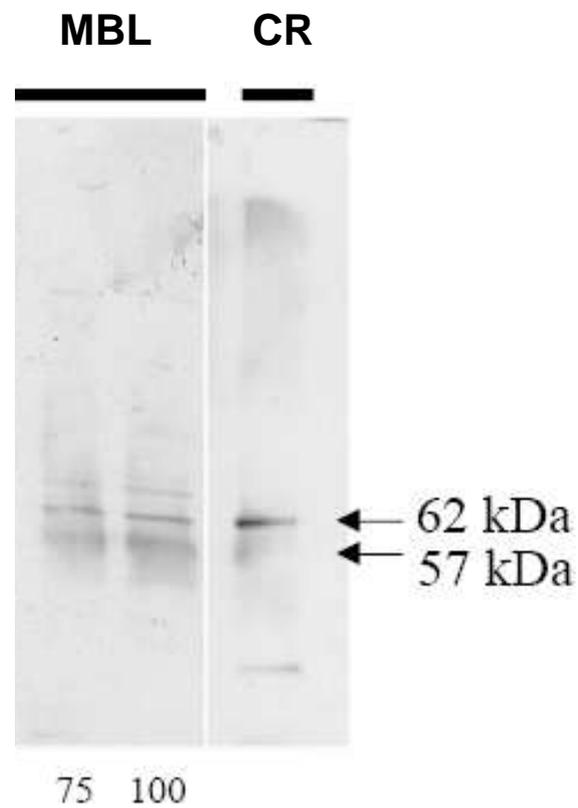


Figura 7.7. Imunodeteccção da PtdIns 4-cinase em preparação de membrana basolateral de túbulo proximal renal (MBL), destacando duas bandas com *Mr* equivalente ao tipo II dessa enzima. Como controle, usamos homogenato de cerebello de ratos (CR - 100 μ g). Os números 75 e 100 correspondem às quantidades de amostra utilizada, em μ g.

mostram que esta compartimentalização dos diferentes fosfoinosítídeos em *rafts* pode variar de um tipo celular para outro (Hope & Pike, 1996; Liu *et al.*, 1998; Pike & Miller, 1998). Contudo, alguns trabalhos sugerem que os procedimentos usados no isolamento dos microdomínios podem afetar a localização de determinadas proteínas, e mesmo de fosfolipídios (Song *et al.*, 1996; Macdonald & Pike, 2005).

Tendo em vista essas contradições na literatura, particularmente no que se refere à PtdIns4K, procuramos investigar sua localização em MBL de túbulos renais. Recentemente demonstramos que em MBL há uma quantidade significativa da proteína marcadora de cavéolas, a caveolina-1, o que indicaria a presença de microdomínios nas células epiteliais renais (Tortelote *et al.*, 2004). Além disso, demonstramos também que a atividade da Ca^{2+} -ATPase de membrana plasmática, envolvida com o ajuste fino das concentrações de cálcio intracelular, se localiza exclusivamente nestes microdomínios ricos em caveolina-1, dependendo da integridade estrutural destes para seu adequado funcionamento (Tortelote *et al.*, 2004). A regulação da atividade da Ca^{2+} -ATPase por PtdIns(4)P, descrito também em frações de MBL (Guilherme *et al.*, 1998), sugere que esse fosfolipídio pode estar sendo translocado para os microdomínios, ou sintetizado nos mesmos, onde participariam da rede de regulação do transporte ativo de Ca^{2+} .

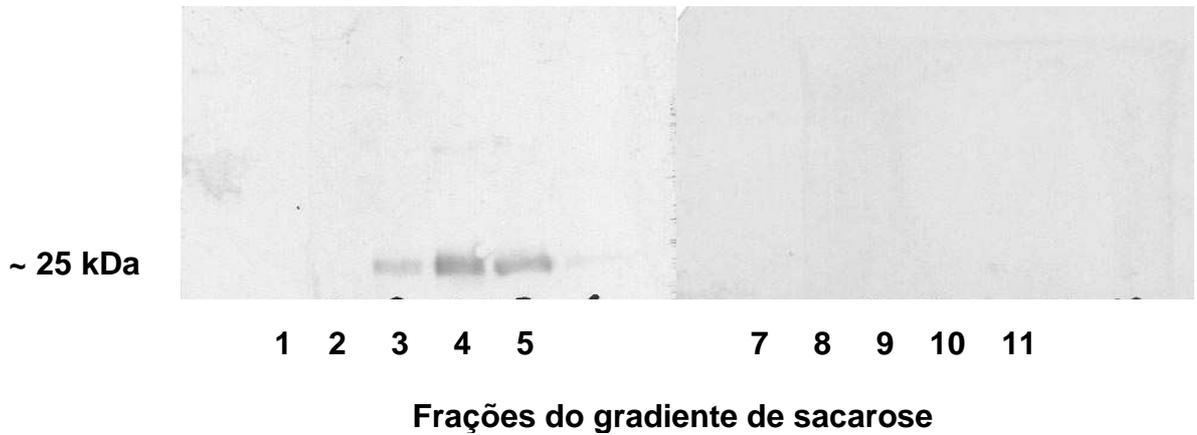
Para investigar se a PtdIns4K se encontra em regiões de *rafts* lipídicos, utilizamos as propriedades características desses domínios, isto é, sua resistência a solubilização por detergentes não-iônicos, e sua baixa densidade (ver seção 6.3. EXTRAÇÃO DE MICRODOMÍNIOS DE MEMBRANA). A presença de uma proteína marcadora de *rafts* caveolares, a caveolina-1, identificada através de imunodeteção (M_r de cerca de 25 kDa) nas frações de baixa densidade (frações 3-5) confirmou o enriquecimento de microdomínios em frações de MBL de túbulos renais (figura

7.8A). Como vemos na Figura 7.8B, a distribuição de proteínas ao longo do gradiente de sacarose foi semelhante ao descrito na literatura, sendo que grande parte destas se encontram nas frações de alta densidade (frações 10-12 do gradiente).

Uma vez isolados os *rafts* lipídicos, nos interessou investigar a atividade da PtdIns4K nas diferentes frações do gradiente de sacarose, a fim de determinar se há ou não compartimentalização desta enzima nas regiões de microdomínios. Para tanto, incubamos 50 µg de proteína de cada fração do gradiente com [γ^{32} P]ATP, seguido de extração e separação de lipídios, onde observamos a incorporação do [γ^{32} P] na molécula de PtdIns. Uma alta atividade PtdIns4K é observada na região de baixa densidade (fração 5) do gradiente de sacarose, sendo esta também imunopositiva para caveolina-1 (ver Fig. 7.8A), indicando o enriquecimento dessa enzima em microdomínios de membrana (Figura 7.9). Foi recuperada $59 \pm 11\%$ da atividade PtdIns4K nas frações de baixa densidade, imunopositivas para caveolina-1, consistentes com os achados de Waugh *et al.* (1998).

A participação de *rafts* lipídicos na sinalização por PIP₂ já esta relativamente bem estabelecida (revisto em van Rheenen *et al.*, 2005). Entretanto, a questão do uso de detergentes para a separação dos *rafts* é alvo de várias críticas (Smart *et al.*, 1995; Mayor & Rao, 2004; Lichtenberg *et al.*, 2005). Esses autores alertam para o fato de que, nos estudos bioquímicos nos quais há isolamento de *rafts*, os microdomínios de membranas e as membranas resistentes a detergente (as chamadas DRM) são erroneamente considerados entidades semelhantes. O argumento contrário ao uso de detergentes no processo de isolamento de *rafts* é o

(A)



(B)

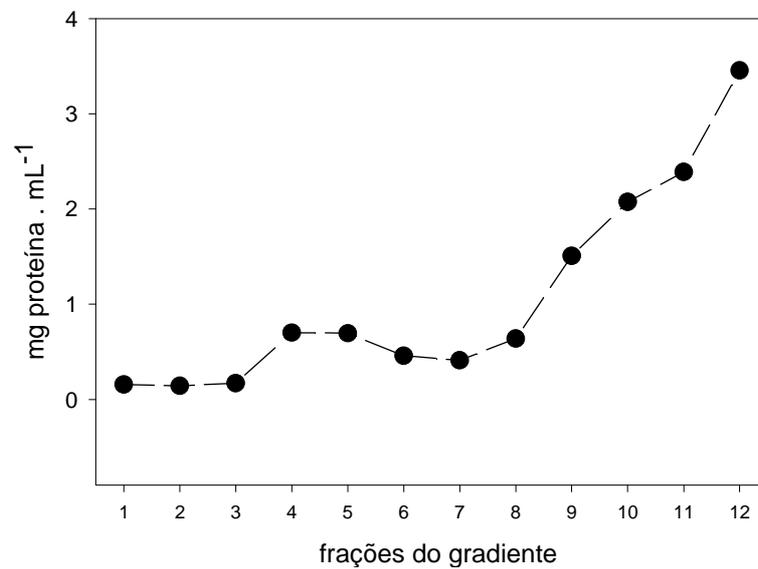


Figura 7.8. (A) imunodeteção de caveolina-1, confirmando o enriquecimento de microdomínios de membrana nas frações de baixa densidade do gradiente de sacarose (frações 3,4 e 5). (B) dosagem de proteínas das frações obtidas após o gradiente de sacarose (resultado representativo de três experimentos).

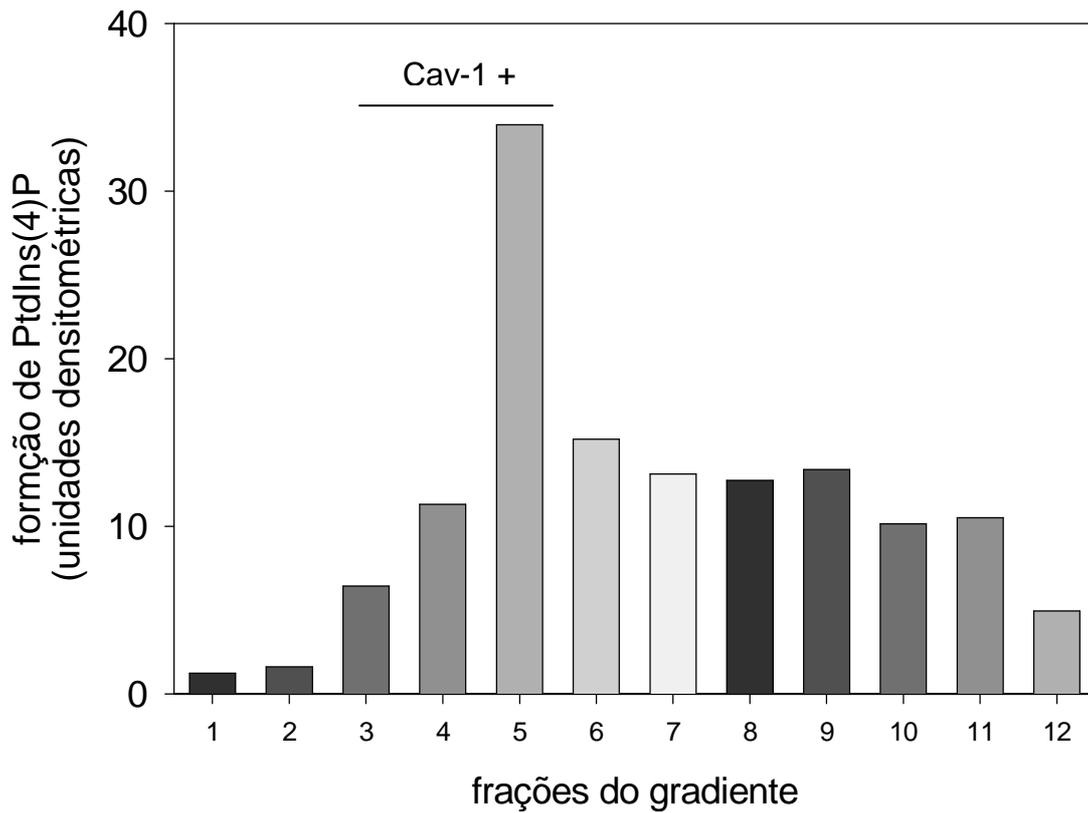


Figura 7.9. Atividade PtdIns 4 –Cinase nas frações do gradiente de sacarose, confirmando o enriquecimento dessa proteína em microdomínios de membrana . Cav-1 + indicam frações imunopositivas para caveolina-1 (resultado representativo de três experimentos).

de que a presença dessas moléculas anfipáticas em meio às membranas biológicas poderia “forçar” o agrupamento de moléculas (protéicas ou lipídicas) em regiões resistentes à solubilização, que *in vivo* não necessariamente estariam em *rafts* (Shogomori & Brown, 2003; Lichtenberg et al., 2005). Apesar disso, o uso de detergentes continua sendo a principal abordagem no estudo de microdomínios.

No final dos anos 90, Pike & Casey (1996) mostram que o *pool* de PIP₂ hormônio-sensível (aquele hidrolisado quando há estímulos extracelulares) se encontra preferencialmente em *rafts* lipídicos (Pike & Casey, 1996). Os resultados mostrados acima nos sugerem que pode haver também um *pool* de PtdIns(4)P sintetizado em *rafts*. Deve-se enfatizar que observamos um enriquecimento significativo da atividade da PtdIns4K em microdomínios, havendo ainda a formação considerável de Ptdins(4)P nas outras frações do gradiente de sacarose, não marcadas para caveolina-1. Sugere-se, então, que há um *pool* de PtdIns(4)P potencialmente envolvido na ressíntese de PIP₂ após sua hidrólise, mantendo os níveis desse lipídio relativamente constantes. Evidências de que há metabolização de PIP₂ estimulada pela ativação do receptor de EGF em microdomínios (Pike & Casey, 1996; Pike & Miller, 1998), e a potente ativação de PtdIns4K por esse fator de crescimento (Waugh et al., 1998) reforçam essa hipótese.

A localização de cerca de 60% da atividade PtdIns4K de MBL de túbulos renais em microdomínios de membrana nos dá alguns indícios sobre as vias responsáveis pela regulação de sua atividade, que por sua vez seriam também compartimentalizadas nos microdomínios. A regulação da PtdIns4K por receptores acoplados a proteína G, ou tirosinas cinases e outras proteínas regulatórias já foi observada em diferentes tipos celulares (Huang *et al.*, 2002; Gromada et al., 2005; Naveen *et al.*, 2005). Huang *et al.*, (2002) mostraram em células HEK-293 (epitélio

renal humano) um aumento na atividade PtdIns4K quando era estimulado o receptor extracelular sensível ao cálcio (CaR), acoplado à proteína G. Além da ativação da PtdIns4K, o CaR ativaria paralelamente uma fosfolipase C (PLC), levando a aumentos nos níveis de DAG e IP₃ (Huang *et al.*, 2002), sugerindo que a atividade PtdIns4K estaria envolvida no reestabelecimento dos níveis de PIP₂. A formação de PtdIns(4)P e de PIP₂ se mostrou um importante evento no processo de excitose mediada pela glicose, em células pancreáticas (Gromada *et al.*, 2005). Em células basófilas (RBL2H3) a PtdIns4K foi implicada na via ativada por receptores de IgE (FcεRI), sendo necessária manutenção dos níveis de colesterol nessas células para o seu adequado funcionamento (Naveen *et al.*, 2005). Além disso, a interação entre a PtdIns4K e outras proteínas sinalizadoras e do citoesqueleto sugere a participação dessa enzima em fenômenos celulares ainda não estabelecidos (Kim *et al.*, 2000). Notadamente, algumas das proteínas que já foram associadas a PtdIns4K (interagindo ou regulando a atividade dessa enzima), também já foram descritas em microdomínios (Field *et al.*, 1995; Kifor *et al.*, 1998; Garcia-Marcos *et al.*, 2006).

A interação entre esfingolípídios e fosfoinosítídeos já foi observada em epitélio de túbulos renais e plaquetas (Hashizume *et al.*, 1996; Kobayashi *et al.*, 2005). Evidências de que a Sph e/ou seu derivado fosforilado, S1P, podem regular a atividade da PtdIns4K (Einicker-Lamas *et al.*, 2003), e a presença desta em regiões de microdomínios de membrana, ricas em esfingolípídios, sugere uma importante via de regulação da formação de PtdIns(4)P. Na tentativa de elucidar essa interação, fizemos ensaios de lipídios cinases na presença ou ausência de PtdIns exógeno, com adição de 100 μM de Sph ao meio de reação (Figura 7.10). Vemos um efeito estimulatório da Sph na atividade da PtdIns4K, sendo que a adição de PtdIns (20 nM), apesar de levar a aumentos na formação de PtdIns(4)P, parece não ter efeito

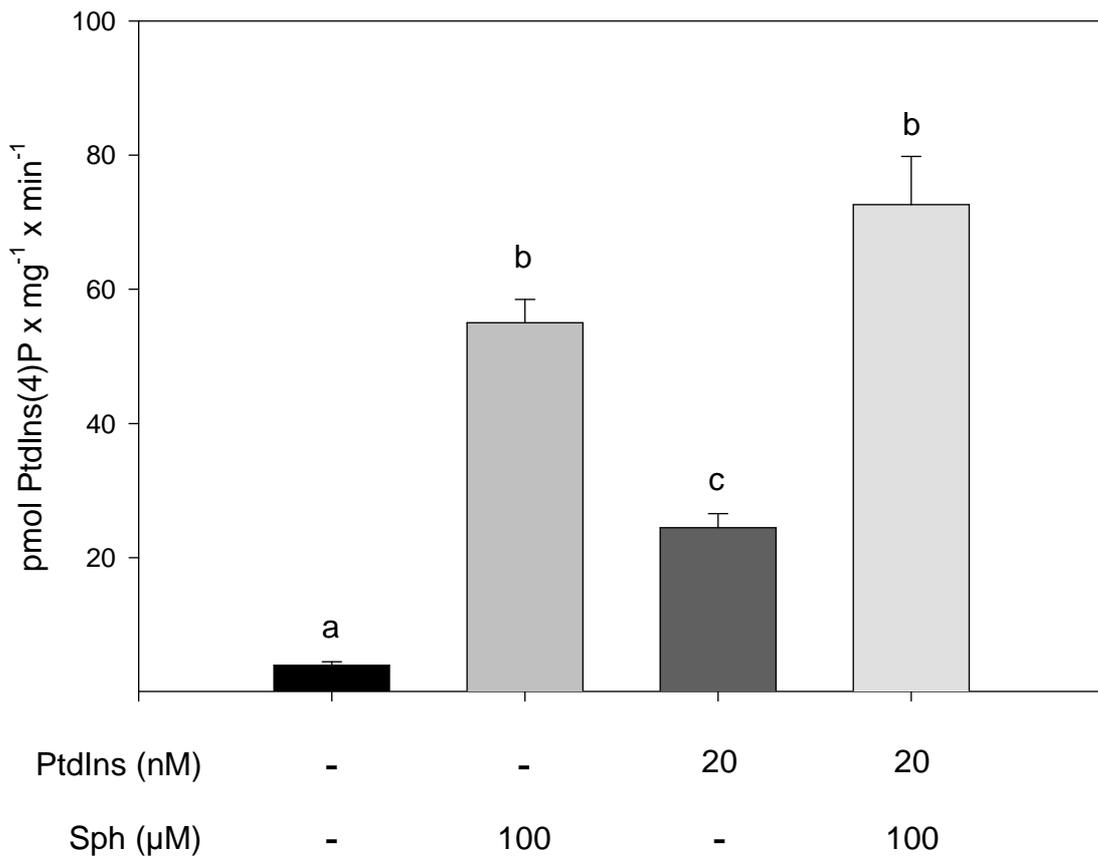


Figura 7.10. Efeito da Sph na atividade PtdIns 4 –Cinase, na ausência e presença de 20 nM de PtdIns exógeno. ^a, ^b, ^c indicam diferença significativa entre as condições. (média ± EPM de três experimentos em duplicata).

aditivo em conjunto com a Sph. Concentrações crescentes de Sph foram então adicionadas ao meio de reação e, como podemos verificar, há um efeito bifásico, com aumento da atividade da PtdIns4K em concentrações até 100 μM (aumento de cerca de 3,8 vezes), enquanto concentrações altas de Sph (300 e 500 μM) mostram uma tendência a manter a atividade próxima dos níveis controles ($16,6 \pm 6 \text{ pmol PtdIns(4)P} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$) em altas concentrações de Sph (300 e 500 μM , Figura 7.11). Esse fenômeno bifásico da Sph poderia ser explicado: (1) por sua estrutura química, sendo que altas concentrações de Sph favoreceriam um efeito inespecífico, semelhante à de um detergente, o que poderia afetar negativamente a atividade enzimática, ou (2) pela formação de S1P, via atividade SK residente em MBL (Einicker-Lamas *et al.*, 2003), que poderia ter efeito contrário ao da Sph, na atividade da PtdIns4K. Nesse sentido, examinamos a formação de S1P nas diferentes concentrações de Sph, utilizadas no experimento da Figura 7.11. Na figura 7.12, podemos ver que ocorre formação significativa de S1P somente quando adicionados, ao meio de reação, concentrações de Sph acima de 100 μM . Comparando com os resultados da Figura 7.11, vemos que a atividade PtdIns4K tende a retornar ao nível controle quando há níveis consideráveis de S1P presentes. Esses dados sugerem que o balanço entre Sph e S1P seria importante para modulação da atividade PtdIns4K, e, conseqüentemente, dos níveis de PtdIns(4)P. Maiores estudos devem ser realizados para total esclarecimento dessa questão.

Uma outra base esfingóide encontrada em níveis significativos em tecido renal é a esfinganina (ou dihidroesfingosina, Dhs) (Tou & Huggins, 1977). Por não apresentar a dupla ligação no C4, importante para a função biológica de bases esfingóides (Liao *et al.*, 2005), a Dhs em princípio não deveria apresentar efeito biológico significativo. Entretanto, a Dhs tem sido descrita como um importante

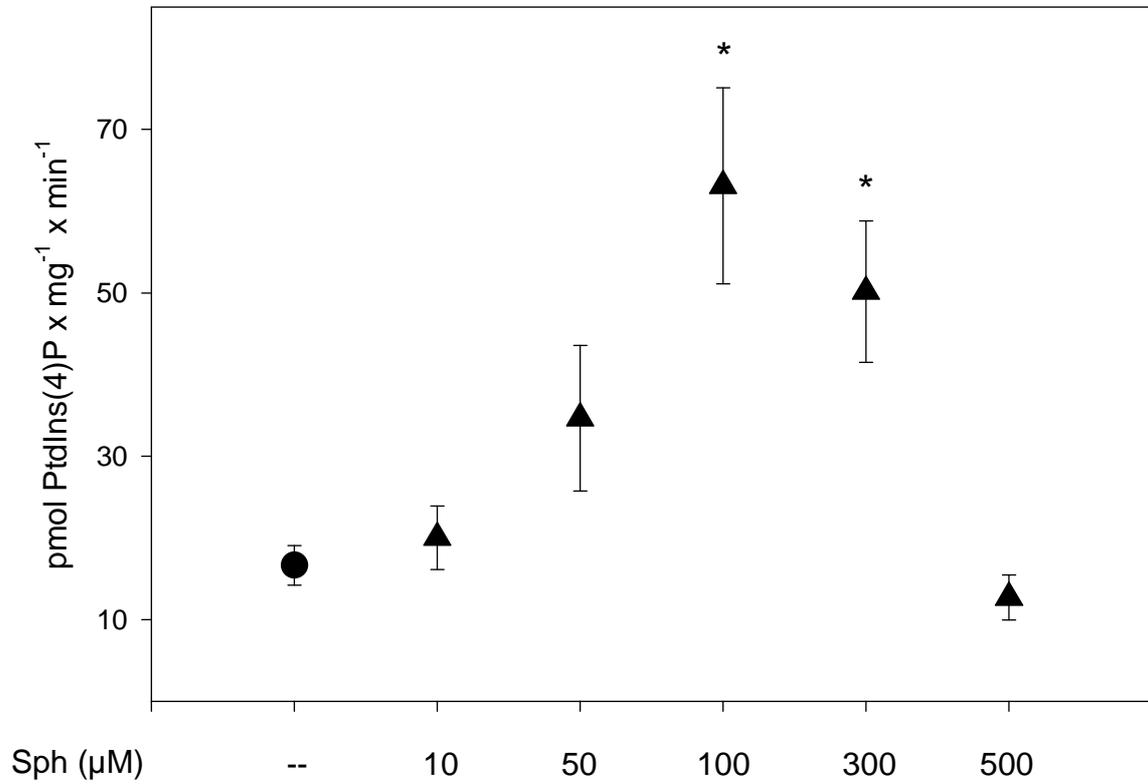


Figura 7.11. atividade PtdIns 4-cinase na presença de concentrações crescentes de esfingosina, mostrando uma resposta bifásica. * significativamente diferente da condição controle (média ± EPM de três experimentos em duplicata).

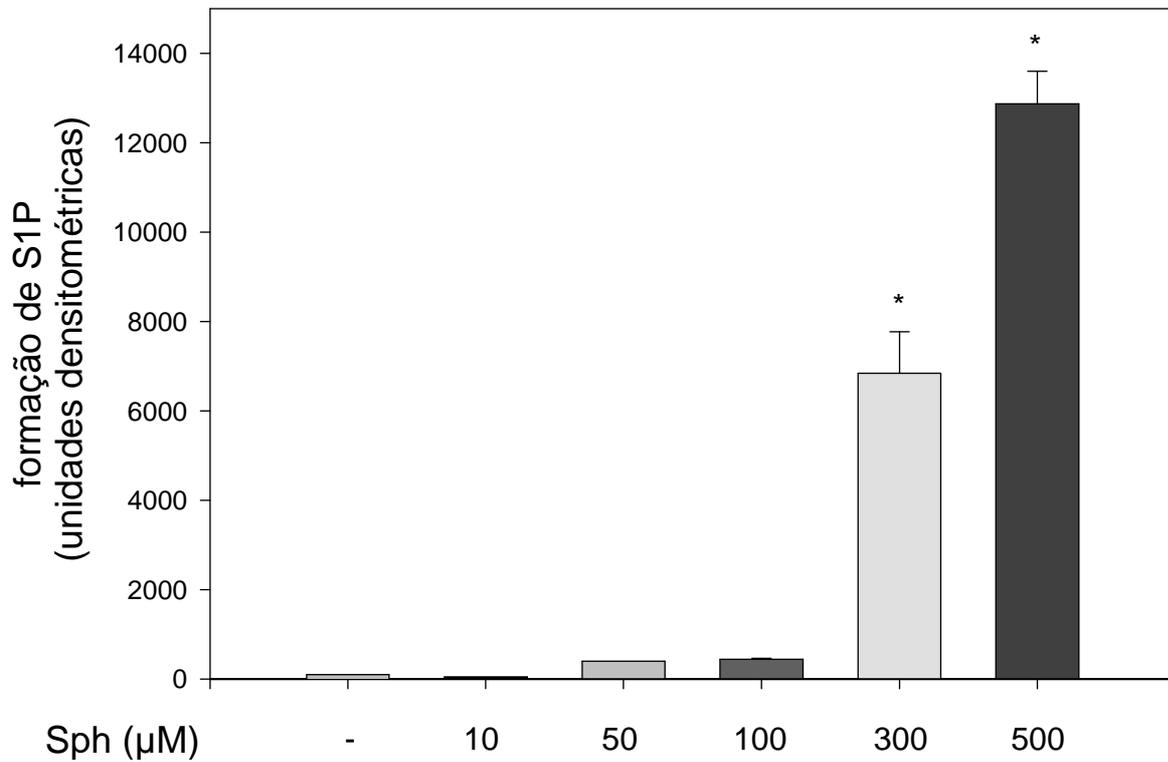


Figura 7.12. Presença de esfingosina-1-fosfato no ensaio de lipídeo cinase, indicando a formação significativa desse lipídeo em altas concentrações de esfingosina. * significativamente diferente da condição controle (média \pm EPM de três experimentos em duplicata).

inibidor de proteínas cinases ativadas por mitógenos, as proteínas ERK1 e ERK2 (Tolan *et al.*, 1996). Em nossa preparação de MBL, verificamos que a Dhs também possui ação regulatória na atividade da PtdIns4K, semelhante à Sph, ainda que o aumento promovido na atividade dessa enzima tenha sido menor (cerca de 2,2 vezes, Figura 7.13). A ação de bases esfingóides, em particular as suas proteínas-alvo, ainda não estão bem descritas ou caracterizadas. Classicamente, a Sph foi identificada como um importante inibidor da PKC (Hannun *et al.*, 1986). Desde essa descrição, outras proteínas cinases, assim como fosfatases e canais iônicos, já foram identificados como alvos da Sph (McDonald *et al.*, 1991; Tolan *et al.*, 1996; Monick *et al.*, 2004; Ahn & Schroeder, 2006).

King *et al.* (2000) identificaram uma importante proteína cinase como uma das proteínas-alvo da Sph, a cinase tipo I-dependente de fosfoinosítídeo, ou PDK1. A PDK1 tem papel fundamental em vias de sinalização que envolvem cascatas de fosforilação, uma vez que ela regula os níveis de fosforilação das proteínas cinases da família ABC (Newton, 2003). De fato, a ação da Sph na PDK1 leva a fosforilação de determinadas regiões da PKA, Akt, PAK1 e PKC (King *et al.*, 2000). Sendo assim, a via de regulação da PtdIns4K por Sph provavelmente envolveria uma proteína cinase e eventos de fosforilação. Com o intuito de confirmar essa hipótese, submetemos as frações de MBL a um ensaio de fosforilação de proteínas, adaptado de Capasso *et al.* (1985). Nesse ensaio, incubamos a MBL com [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP, e depois submetemos à SDS-PAGE e *Western blotting*, obtendo então um autoradiograma da membrana de nitrocelulose radioativa. Na figura 7.14A temos a membrana corada com *rouge ponceau*, como forma de controle da quantidade de proteínas em cada poço. Vemos, na Figura 7.14B, que com a adição de concentrações crescentes de Sph há um aumento na incorporação de [$\gamma^{32}\text{P}$] nas proteínas da MBL. Notadamente,

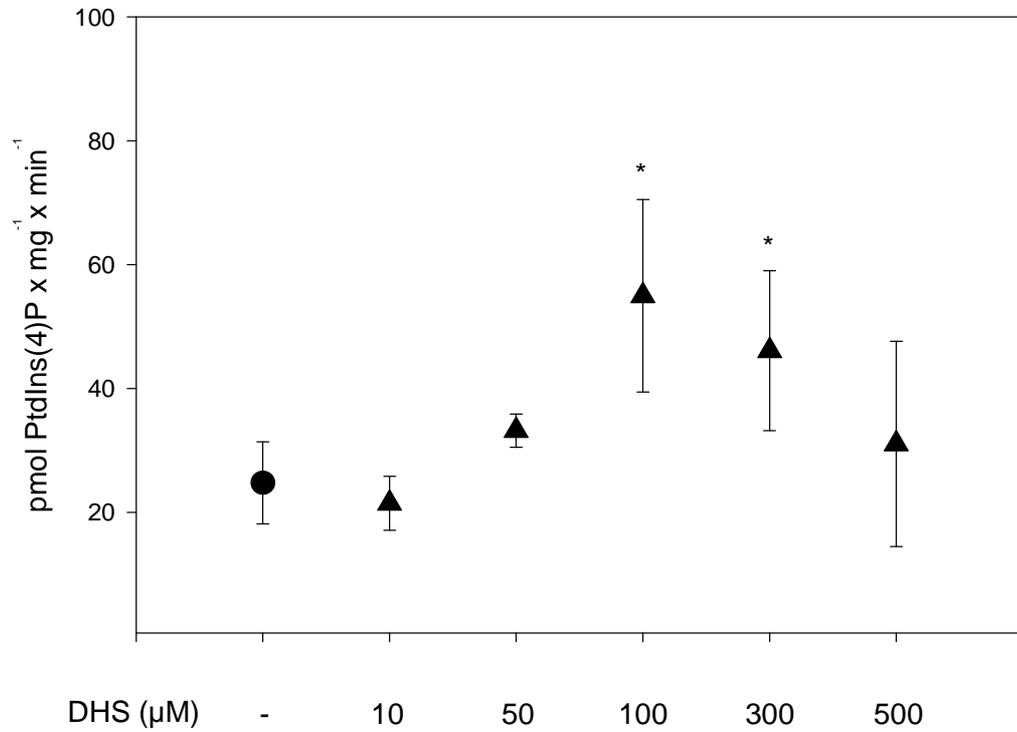


Figura 7.13. Regulação da atividade PtdIns 4-cinase por esfinganina (dihidroesfingosina, Dhs), também de modo bifásico, semelhante à esfingosina. * significativamente diferente da condição controle (média \pm EPM de três experimentos em duplicata).

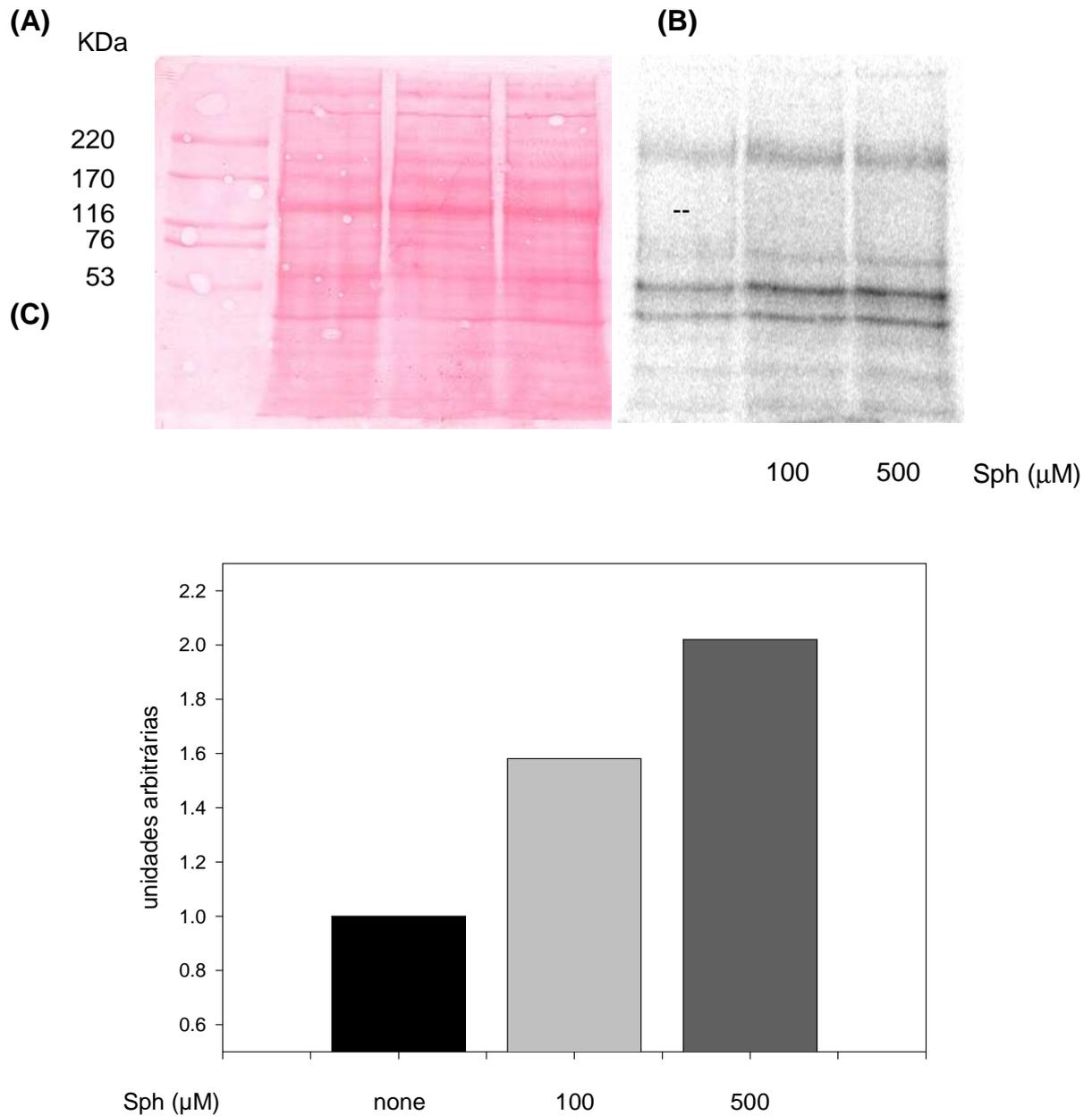


Figura 7.14. (A) membrana de nitrocelulose corada com vermelho de *ponceau* , (B) autoradiograma indicando aumento na incorporação de ^{32}P em proteínas, quando na presença de Sph (C) quantificação do aumento da fosforilação na banda de 53 kDa. (resultado representativo de dois experimentos)

a banda que mais se destaca na membrana é a de aproximadamente 53 kDa, na faixa de peso molecular das PtdIns4K do tipo II, bem próxima daquela identificada em MBL, através de imunodeteção (Figura 7.7). Corrigindo o sinal do autoradiograma pela marcação com *rouge ponceau*, podemos verificar que, na presença de Sph (100 e 500 μ M), há um aumento de ~1,5-2,0 vezes na incorporação de [γ^{32} P] na banda de ~53 kDa (figura 7.14C). O envolvimento de proteínas cinases na regulação do transporte iônico em frações de membrana isoladas já foi descrito (Assunção-Miranda *et al.*, 2005; Valverde *et al.*, 2005), indicando que a transdução de sinais (e cascatas de fosforilação) ocorre rapidamente, não dependendo de nenhuma outra estrutura subcelular para sua realização.

A clonagem de diferentes isoformas da PtdIns4K tipo II α foi um avanço no entendimento da estrutura e topologia dessas enzimas (Barylko *et al.*, 2001; Minogue *et al.*, 2001). Ao que parece, a PtdIns4K associada à membrana plasmática é uma proteína integral de membrana, sendo palmitoilada em um domínio próximo ao N-terminal. Entretanto a sua estrutura quaternária ainda não é conhecida. Além disso, possíveis domínios funcionais também não foram descritos. Decidimos fazer uma busca de possíveis domínios funcionais, mais especificamente domínios de fosforilação, dentro da seqüência da PtdIns4K. Fizemos uso de várias seqüências disponíveis em banco de dados de acesso livre (*Entrez Protein*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>), nos detendo àquelas proteínas descritas em *Homo sapiens*. Na Tabela 7.1, podemos identificar vários domínios reconhecidos por proteínas cinases, obtidas através do *Eukariotic Linear Motif* – ELM (<http://elm.eu.org>), um programa de busca de domínios funcionais disponível na rede. Vale ressaltar que o anticorpo anti-PtdIns4K sc-10799 foi obtido contra os

TABELA 7.1. DOMÍNIOS FUNCIONAIS DE FOSFORILAÇÃO POR PROTEÍNAS
CINASES NAS DIFERENTES ISOFORMAS DA PTDÍNS 4-CINASE

Proteína	Organismo	aa*	KDa	ELM FUNCIONAL MOTIFS						
				CDK	CK1	PKA2	PKA2	Akt	PLK	ProDK
Pi4Kα (II)**	Homo	854	94	1	10	1	4	1	4	6
NP002641	<i>sapiens</i>									
Pi4K type II	idem	479	53	1	6	-	3	-	1	5
NP060895										
AAH03167										
AAP35994										
CAC38065										
CAI15460										
Pi4Kα (III)	idem	2044	225	3	24	5	16	1	12	16
NP477352										
P42356										

* número de amino ácidos em sua seqüência predita

** o anticorpo anti Pi4K (H-142) foi obtido contra essa proteína (amino ácidos 113-254)

resíduos 113-254 desta proteína (Maraviglia, comunicação pessoal). A partir dessa busca, definimos quais as vias de sinalização a serem investigadas subsequentemente. É importantes termos em mente que a acessibilidade de um desses domínios irá depender da conformação tridimensional da proteína, o que, como já exposto, não é ainda bem definido. Contudo, a presença de inúmeros domínios reconhecidos por proteínas cinases em sua seqüência primária nos dá indícios de que esses podem ser, de fato, fosforilados.

Apesar de não ter sido identificado um domínio reconhecido por PKC na seqüência da PtdIns4K, a histórica regulação dessa proteína cinase por Sph, e por sua presença e funcionalidade em frações de MBL (Assunção-Miranda *et al.*, 2005), resolvemos investigar o envolvimento desta proteína na regulação da PtdIns4K por Sph, usando o inibidor farmacológico da PKC, o GF-109. Podemos verificar na Figura 7.15 que na presença de Sph, há um aumento da atividade da PtdIns4K, não sendo esta afetada pela presença de 500 μ M de GF-109, concentração na qual a atividade da PKC é praticamente abolida. O uso de GF-109 isoladamente não altera a atividade PtdIns4K.

A ativação direta de uma PKA por Sph foi demonstrada recentemente por Ma *et al.* (2005). Essa ativação ocorreria de maneira atípica, não estando relacionado a um aumento nos níveis intracelulares de AMPc, nem a dissociação das subunidades regulatórias. Fizemos uso do peptídeo 5-24 (PKAi), um inibidor competitivo da PKA, para estudar o envolvimento desta na ativação da PtdIns4K por Sph. Vemos na figura 7.16 que a presença de 10^{-8} M de PKAi não afeta a estimulação da PtdIns4K pela Sph, sugerindo que não há participação desta proteína nessa via. Devemos considerar, contudo, o fato de que ativação da PKA por Sph não envolver a dissociação das subunidades regulatórias e catalíticas, permanecendo essa proteína

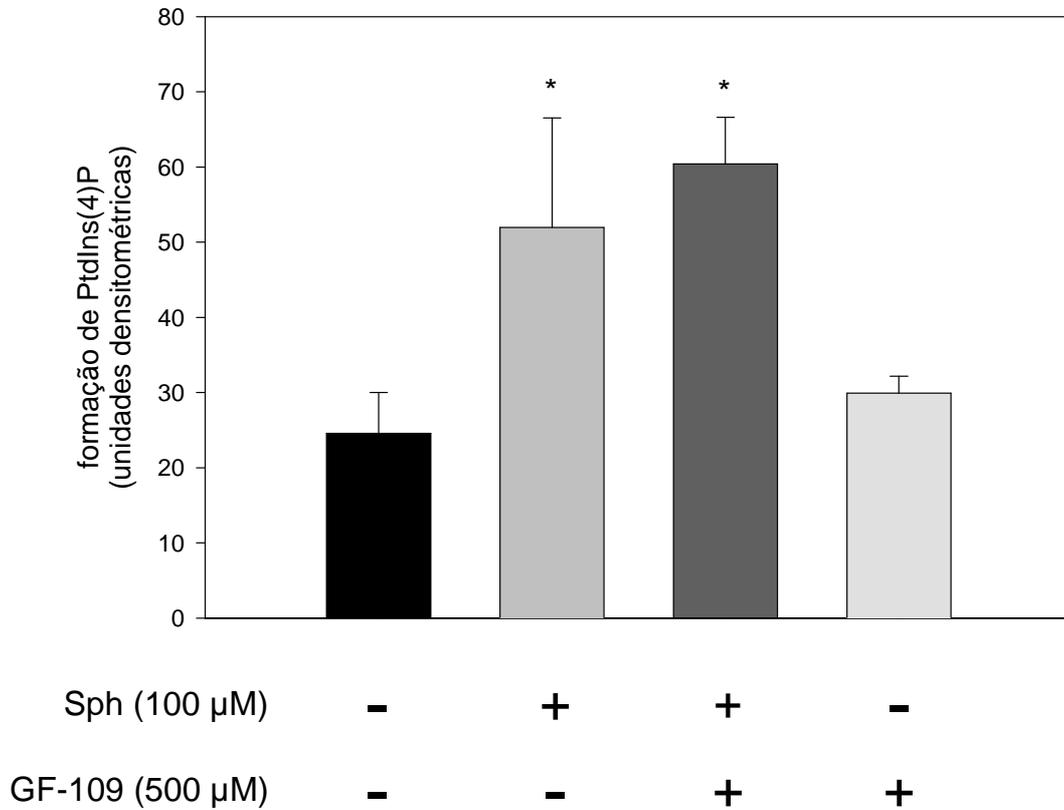


Figura 7.15. Atividade PtdIns 4-cinase na presença de esfingosina e inibidor de proteína cinase C (GF-109). * significativamente diferente da condição controle (média \pm EPM de três experimentos em duplicata).

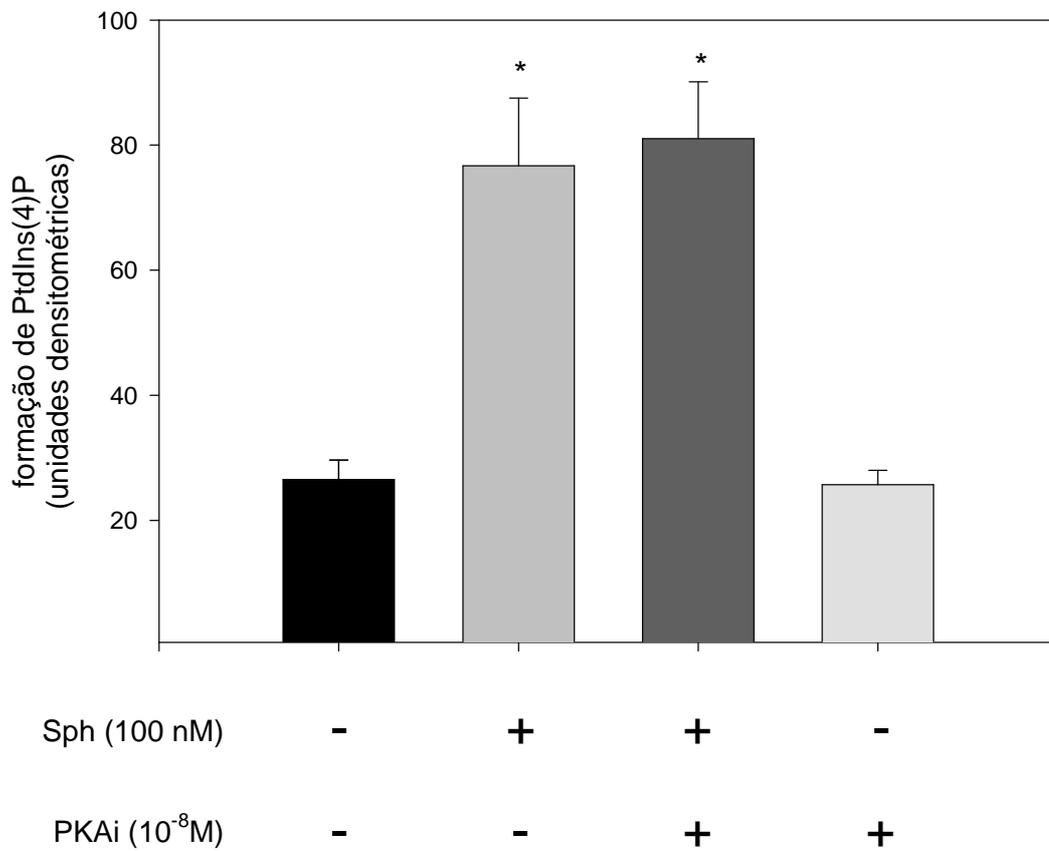


Figura 7.16. Atividade PtdIns 4-cinase na presença de esfingosina e inibidor de proteína cinase A (peptídio 5-24). . * sinificativamente diferente da condição controle (média \pm EPM de três experimentos em duplicata).

cinase em sua forma oligomérica (Ma *et al.*, 2005). Assim, os sítios usualmente descritos para PKA, apesar de existentes na seqüência da PtdIns4K, podem não estar acessíveis para a proteína oligomerizada. Por outro lado, a PKA nesse estado pode ser menos sensível ao inibidor PKAi, que interagiria com a subunidade catalítica somente. Entretanto, Ma *et al.* (2005) avaliaram a atividade cinase da PKA e mostraram que mesmo no estado oligomérico esta é sensível ao inibidor PKAi. Outros domínios ainda não caracterizados podem ser o alvo de fosforilação por PKA oligomérica, não sendo claro sua presença na PtdIns4K.

Outra proteína cinase recentemente descrita como modulada por Sph é a PKB/Akt (Monick *et al.*, 2004). Contudo, essa ativação parece não ser direta, e sim envolver a ativação prévia da PDK1 (King *et al.*, 2000). O inibidor clássico da PKB/Akt, a wortmannina, age de fato na atividade da PtdIns3K, que forma o fosfoinosítídeo responsável pela ativação da PKB/Akt, o PtdIns(3,4,5)P₃. O Wtm, porém, atua também como inibidor de uma classe de PtdIns4K, a tipo III (Gehrmann & Heilmeyer, 1998) embora tenha menor afinidade por essa última (IC₅₀ para PtdIns3K entre 1-10 nM; IC₅₀ para PtdIns4KIII entre 50-100 nM, Fruman *et al.*, 1998). Com 50 nM de Wtm (suficiente para inibição da via PtdIns3K/Akt), não foi possível reverter os efeitos estimulatórios da Sph sobre a PtdIns4K, não alterando também sua atividade quando incubada sozinha (Figura 7.17). A presença de uma PtdIns3K em microdomínios é sugerida por Peres *et al.* (2003), sendo mostrado ainda sua ativação pelo ácido lisofosfatídico (LPA). Monick *et al.* (2004) consideram que a ativação da PKB/Akt por Sph pode envolver a ativação de uma cinase tipo I dependente de Sph (SDK-1), descrita por Megidish *et al.* (2000), e a fosforilação de outras proteínas que afetariam a atividade da PKB/Akt. Entretanto, a existência de uma SDK é questionada por Ma *et al.* (2005) que mostra que essa atividade cinase é

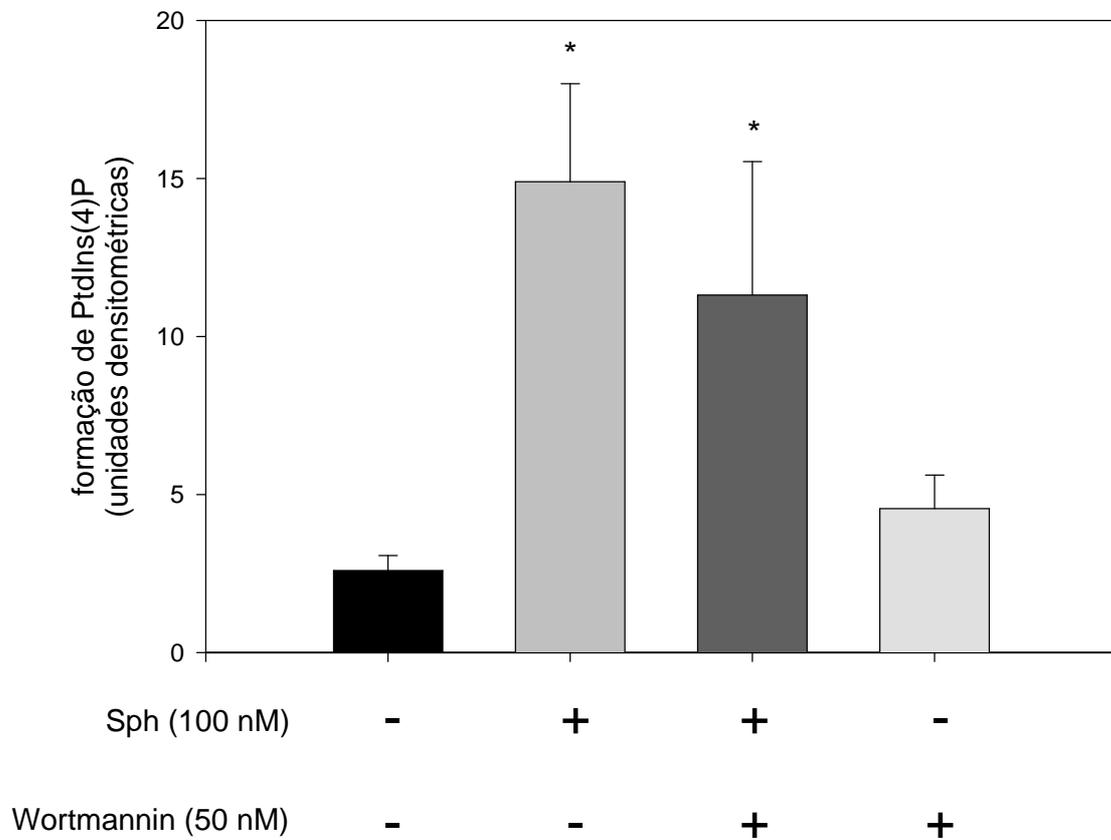


Figura 7.17. Atividade PtdIns 4-cinase na presença de esfingosina e inibidor de proteína cinase B/Akt (wortmannin). . * significativamente diferente da condição controle (média \pm EPM de três experimentos em duplicata).

decorrente da ativação não-clássica da PKA. Dessa forma, não se sabe ao certo qual o mecanismo de ativação da PKB/Akt por Sph, e se há dependência de outros elementos citossólicos ou associados à membrana, sendo que, em nossas preparações isoladas de MBL de túbulos renais, a ativação de uma PKB/Akt por Sph pode ser prejudicada pela falta de um desses elementos.

A hipótese da participação de outras proteínas cinases conhecidamente reguladas por Sph (por exemplo, ERK e caseína cinase) não é totalmente excluída, embora essas proteínas não sejam necessariamente reconhecidas como residentes de membrana. O efeito da Sph na atividade PtdIns4K pode ou não envolver outras proteínas. Um possível efeito detergente desse lipídio, que sabidamente se difunde em meio aquoso (Smith *et al.*, 2000; Futerman & Hannun, 2004), poderia estar estimulando a PtdIns4K, a exemplo do que ocorre quando esta enzima é solubilizada em meio contendo Triton X-100 ou outro detergente não-iônico (Ganong & Lu, 1989). Contudo, a ativação da PtdIns4K por Dhs, uma base esfingóide que não se difunde no citossol, sendo mais hidrofóbico que a Sph, torna essa hipótese pouco provável. A regulação da PtdIns4K por fosforilação ainda é um campo relativamente pouco explorado, havendo poucas evidências de que a PtdIns4K é regulada por fosforilação em resíduos de tirosina em linfócitos, células Jurkat e baço, estando envolvidas diversas vias de sinalização, através do complexo TCR-CD3, p56^{lck}, entre outros (Fernandis & Subrahmanyam, 1998; Fernandis & Subrahmanyam, 2000). Ainda podemos considerar a hipótese de uma autofosforilação da PtdIns4K, promovida por Sph. Sabe-se que as PtdIns3K da classe I possuem atividade cinase intrínseca, indispensável para atividade lipídio cinase, ocorrendo essa autofosforilação em resíduos de serina tanto nas

subunidades catalíticas quanto nas regulatórias (Fruman *et al.*, 1998). Não há registros de que ocorra autofosforilação na PtdIns4K.

8. CONCLUSÕES

*“Its important to bear in mind here
that you can never ‘prove’ a hypothesis –
you can only build up supporting evidence
so that you became progressively
more ‘comfortable’ with its validity”*

Sun, 2004

(1) A atividade da PtdIns4K de MBL de túbulos proximais renais pode ser atribuída a uma enzima do tipo II α , que é a responsável pela maior parte da síntese de PtdIns(4)P em diversos tipos celulares. A presença de outros tipos de PtdIns4K nas diferentes membranas existentes em células epiteliais renais (apical e de organelas) ainda deve ser investigada.

(2) Os microdomínios ou *rafts* de membrana tem participação importante na formação do PtdIns(4)P em MBL de epitélio renal, evidenciando o papel desses microdomínios na regulação do transporte transepitelial de solutos, dado a compartimentalização de ATPases e de moléculas regulatórias como o PtdIns(4)P nas mesmas.

(3) Uma vez compartimentalizada em *rafts*, o balanço entre os níveis dos diferentes espécies de esfingolipídios – em particular, esfingosina e esfingosina-1-fosfato – possui potencial de regulação da atividade da PtdIns4K tipo II residente nas MBL renais. A participação de derivados fosforilados de esfingolipídios (S1P) na inibição da síntese de PtdIns(4)P merece ainda maiores investigações.

(4) A presença de vários domínios passíveis de fosforilação por proteínas cinases evidencia o potencial de regulação da atividade da PtdIns4K presente em células epiteliais de túbulos renais, o que sugere que o seu produto, o PtdIns(4)P, atue como uma importante molécula sinalizadora nesse tecido, regulando eventos como transporte transepitelial crucial para a função desse órgão.

(5) A presença de esfingosina aumenta o estado de fosforilação de proteínas residentes de MBL de túbulos renais, contudo a regulação da atividade da PtdIns4K parece envolver proteínas cinases ainda não descritas ou relacionadas a este tecido. A existência de uma proteína cinase dependente de esfingosina é ainda controversa, mas não pode ser desconsiderada

9. REFERÊNCIAS

- Ahn, E.H.; Schroeder, J.J. Sphinganine causes early activation of JNK and p38 MAPK and inhibition of AKT activation in HT-29 human colon cancer cells. *Anticancer Res* 26: 121-127, 2006
- Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. *Molecular Biology of the Cell*. 4th ed. Garland Science, New York, 2002
- Anderson, R.G.; Jacobson, K. A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains. *Science* 296: 1821-1825, 2002
- Anderson, R.G. Caveolae: where incoming and outgoing messengers meet. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 10909-10913, 1993
- Anderson, R.G. The caveolae membrane system. *Annu Rev Biochem* 67: 199-225, 1998
- Antonsson, B. Phosphatidylinositol synthase from mammalian tissues. *Biochim Biophys Acta* 1348: 179-186, 1997
- Assuncao-Miranda, I.; Guilherme, A.L.; Reis-Silva, C.; Costa-Sarmiento, G.; Oliveira, M.M.; Vieyra, A. Protein kinase C-mediated inhibition of renal Ca²⁺ ATPase by physiological concentrations of angiotensin II is reversed by AT1- and AT2-receptor antagonists. *Regul Pept* 127: 151-157, 2005
- Balla, T. Phosphatidylinositol 4-kinases. *Biochim Biophys Acta* 1436: 69-85, 1998
- Balla, A.; Tuymetova, G.; Tsiomenko, A.; Várnai, P.; Balla, T. A plasma membrane pool of phosphatidylinositol 4-phosphate is generated by phosphatidylinositol 4-kinase type-III alpha: Studies with the PH domains of the oxysterol binding protein and FAPP1. *Mol Biol Cell* 16: 1282-1295, 2005

- Balzer-Yost, B.; Nofziger, C. Phosphoinositide lipid second messengers: new paradigms for transepithelial signal transduction. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 450: 75-82, 2005
- Barenholz, Y.; Thompson, T.E. Shingomyelins in bilayers and biological membranes. *Biochim Biophys Acta* 604: 129-158, 1980
- Barylko, B.; Gerber, S.H.; Binns, D.D.; Grichine, N.; Khvotchev, M.; Südhof, T.C.; Albane, J.P. A novel family of phosphatidylinositol 4-kinase conserved from yeast to humans. *J Biol Chem* 276: 7705-7709, 2001
- Berridge, M.J. Elementary and global aspects of calcium signaling. *J Physiol (Lond)* 499: 291-306, 1997
- Bodin, S.; Giuriato, S.; Ragab, J.; Humbel, B.M.; Viala, C.; Vieu, C.; Chap, H.; Payrastre, B. Production of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate and phosphatidic acid in platelet rafts: evidence for a critical role of cholesterol-enriched domains in human platelet activation. *Biochemistry* 40: 15290-15299, 2001
- Brockhoff, H.; Ballou, C.E. On the metabolism of the brain phosphoinositide complex. *J Biol Chem* 237: 1764-1766, 1962
- Cao, G.; Yang, G.; Timme, T.L.; Saika, T.; Truong, L.D.; Satoh, T.; Goltson, A.; Park, S.H.; Men, T.; Kusaka, N.; Tian, W.; Ren, C.; Wang, H.; Kadmon, D.; Cai, W.W.; Chinault, A.C.; Boone, T.B.; Bradley, A.; Thompson, T.C. Disruption of the caveolin-1 gene impairs renal calcium reabsorption and leads to hypercalcinuria and urolithiasis. *Am J Pathol* 162: 1241-1248, 2003
- Capasso, J.M.; Abeijon, C.; Hirschberg, C.B. Phosphoproteins and protein kinases of the Golgi apparatus membrane. *J Biol Chem* 260: 14879-14884, 1985

- Carpenter, C.L.; Cantley, L.C. Phosphoinositides kinases. *Biochemistry* 29: 11147-11156, 1990
- Cascio, M. Connexins and their environment: effects of lipids composition on ion channels. *Biochim Biophys Acta* 1711: 142-153, 2005
- Chapelle, S.; Gilles-Baillien, M. Phospholipids and cholesterol in brush border and basolateral membranes from rat intestinal mucosa. *Biochim Biophys Acta*. 753: 269-271, 1983
- Cockcroft, S.; De Matteis, M.A. Inositol lipids as spatial regulators of membrane traffic. *J Membrane Biol* 180: 187-194, 2001
- Cowart, L.A.; Hannun, Y.A. Using genomic and lipidomic strategies to investigate sphingolipids functions in the yeast heat-stress response. *Biochem Soc Trans* 33: 1166-1169, 2005
- Cremona, O; De Camilli, P. Phosphoinositides in membrane traffic at the synapse. *J Cell Sci* 114: 1041-1052, 2001
- Czech, M. Dynamics of phosphoinositides in membrane retrieval and insertion. *Annu Rev Physiol* 65: 791-815, 2003
- De Matteis, M.A.; Godi, A. Protein-lipid interactions in membrane trafficking at the Golgi complex. *Biochim Biophys Acta* 1666: 264-274, 2004
- Edidin, M. Lipids on the frontier: a century of cell-membrane bilayers. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 414-418, 2003
- Einicker-Lamas, M.; Wenceslau, L.D.; Bernardo, R.R.; Nogaroli, L.; Guilherme, A.; Oliveira, M.M.; Vieyra, A. Sphingosine-1-phosphate formation activates phosphatidylinositol-4 kinase in basolateral membranes from kidney cells: crosstalk in cell signaling through sphingolipids and phospholipids. *J Biochem (Tokyo)* 134: 529-536, 2003

- Ekblad, L.; Jergil, B. Localization of phosphatidylinositol 4-kinase isoenzymes in rat liver plasma membrane domains. *Biochim Biophys Acta* 1531: 209-221, 2001
- Endemann, G.; Dunn, S.N.; Cantley, L.C. Bovine brain contains two types of phosphatidylinositol kinase. *Biochemistry* 26: 6845-6852, 1987
- Fernandis, A.Z.; Subrahmanyam, G. Protein tyrosine phosphorylation activates rat splenic type II phosphatidylinositol 4-kinase in vitro. *FEBS Lett.* 441: 432-436, 1998
- Fernandis, A.Z.; Subrahmanyam, G. Tyrosyl phosphorylation and activation of a type II phosphatidylinositol 4-kinase by p56(lck) in concanavalin A stimulated rat splenic lymphocytes. *Mol Immunol* 37: 273-280, 2000
- Field, K.A.; Holowka, D.; Baird, B. FcεRI-mediated recruitment of p53/56^{lyn} to detergent-resistant membrane domains accompanies cellular signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 9201-9205, 1995
- Fruman, D.A.; Meyers, R.E.; Cantley, L.C. Phosphoinositides kinases. *Annu Rev Biochem* 67: 481-507, 1998
- Fujimoto, T. Calcium pump of the plasma membrane is localized in caveolae. *J Cell Biol* 120: 1147-1157, 1993
- Futerman, A.H.; Hannun, Y.A. The complex life of sphingolipids. *EMBO Rep* 5: 777-782, 2004
- Futerman, A.H.; Riezman, H. The ins and outs of sphingolipids synthesis. *Trends Cell Biol* 15: 312-318, 2005
- Ganong, B.R.; Lu, C.M. Application of nonionic polyoxyethylene detergents in studies of phosphatidylinositol kinase. *Anal Biochem* 179: 66-71, 1989

- Garcia-Marcos, M.; Pochet, S.; Marino, A.; Dehaye, J.P. P2X(7) and phospholipid signalling: The search of the "missing link" in epithelial cells. *Cell Signal* 2006 [Epub ahead of print]
- Gardocki, M.E.; Jani, N.; Lopes, J.M. Phosphatidylinositol biosynthesis: Biochemistry and regulation. *Biochim Biophys Acta* 1735: 89-100, 2005
- Gennero, I.; Fauvel, J.; Nieto, M.; Cariven, C.; Gaits, F.; Briand-Mesange, F.; Chap, H.; Salles, J.P. Apoptotic effect of sphingosine 1-phosphate and increased sphingosine 1-phosphate hydrolysis on mesangial cells cultured at low cell density. *J Biol Chem* 277: 12724-12734, 2002
- Gehrmann, T.; Heilmeyer, L.M. Jr. Phosphatidylinositol 4-kinases. *Eur J Biochem* 253: 357-370, 1998
- Glenney, J.R. Jr.; Zokas, L. Novel tyrosine kinase substrates from Rous sarcoma virus-transformed cells are present in the membrane skeleton. *J Cell Biol* 108: 2401-2408, 1989
- Glenney, J.R. Jr. The sequence of human caveolin reveals identity with VIP21, a component of transport vesicles. *FEBS Lett* 314: 45-48, 1992
- Golub, T.; Pico, C. Spatial control of actin-based motility through plasmalemmal PtdIns(4,5)P₂-rich raft assemblies. *Biochem Soc Symp* 72: 119-127, 2005
- Gromada, J.; Bark, C.; Smidt, K.; Efanov, A.M.; Janson, J.; Mandic, S.A.; Webb, D.L.; Zhang, W.; Meister, B.; Jeromin, A.; Berggren, P.O. Neuronal calcium sensor-1 potentiates glucose-dependent exocytosis in pancreatic beta cells through activation of phosphatidylinositol 4-kinase beta. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 10303-10308, 2005
- Guilherme, A.; Reis-Silva, C.; Moraes-Albuquerque, J.H.; Oliveira, M.M.; Vieyra, A. A novel phosphorylated lipid counteracts activation of the renal plasma membrane

- (Ca²⁺+Mg²⁺)ATPase by endogenous phosphatidylinositol-4-phosphate. *Biosci Rep* 18: 79-89, 1998
- Hannun, Y.A.; Linaud, C.M. Sphingolipid breakdown products: anti-proliferative and tumor-suppressor lipids. *Biochim Biophys Acta* 1154: 223-236, 1993
- Hannun, Y.A.; Loomis, C.R.; Merrill, A.H. Jr.; Bell, R.M. Sphingosine inhibition of protein kinase C activity and of phorbol dibutyrate binding in vitro and in human platelets. *J Biol Chem* 261: 12604-12609, 1986
- Hannun, Y.A.; Luberto, C.; Argraves, K.M. Enzymes of sphingolipids metabolism: From modular to integrative signaling. *Biochemistry* 40: 4893-4903, 2001
- Hannun, Y.A.; Obeid, L.M. The ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation: Stress encounters of the lipid kind. *J Biol Chem* 277: 25847-25850, 2002
- Hashizume, T.; Nakao, M.; Sato, T. Sphingosine enhances phosphatidylinositol 4-kinase activity in rabbit platelets. *J Biochem (Tokyo)* 120: 61-65, 1996
- Hawthorne, J.N. The metabolism of phosphoinositides. In Dawson, R.M.C. & Rhodes, D.N. (ed) *Metabolism and Physiological Significance of Lipids*, London, John Wiley & Sons, 1964
- Hilgemann, D.W. Getting ready for the decade of the lipids. *Annu Rev Physiol* 65: 697-700, 2003
- Hokin, L.E.; Hokin, M.R. Phosphoinositides and protein secretion in pancreas slices. *J Biol Chem* 233: 805-810, 1958
- Hokin, M.R.; Hokin, L.E. Enzyme secretion and the incorporation of ³²P into phospholipides of pancreas slices. *J Biol Chem* 203: 967-977, 1953
- Hope, H.R.; Pike, L.J. Phosphoinositides and phosphoinositide-utilizing enzymes in detergent-insoluble lipid domains. *Mol Biol Cell* 7: 843-851, 1996

- Horowitz, J.; Perlman, R.L. Phospholipid metabolism in PC12 pheochromocytoma cells. *Methods Enzymol* 141: 169-175, 1987
- Huang, C.; Hepler, J.R.; Chen, L.T.; Gilman, A.G.; Anderson, R.G.W.; Mumby, S.M. Organization of G proteins and adenylyl cyclase at the plasma membrane. *Mol Biol Cell* 8: 2365-2378, 1997
- Huang, C.; Handlogten, M.E.; Miller, R.T. Parallel activation of phosphatidylinositol 4-kinase and phospholipase C by the extracellular calcium-sensing receptor. *J Biol Chem* 277: 20293-20300, 2002
- Hsuan, J.J.; Tan, S.H. Growth factor-dependent phosphoinositide signaling. *Int J Biochem Cell Biol* 29: 415-435, 1997
- Igarashi, J.; Michel, T. Agonist-modulated targeting of the EDG-1 receptor to plasmalemmal caveolae: eNOS activation by sphingosine-1-phosphate and the role of caveolin-1 in sphingolipid signal transduction. *J Biol Chem* 275: 32363-32370, 2000
- Isshiki, M.; Anderson, R.G.W. Calcium signal transduction from caveolae. *Cell Calcium* 26: 201-206, 1999
- Iwata, M.; Herrington, J.; Zager, R.A. Sphingosine: a mediator of acute renal tubular injury and subsequent cytoresistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 8970-8974, 1995
- Jacobson, K.; Sheets, E.D.; Simson, R. Revisiting the fluid mosaic model of membranes. *Science* 268: 1441-1442, 1995
- Jang, I-H.; Kim, J.H.; Lee, B.D.; Bae, S.S.; Park, M.H.; Suh, P-G.; Ryu, S.H. Localization of phospholipase C γ 1 signaling in caveolae: importance in EGF-induced phosphoinositide hydrolysis but not in tyrosine phosphorylation. *FEBS Lett* 491: 4-8, 2001

- Jensen, M.Ø.; Mouritsen, O.G. Lipids do influence protein function—the hydrophobic matching hypothesis revisited. *Biochim Biophys Acta* 1666: 205-226, 2004
- Kanaho, Y.; Suzuki, T. Phosphoinositide kinases as enzymes that produce versatile signalling lipids, phosphoinositides. *J Biochem* 131: 503-509, 2002
- Kenworthy, A. Peering inside lipid rafts and caveolae. *Trends Biochem Sci* 27: 435-438, 2002
- Kifor, O.; Diaz, R.; Butters, R.; Kifor, I.; Brown, E.M. The calcium-sensing receptor is localized in caveolin-rich plasma membrane domains of bovine parathyroid cells. *J Biol Chem* 273: 21708-21713, 1998
- King, C.C.; Zenke, F.T.; Dawson, P.E.; Dutil, E.M.; Newton, A.C.; Hemmings, B.A.; Bokoch, G.M. Sphingosine is a novel activator of 3-phosphoinositide-dependent kinase 1. *J Biol Chem* 275: 18108-18113, 2000
- Kobayashi, T.; Takematsu, H.; Yamaji, T.; Hiramoto, S.; Kozutsumi, Y. Disturbance of sphingolipid biosynthesis abrogates the signaling of Mss4, phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, in yeast. *J Biol Chem* 280: 18087-18094, 2005
- Kolesnick, R. The therapeutic potential of modulating the ceramide / sphingomyelin pathway. *J Clin Invest* 110: 3-8, 2002
- Koonen, D.P.Y.; Glatz, J.F.C.; Bonen, A.; Luiken, J.J.F.P. Long-chain fatty acid uptake and FAT/CD36 translocation in heart and skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta* 1736: 163-180, 2005
- Koynova, R.; Caffrey, M. Phases and phase transitions of the sphingolipids. *Biochim Biophys Acta* 1255: 213-236, 1995
- Kurzchalia, T.V.; Parton, R.G. Membrane microdomains and caveolae. *Curr Opin Cell Biol* 11: 424-431, 1999

- Kurzchalia, T.; Dupree, P.; Parton, R.G.; Kellner, R.; Virta, H.; Lehnert, M.; Simnos, K. VIP 21, a 21-kD membrane protein is an integral component of trans-Golgi-network-derived transport vesicles. *J Cell Biol* 118: 1003-1014, 1992
- Lang, J. PIPs and pools in insulin secretion. *Trends Endocrinol Metab* 14: 297-299, 2003
- Lee, A.G. How lipids interact with an intrinsic membrane protein: the case of the calcium pump. *Biochim Biophys Acta* 1376: 381-390, 1998
- Lehotsky, J.; Raeymaekers, L.; Missaen, L.; Wuytack, F.; De Smedt, H.; Casteels, R. Stimulation of the catalytic cycle of the Ca²⁺ pump of porcine plasma-membrane by negatively charged phospholipids. *Biochim Biophys Acta* 1105: 118-124, 1992
- Liao, J.; Tao, J.; Lin, G.; Liu, D. Chemistry and biology of sphingolipids. *Tetrahedron* 61: 4715-4733, 2005
- Lichtenberg, D.; Goni, F.M.; Heerklotz, H. Detergent-resistant membranes should not be identified with membrane rafts. *Trends Biochem Sci* 30: 430-436, 2005
- Liu, Y. Casey, L.; Pike, L.J. Compartmentalization of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in low-density membrane domains in the absence of caveolin. *Biochem Biophys Res Commun* 245: 684-690, 1998
- Liu, P.; Rudick, M.; Anderson, R.G.W. Multiple roles of caveolin-1. *J Biol Chem* 277: 41295-41298, 2002
- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275, 1951
- Ma, Y.; Pitson, S.; Hercus, T.; Murphy, J.; Lopez, A.; Woodcock, J. Sphingosine activates protein kinase A type II by a novel cAMP-independent mechanism. *J Biol Chem* 280: 26011-26017, 2005

- Macdonald, J.L.; Pike, L.J. A simplified method for the preparation of detergent-free lipid rafts. *J Lipid Res* 46: 1061-1067, 2005
- Malnic, G. Homeostase, regulação e controle em fisiologia. In Aires, M.M. (ed) Fisiologia. 2^a ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1999.
- Mandala, S.M.; Thornton, R.; Galve-Roperh, I.; Poulton, S.; Peterson, C.; Oliveira, A.; Bergstrom, J.; Kurtz, M.B.; Spiegel, S. Molecular cloning and characterization of a lipid phosphohydrolase that degrades sphingosine-1-phosphate and induces cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 7859-7864, 2000
- Maxfield, F.R. Plasma membrane microdomains. *Curr Opin Cell Biol* 14: 483-487, 2002
- Mayor, S.; Rao, M. Rafts: scale-dependent, active lipid organization at the cell surface. *Traffic* 5: 231-40, 2004
- McDonald, O.B.; Hannun, Y.A.; Reynold, C.H.; Sahyoun, N. Activation of casein kinase II by sphingosine. *J Biol Chem* 266: 21773-21776, 1991
- Megidish, T.; Hamaguchi, A.; Iwabuchi, K.; Hakomori, S. Assays of sphingosine-dependent kinase for 14-3-3 protein. *Methods Enzymol* 312: 381-387, 2000
- Menaldino, D.S.; Bushnev, A.; Sun, A.; Liotta, D.C.; Symolon, H.; Desai, K.; Dillehay, D.L.; Peng, Q.; Wang, E.; Allegood, J.; Trotman-Pruett, S.; Sullards, M.C.; Merrill, A.H., Jr. Sphingoid base and *de novo* ceramide synthesis: Enzyme involved, pharmacology and mechanisms of action. *Pharmacol Res* 47: 373-381, 2003
- Minogue, S.; Anderson, J.S.; Waugh, M.G.; Santos, M.; Corless, S.; Cramer, R.; Hsuan, J.J. Cloning of a human type II phosphatidylinositol 4-kinase reveals a novel lipid kinase family. *J Biol Chem* 276: 16635-16640, 2001
- Missiaen, L.; Raeymaekers, L.; Droogmans, G.; Wuytack, F.; Casteels, R. Phospholipid-protein interactions of the plasma-membrane Ca²⁺-transporting

- ATPase. Evidence for a tissue-dependent functional difference. *Biochem J* 263: 687-694, 1989
- Monick, M.M.; Mallampalli, R.K.; Bradford, M. McCoy, D.; Gross, T.J.; Flaherty, D.M.; Powers, L.S.; Cameron, K.; Kelly, S.; Merrill, A.H. Jr.; Hunninghake, G.W. Cooperative prosurvival activity by ERK and Akt in human alveolar macrophages is dependent on high levels of acid ceramidase activity. *J Immunol* 173: 123-135, 2004
- Naveen, B.; Shankar, B.S.; Subrahmanyam, G. Fc ϵ RI cross-linking activates a type II phosphatidylinositol 4-kinase in RBL 2H3 cells. *Mol Immunol* 42: 1541-1549, 2005
- Newton, A.C. Regulation of the ABC kinase by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm. *Biochem J* 370: 361-371, 2003
- Nishizuka, Y. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 258: 607-614, 1992
- Nikawa, J.; Yamashita, S. Phosphatidylinositol synthase from yeast. *Biochim Biophys Acta* 1348: 173-178, 1997
- Nogaroli, L.; Silva, O.F.; Bonilha, T.A.; Moreno, P.A.; Bernardo, R.R.; Vieyra, A.; Einicker-Lamas, M. Diacylglycerol kinase activity in purified basolateral membranes of kidney tubules. I. Evidence for coupling with phospholipase C. *Int J Biochem Cell Biol* 37: 79-90, 2005
- Nozawa, Y. A thematic series on lipid signalling: Prologue. *J Biochem* 131: 283-284, 2002
- Odorizzi, G.; Babst, M.; Emr, S.D. Phosphoinositide signalling and the regulation of membrane trafficking in yeast. *Trends Biochem Sci* 25: 229-235, 2000

- Ostrom, R.S. New determinants of receptor-effector coupling: trafficking and compartmentalization in membrane microdomains. *Mol Pharmacol* 61:473-476, 2002
- Overduin, M.; Cheever, M.L.; Kutateladze, T.G. Signalling with phosphoinositides: Better than binary. *Mol Interv* 1: 150-159, 2001
- Parker, P.J. The ubiquitous phosphoinositides. *Biochem Soc Trans* 32: 893-898, 2004
- Payraastre, B.; Missy, K.; Giuriato, S.; Bodin, S.; Plantavid, M.; Gratacap, M-P. Phosphoinositides: Key players in cell signalling, in time and space. *Cell Signal* 13: 377-387, 2001
- Pendaries, C.; Tronchère, H.; Plantavid, M.; Payraastre, B. Phosphoinositide signalling disorders in human diseases. *FEBS Lett* 546: 25-31, 2003
- Peres, C.; Yart, A.; Perret, B.; Salles, J-P.; Raynal, P. Modulation of phosphoinositide 3-kinase activation by cholesterol level suggest a novel positive role for lipid rafts in lysophospholipid acid signaling. *FEBS Lett* 534: 164-168, 2003
- Pike, L.J.; Casey, L. Localization and turnover of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in caveolin-enriched membrane domains. *J Biol Chem* 271: 26453-26456, 1996
- Pike, L.J.; Miller, J.M. Cholesterol depletion delocalizes phosphatidylinositol bisphosphate and inhibits hormone-stimulated phosphatidylinositol turnover. *J Biol Chem* 273:22298-22304, 1998
- Porter, F.D.; Li, Y-S.; Deuel, T.F. Purification and characterization of a phosphatidylinositol 4-kinase from bovine uteri. *J Biol Chem* 263: 8989-8995, 1988

- Procópio-Araújo, J. Difusão e fluxo na membrana. In In Aires, M.M. (ed) *Fisiologia*. 2^a ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1999.
- Rangel, L.B.; Lopes, A.G.; Lara, L.S.; Carvalho, T.L.; Silva, I.V.; Oliveira, M.M.; Einicker-Lamas, M.; Vieyra, A.; Nogaroli, L.; Caruso-Neves. C. PI-PLCbeta is involved in the modulation of the proximal tubule Na⁺-ATPase by angiotensin II. *Regul Pept* 127: 177-182, 2005
- Razani, B.; Woodman, S.E.; Lisanti, M.P. Caveolae: from cell biology to animal physiology. *Pharmacol Rev* 54: 431-467, 2002
- Riboni, L.; Viani, P.; Bassi, R.; Prinetti, A.; Tettamanti, G. The role of sphingolipids in the process of signal transduction. *Prog Lipid Res* 36: 153-195, 1997
- Rossiter, R.J. Metabolism of phosphatides. In Greenberg, D.M (ed) *Metabolic Pathway vol III: Lipids, Steroids and Carotenoids*. 3 ed, New York, Academic Press, 1968
- Rothberg, K.G.; Heuser, J.E.; Donzell, W.C.; Ying, Y.S.; Glenney, J.R.; Anderson, R.G. Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* 68: 673-682, 1992
- Sabourin, T.; Bastien, L.; Bachvarov, D.R.; Marceau, F. Agonist-induced translocation of the kinin B(1) receptor to caveolae-related rafts. *Mol Pharmacol* 61: 546-553, 2002
- Saiardi, A.; Bhandari, R.; Resnick, A.C.; Snowman, A.M.; Snyder, S.H. Phosphorylation of proteins by inositol pyrophosphates. *Science* 306: 2101-2105, 2004
- Scalera, V.; Storelli, C.; Storelli-Joss, C.; Haase, W.; Murer, H. A simple and fast method for the isolation of basolateral plasma membranes from rat small-intestinal epithelial cells. *Biochem J* 186: 177-181, 1980

- Schnitzer, J.E.; Oh, P.; Jacobson, B.S.; Dvorak, A.M. caveolae from luminal plasmalemma of rat lung endothelium: microdomains enriched in caveolin, Ca(2+)-ATPase, and inositol triphosphate receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 1759-1763, 1995
- Shaul, P.W.; Anderson, R.G. Role of plasmalemmal caveolae in signal transduction. *Am J Physiol* 275: L843-851, 1998
- Shin H-W.; Nakayama, K. Dual control of membrane targeting by PtdIns(4)*P* and ARF. *Trends Biochem Sci* 29: 513-515, 2004
- Shogomori, H.; Brown, D.A. Use of detergents to study membrane rafts: the good, the bad, and the ugly. *Biol Chem* 384: 1259-1263, 2003
- Simons, K.; Ikonen, E. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387: 569-572, 1997
- Singer, S.J.; Nicolson, G.L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175: 720-731, 1972
- Smart, E.J.; Ying, Y-S.; Mineo, C.; Anderson, R.G.W. A detergent-free method for purifying caveolae membrane from tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 10104-10108, 1995
- Smith, E.R.; Merrill, A.H.; Obeid, L.M.; Hannun, Y.A. Effects of sphingosine and other sphingolipids on protein kinase C. *Methods Enzymol* 312: 361-373, 2000
- Smith, W.L; Merrill, A.H., Jr. Sphingolipid metabolism and signaling minireview series. *J Biol Chem* 277: 25841-25842, 2002
- Song, K.S.; LI, S.; Okamoto, T.; Quilliam, L.A.; Sargiacomo, M.; Lisanti, M.P. Co-purification and direct interaction of Ras with caveolin, an integral membrane protein of caveolae microdomains. Detergent-free purification of caveolae microdomains. *J Biol Chem* 271: 9690-9697, 1996

- Sorenson, M.M.; Coelho, H.S.; Reuben, J.P. Caffeine inhibition of calcium accumulation by the sarcoplasmic reticulum in mammalian skinned fibers . *J Membr Biol* 90: 219-230, 1986
- Spiegel, S.; Merrill, AH Jr. Sphingolipid metabolism and cell growth regulation. *FASEB J* 10: 1388-1397, 1996
- Stahlhut, M.; van Deurs, B. Identification of filamin as a novel ligand for caveolin-1: evidence for the organization of caveolin-1-associated membrane domains by the actin cytoskeleton. *Mol Biol Cell* 11: 325-337, 2000
- Starling, A.P.; East, J.M.; Lee, A.G. Phosphatidylinositol 4-phosphate increases the rate of dephosphorylation of the phosphorylated Ca²⁺-ATPase. *J Biol Chem* 270: 14467-14470, 1995
- Sun, T-T. Excessive trust in authorities and its influence on experimental design. *Nature Reviews Mol Cell Biol* 5; 577-581, 2004
- Tachibana, T.; Nawa, T. Ultrastructural localization of Ca(++)-ATPase in Meissner's corpuscle of the Mongolian gerbil. *Arch Histol Cytol* 55: 375-379, 1992
- Takenawa, T.; Itoh, T. Phosphoinositides, key molecules for regulation of actin cytoskeletal organization and membrane traffic from the plasma membrane. *Biochim Biophys Acta* 1533: 190-206, 2001
- Tolan, D.; Conway, A-M.; Steele, L.; Pyne, S.; Pyne, N.J. The identification of DL-*threo* dihydrosphingosine and sphingosine as novel inhibitors of extracellular signal-regulated kinase signaling in airway smooth muscle. *Brit J Pharmacol* 119: 185-186, 1996
- Tortelote, G.G.; Valverde, R.H.F.; Lemos, T.; Guilherme, A.; Einicker-Lamas, M.; Vieyra, A. The plasma membrane Ca²⁺ pump from proximal kidney tubules is exclusively localized and active in caveolae. *FEBS Lett* 576: 31-35, 2004

- Tou, J-S.; Huggins, C.G. Kidney. In Snyder, F. (ed) Lipid metabolism in mammals-2. Plenum Press, New York, 1977
- Valverde, R.H.; Tortelote, G.G.; Lemos, T.; Mintz, E.; Vieyra A. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II is an essential mediator in the coordinated regulation of electrocyte Ca²⁺-ATPase by calmodulin and protein kinase A. *J Biol Chem* 280: 30611-30618, 2005
- van der Brink-van der Laan, E.; Killian, J.A.; de Kruijff, B. Nonbilayer lipids affect peripheral and integral membrane proteins via changes in the lateral pressure profile. *Biochim Biophys Acta* 1666: 275-288, 2004
- van Deurs, B.; Roepstorff, K.; Hommelgaard, A.M.; Sandvig, K. Caveolae: anchored, multifunctional platforms in the lipid ocean. *Trends Cell Biol* 13: 92-100, 2003
- van Meer, G.; Lisman, Q. Sphingolipids transport: Rafts and translocators. *J Biol Chem* 277: 25855-25858, 2002
- van Rheenen, J.; Achame, E.M.; Janssen, H.; Calafat, J.; Jalink, K. PIP₂ signaling in lipid domains: a critical re-evaluation. *EMBO J* 24: 1664-1673, 2005
- Vance, J.E.; Vance, D.E. Metabolic insights into phospholipid function using gene-targeted mice. *J Biol Chem* 280: 10877-10880, 2005
- Waugh, M.G.; Lawson, D.; Tan, S.K.; Hsuan, J.J. Phosphatidylinositol 4-phosphate synthesis in immunisolated caveolae-like vesicles and low buoyant density non-caveolar membranes. *J Biol Chem* 273: 17115-17121, 1998
- Waugh, M.G.; Minogue, S.; Anderson, J.S.; dos Santos, M.; Hsuan, J.J. Signalling and non-caveolar rafts. *Biochem Soc Trans* 29: 509-512, 2001
- Wetzker, R.; Klinger, R.; Hsuan, J.; Fry, M.J.; Kauffmann-Zeh, A.; Müller, E.; Frunder, H.; Waterfield, M. Purification and characterization of phosphatidylinositol 4-kinase from human erythrocyte membranes. *Eur J Biochem* 200: 179-185, 1991

Whittembury, G.; Proverbio, F. Two modes of Na extrusion in cells from guinea pig kidney cortex slices. *Pflugers Arch* 316: 1-25, 1970

Yamada, E. The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse. *J Biophys Biochem Cytol* 1: 445-458, 1955

ANEXO 1.

THE PLASMA MEMBRANE Ca^{2+} PUMP FROM PROXIMAL KIDNEY TUBULES IS
EXCLUSIVELY LOCALIZED AND ACTIVE IN CAVEOLAE

LEITURA SUPLEMENTAR – ARTIGO RESULTANTE DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
DE GIOVANE GOMES TORTELOTE

ANEXO 2.

SPHINGOSINE MODULATION OF A PHOSPHATIDYLINOSITOL-4 KINASE COUPLED TO
A DIACYLGLYCEROL KINASE IN KIDNEY BASOLATERAL PLASMA MEMBRANES

ARTIGO SUBMETIDO AO *BIOCHIMICA BIOPHYSICA ACTA MOLECULAR AND CELL
BIOLOGY OF LIPIDS*, EM 10 DE ABRIL DE 2006

The plasma membrane Ca^{2+} pump from proximal kidney tubules is exclusively localized and active in caveolae

Giovane G. Tortelote^a, Rafael H.F. Valverde^a, Thiago Lemos^a, Adílson Guilherme^b,
Marcelo Einicker-Lamas^a, Adalberto Vieyra^{a,*}

^aLaboratório de Físico-Química Biológica Aída Hassón-Voloch, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21949-900 Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, Brazil

^bProgram in Molecular Medicine, University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA 01605, USA

Received 5 July 2004; revised 19 August 2004; accepted 25 August 2004

Available online 11 September 2004

Edited by Lukas Huber

Abstract Plasma membrane Ca^{2+} -ATPase is involved in the fine-tuned regulation of intracellular Ca^{2+} . In this study, the presence of Ca^{2+} -ATPase in caveolae from kidney basolateral membranes was investigated. With the use of a discontinuous sucrose gradient, we show that Ca^{2+} -ATPase is exclusively located and fully active in caveolin-containing microdomains. Treatment with methyl- β -cyclodextrin – a cholesterol chelator – leads to a spreading of both caveolin and completely inactive Ca^{2+} -ATPase toward high-density fractions. These data support the view that Ca^{2+} fluxes mediated by Ca^{2+} -ATPase in kidney epithelial cells occur only in caveolae, being strictly dependent on the integrity of these microdomains.

© 2004 Published by Elsevier B.V. on behalf of the Federation of European Biochemical Societies.

Keywords: Caveolae; Ca^{2+} -ATPase; Kidney; Basolateral membranes; Ca^{2+} homeostasis; Calmodulin

1. Introduction

The main parts of the regulatory system involved in cell calcium homeostasis are the different sets of transport that are present either in the membranes of internal stores as sarco(endo)plasmic reticulum, which is driven through different sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPases [1], or in the plasma membrane, where it is driven through the Na^{+} - Ca^{2+} exchanger and the plasma membrane Ca^{2+} -ATPase [2–7]. Since it was first reported by Yamada [8], rapid growth in caveolae research has brought major advances in understanding its structure, as well as the development of methods for purifying and characterizing its composition. These studies were carried out in many different cell types, where these plasma membrane microdomains were detected [9–11]. However, there are some reports that argue whether caveolae are really involved in the functions attributed to them (for example see [12]).

Quantitative analyses by immunofluorescence and immunocytochemistry of endothelial cells, smooth muscle cells, car-

diac muscle cells, epidermal keratinocytes, mesothelial cells and capillary endothelial cells have shown that Ca^{2+} -ATPase was found to be concentrated 18–25-fold in the caveolar membrane compared with the non-caveolar portion of the plasma membrane [13,14]. However, there are no biochemical data reporting the activity of Ca^{2+} -ATPase in its caveolar localization. The caveolar localization of the Ca^{2+} pump appears to be crucial for kidney function, even though the first studies on caveolae have demonstrated that these microdomains are not abundant in kidney tubules [13]. It was shown that the knock out of the caveolin-1 gene promotes the progressive steps required for urinary calcium lithiasis [15]. Moreover, it was observed that the dysfunction of caveolin- and cholesterol-rich microdomains is directly correlated and potentially involved in the induction and maintenance phases of ischaemic and toxic forms of experimental renal failure [16], emphasizing the great importance of these specialized plasma membrane microdomains in renal physiology and pathology. These observations led us to investigate whether the Ca^{2+} -ATPase resident in the basolateral membranes (BLM) of proximal tubule cells is active in its caveolar localization and also to compare the Ca^{2+} -ATPase activity from caveolar and non-caveolar fractions in the above kidney segment. In this tubule segment more than 70% of the glomerular filtrate is recovered for the body liquid compartments, and reabsorption of fluid appears to be highly sensitive to the cytosolic Ca^{2+} fluctuations [17] which are controlled in part by the BLM Ca^{2+} pump [18].

2. Materials and methods

2.1. Materials

All the reagents used for isolation of the membranes, sucrose gradient, Ca^{2+} -ATPase activity and protein determination as well as bovine brain calmodulin, were from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). The reagents used for SDS-PAGE and Western blotting (ECLTM and HyperfilmTM) were from Amersham (Buckinghamshire, UK). The monoclonal antibody anti-PMCA (5F10) and the polyclonal antibody anti-caveolin-1 (anti-cav-1) were from Affinity BioReagents (Golden, CO) and Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA), respectively.

2.2. Isolation of BLM

BLMs from pig kidney proximal tubule cells were isolated and purified using the Percoll gradient method [19] and stored in 250 mM sucrose under liquid N_2 at a final protein concentration of 30–35 mg/ml. Under these conditions, Ca^{2+} -ATPase activity is preserved for at

* Corresponding author. Fax: +55-21-2280-8193.
E-mail address: avieyra@biof.ufrj.br (A. Vieyra).

Abbreviations: BLM, basolateral membranes; M β CD, methyl- β -cyclodextrin; Polidocanol, polyoxyethylene 9 lauryl ether

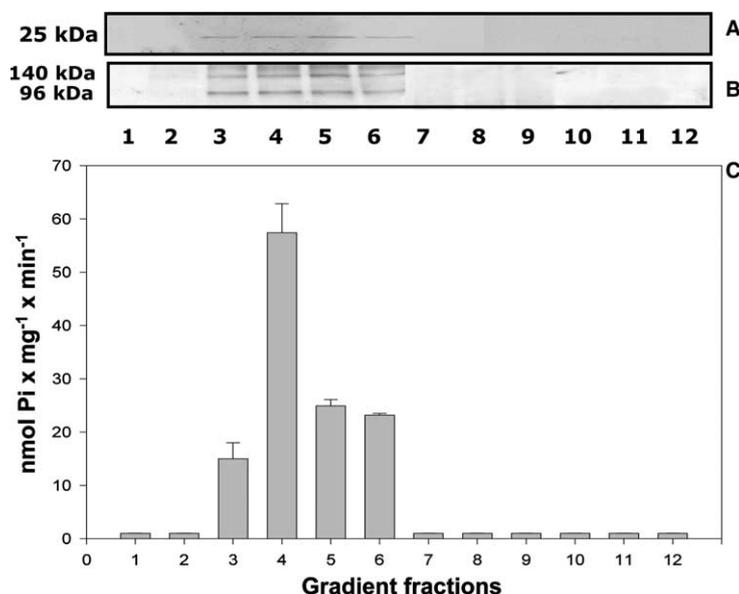


Fig. 1. Association between caveolin and full active Ca²⁺-ATPase activity in plasma membranes from kidney tubule cells. Representative Western blot of caveolin (25 kDa) polyclonal antibody anti-cav-1 (1:1000) in membrane fractions separated in a polidocanol-containing discontinuous sucrose gradient after centrifugation for 16 h [repeated five times with different preparations] (A). Representative Western blot of Ca²⁺-ATPase using monoclonal antibody anti-PMCA, 5F10 clone (1:1000), in the same gradient (B). Ca²⁺-ATPase activity in the fractions indicated on the abscissa (C). The Ca²⁺-ATPase activity control value from different BLM preparations, incubated at 4 °C without centrifugation for 16 h, was 10 ± 2 nmol P_i × mg⁻¹ × min⁻¹ (*n* = 5).

least 3 months. This preparation contains 30–40% of unsealed membrane fragments [19]. Protein determination was carried out by the Folin-phenol method [20], using bovine albumin as standard. The specific activity of the BLM marker (Na⁺-K⁺)ATPase was ~15-fold enriched when compared to the initial kidney cortex-corticis homogenate. Different preparations selected at random showed that residual contamination with subcellular membrane markers was minimal [21].

2.3. Caveolae fractionation

BLM-enriched fractions obtained as described above were treated with polidocanol (1%, v/v). This material was sonicated three times (10 s each) and then fractionated in a discontinuous sucrose gradient (5–45%), as previously described [22]. The 12 top to bottom fractions obtained (1 ml each) were used for Western blotting assays and determination of Ca²⁺-ATPase activity.

2.4. Ca²⁺-ATPase activity determination

Ca²⁺-ATPase activity was measured using the colorimetric method described by Taussky and Shorr [23]. The native BLM fraction or the different sucrose gradient fractions were incubated in the following reaction medium (1 ml): 50 mM bis-Tris propane-HCl (pH 7.4), 10 mM NaN₃, 1 mM ouabain, 120 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.2 mM EGTA and 0.27 mM CaCl₂ (20 μM free Ca²⁺). The reaction was started by adding 5 mM ATP to the reaction medium. After 20 min at 37 °C the reaction was stopped with two volumes of a cold activated charcoal suspension in 0.1 N HCl. An aliquot of the supernatant obtained after centrifugation (600 × *g*, 40 min) was used for the colorimetric assay. Spontaneous P_i release was measured in tubes run in parallel in which the membranes were added after the charcoal. The Ca²⁺-ATPase activity was measured by the difference of the ATP hydrolysis in the presence and absence (0.2 mM EGTA) of CaCl₂. Free Ca²⁺ concentration was calculated using a computer program that took into account the different species involved in the equilibrium between EGTA, Ca²⁺, ATP, Mg²⁺, H⁺ and K⁺, and the influence of ionic strength on the association constant for the Ca-EGTA complex [24,25].

2.5. Preparation of calmodulin-depleted membranes

Calmodulin-depleted BLM were obtained after incubation of the membranes in mild alkaline (pH 7.8) hypotonic (10 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA) buffer according to Niggli et al. [26] with slight modifications [27].

2.6. Preparation of cholesterol-cyclodextrin inclusion complex

The inclusion complex of cholesterol and MβCD was prepared according to Klein et al. [28] with slight modifications. Briefly a solution of MβCD in water (0.2 M) was supplied with cholesterol under continuous stirring at room temperature. When the dextrin was fully loaded with cholesterol (cholesterol-MβCD molar ratio 1.8:1), an aliquot of the clear solution containing the complex was added to the Ca²⁺-ATPase assay to give a final concentration of 75 μg/ml.

2.7. Electrophoresis and Western blotting

After sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (15% acrylamide) of the BLM [29], proteins were transferred to a nitrocellulose membrane and incubated with the desired antibodies (see legend to the figures for the dilutions). After four washes in TBS-T (5 min each), the membranes were incubated for 1 h at room temperature with an anti-rabbit peroxidase conjugate antibody (dilution 1:5000 in TBS-T solution). The membranes were washed again as described above, and the bands were visualized using the ECL system kit.

3. Results and discussion

3.1. Localization of the Ca²⁺ pump from BLM in caveolin-rich fractions

With the use of a polyclonal antibody against caveolin-1, we detected a clear signal of abundant caveolin – and therefore caveolae – in BLM derived from kidney proximal tubule cells. Fig. 1A shows that caveolin is only found in the low density, cholesterol-rich fractions of the sucrose gradient (fractions 3–6) [9,30]. These fractions are the same as those in which Ca²⁺-ATPase was detected by the monoclonal antibody anti-plasma membrane Ca²⁺-ATPase (5f10), as shown in Fig. 1B (fractions 3–6). In addition, the Ca²⁺-ATPase activity is found exclusively in the same fractions in which caveolin-1 and plasma membrane Ca²⁺-ATPase are detected by the corresponding antibodies (Fig. 1C). These data clearly show that Ca²⁺-ATPase is compartmentalized and functional only in caveolae.

3.2. Caveolae disruption inactivates plasma membrane

Ca^{2+} -ATPase

To clarify whether Ca^{2+} -ATPase really depends on the integrity of caveolae to work, we carried out experiments where the BLMs were pre-incubated, prior to fractionation in the sucrose gradient, with M β CD, a well-known caveolae disrupter due to its action in sequestering cholesterol. Many studies have shown that cholesterol is a molecule critically involved in caveolae stability and function [11,31,32] since this membrane microdomain is highly sensitive to cholesterol depletion [22,31]. Fig. 2A clearly shows that pre-treatment of the BLM with M β CD promotes disruption of caveolae as judged by the spread of caveolin detection along the entire gradient, with a marked increase in the high-density regions (fractions 10–12). It has been shown that after cholesterol depletion by M β CD, the caveolin-containing complexes lose their low-density property [31,33]. Therefore, it is expected that, in the presence of M β CD, complexes of caveolin with cytoskeleton proteins should also be present in the high-density regions of the gradient [33] as shown in Fig. 2A. Plasma membrane Ca^{2+} -ATPase was also distributed along the entire gradient as revealed by its broader detection in the Western blotting (Fig. 2B). When these fractions were assayed for Ca^{2+} -ATPase activity, we were not able to detect any functional pool of Ca^{2+} -ATPase (main panel in Fig. 2C), thus suggesting that the caveolae microenvironment is strictly necessary for Ca^{2+} -ATPase function in the BLMs of kidney cells. Cholesterol depletion by M β CD also critically impairs Ca^{2+} -ATPase activity when native membrane preparations are used, instead of the solubilized preparation employed in

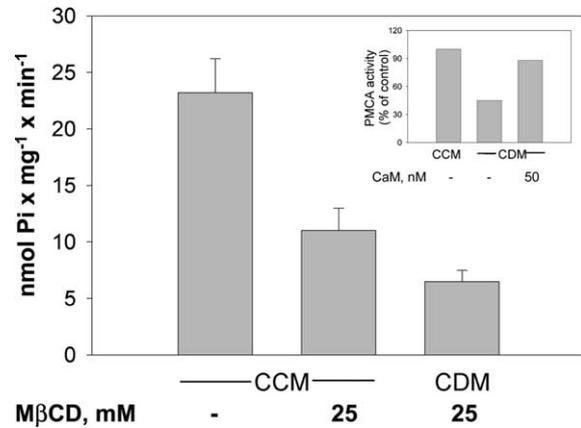


Fig. 3. Influence of M β CD on Ca^{2+} -ATPase from calmodulin-depleted membranes. *Main panel*: Ca^{2+} -ATPase activity was measured in the conditions shown on the abscissa. CCM: calmodulin-containing membranes; AHT: alkaline hypotonic treatment (see Section 2). *Inset*: Ca^{2+} -ATPase activity measured in calmodulin-containing membranes (CCM), in calmodulin-depleted membranes (CDM), and in membranes first depleted from their endogenous calmodulin by alkaline hypotonic treatment and then supplied with 50 nM bovine brain calmodulin.

the gradient shown in the main panel of Fig. 2C. The inset to Fig. 2C shows the concentration-dependent inhibition by M β CD of the Ca^{2+} -ATPase activity of intact BLM. It is of interest to mention that the $(Na^{+} + K^{+})$ ATPase of these membranes is also abolished by 50 mM M β CD (data not shown).

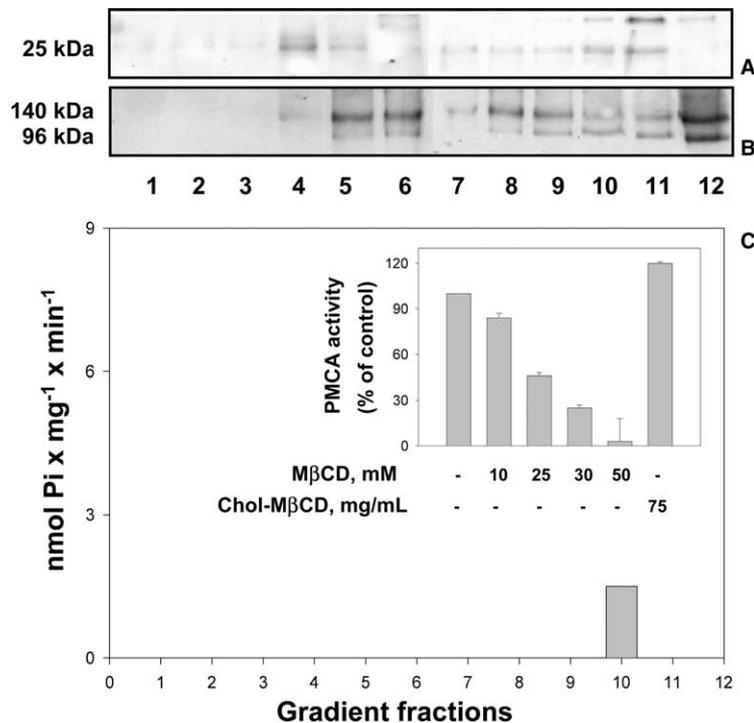


Fig. 2. Correlation between disruption of caveolae and inactivation of Ca^{2+} -ATPase. Representative Western blot of caveolin in membrane fractions treated with 50 mM M β CD (A). Western blot of fractions using antibody against Ca^{2+} -ATPase. The specific dilutions of the anti-cav-1 and 5F10 antibodies were as in legend to Fig. 1(B). Ca^{2+} -ATPase activity in membranes treated with M β CD (C); *main panel*, fractions of polidocanol-containing sucrose gradient (with 50 mM M β CD); *inset*, native membranes assayed for Ca^{2+} -ATPase activity in the presence of different M β CD concentrations or 75 mg/ml of cholesterol-M β CD complex (1.8:1 molar ratio), as shown on the abscissa. Results are presented as means \pm SEM of five different experiments carried out in triplicate.

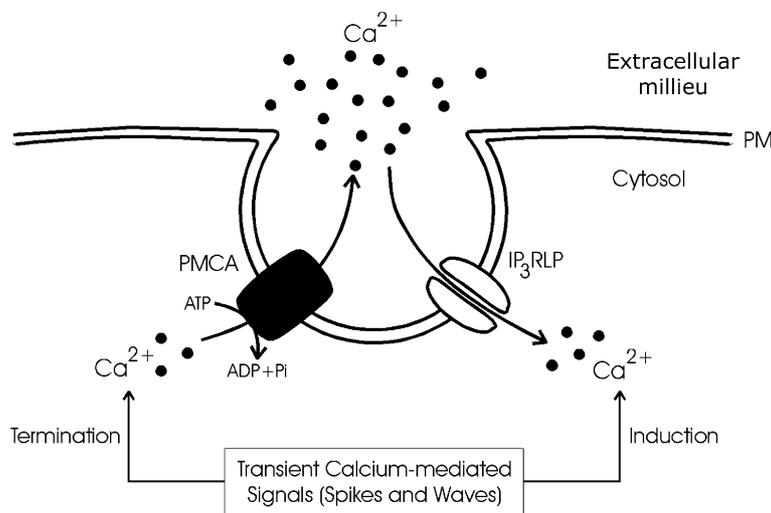


Fig. 4. Model for the fine-tuned regulation of cellular Ca^{2+} mediated by caveolar Ca^{2+} -ATPase after Ca^{2+} entry through the IP_3 receptor-like protein ($\text{IP}_3\text{R/RLP}$) (see also [43]). The pathways for passive Ca^{2+} entry and active Ca^{2+} efflux localized in close vicinity in caveolar microdomains would warrant the fine-tuned control of the intensity and duration of Ca^{2+} spikes and Ca^{2+} waves [43].

When an inclusion complex of cholesterol with $\text{M}\beta\text{CD}$ [28,34] instead of free $\text{M}\beta\text{CD}$ was used, there is no inhibition of Ca^{2+} -ATPase activity. This indicates that cholesterol extraction from the membranes – and not other non-specific effects – leads to loss of Ca^{2+} -ATPase activity, as is also the case for membrane receptors [28] and molecular signaling turnover [34]. However, when cholesterol was first removed by $\text{M}\beta\text{CD}$ and caveolae were disrupted (Fig. 2A), incubation with the inclusion complex – which is believed to be a cholesterol donor [22,35] – is not enough to restore Ca^{2+} -ATPase activity. Thus, we propose that cholesterol has two effects on renal Ca^{2+} -ATPase. One would be to preserve the caveolar integrity needed for the stabilization and full activity of the pump. The second effect of cholesterol would be to contribute to the organization of an appropriate lipidic environment around the renal Ca^{2+} -ATPase molecules as it is the case for the $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$. Cholesterol stimulates the activity of the Na^+ pump in reconstituted systems [36,37] and this effect is not solely due to an increase in the hydrophobic thickness. Rather, specific interactions between $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ molecules leading to oligomerization and activation of the pump could be favored by cholesterol [37]. This could be also true for PMCA, which is also activated by oligomerization [38]. It should be mentioned that the basal Mg^{2+} -stimulated, Ca^{2+} -independent ATPase activity (2 mM EGTA) remains unchanged after $\text{M}\beta\text{CD}$ treatment, indicating that disruption of caveolae by cholesterol removal specifically affects the Ca^{2+} pump.

3.3. Calmodulin depletion increases sensitivity to caveolar disruption

Ca^{2+} -ATPase is the only ion pump stimulated directly by calmodulin [2–7,26]. Thus, the next experiment addressed the question of whether calmodulin modifies inhibition of the pump by $\text{M}\beta\text{CD}$. Fig. 3 shows that inhibition is more pronounced when the membranes are depleted from their endogenous calmodulin by alkaline hypotonic treatment. This is an evidence that long-range intramolecular modifications of the domains embedded in the membrane moiety – which are induced by calmodulin binding at its cytosolic sites [6] –

decrease the sensitivity of the pump toward cholesterol removal and caveolar disarrangements.

3.4. Conclusions

As pointed out above, Ca^{2+} -ATPase is the molecular machine involved in the fine-tuned regulation of cytosolic Ca^{2+} activity. Its caveolar localization could facilitate its interaction with modulators [39–41] and, especially, its cross-talk with the main channel structure associated with Ca^{2+} entry, the IP_3 receptor-like protein ($\text{IP}_3\text{R/RLP}$) [42,43]. Fig. 4 illustrates our proposal of a cross-talk between neighboring $\text{IP}_3\text{R/RLP}$ and Ca^{2+} -ATPase, playing respective key roles in the induction and termination of Ca^{2+} signals in the cells. The high affinity of caveolin for cholesterol [44] would be responsible for caveolar oligomerization and stabilization, as well as for the proper packaging of Ca^{2+} -ATPase and $\text{IP}_3\text{R/RLP}$ in the caveolar environment. Thus, the data presented here are in line with the view that alterations in cholesterol localization and caveolin expression in specific membrane microdomains, impair Ca^{2+} pumping activity and disrupt intracellular Ca^{2+} homeostasis and signaling. The Ca^{2+} -elicited events turned on by caveolar dysfunction might sustain activation of a myriad of cellular cascades and trigger several uncontrolled pathological processes [11,15,16,45].

Acknowledgements: We thank Dr. Susana de Souza-Barros for critical reading of the manuscript. This work was supported by grants from CNPq, FAPERJ, PRONEX and PROFIX [Brazil]. G.G.T. is a recipient of a fellowship from CAPES (Brazil).

References

- [1] MacLennan, D.H., Rice, W.J. and Green, N.M. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 28815–28818.
- [2] Guerini, D. (1998) *Cell Tissue Res.* 292, 191–197.
- [3] Penniston, J.T. and Enyedi, A. (1998) *J. Membr. Biol.* 165, 101–109.
- [4] Shull, G.E. (2000) *Eur. J. Biochem.* 267, 5284–5290.
- [5] Zylinska, L. and Soszynski, M. (2000) *Acta Biochim. Pol.* 47, 529–539.
- [6] Carafoli, E. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 1115–1122.

- [7] Strehler, E.E. and Zacharias, D.A. (2001) *Physiol. Rev.* 81, 21–50.
- [8] Yamada, E. (1955) *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 1, 445–458.
- [9] Anderson, R.G.W. (1998) *Annu. Rev. Biochem.* 67, 199–225.
- [10] Okamoto, T., Schlegel, O., Scherer, P.E. and Lisanti, M.P. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 5419–5422.
- [11] Razani, B., Woodman, S.E. and Lisanti, M.P. (2002) *Pharmacol. Rev.* 54, 431–467.
- [12] Marx, J. (2001) *Science* 294, 1862–1865.
- [13] Fujimoto, T. (1993) *J. Cell Biol.* 120, 1147–1157.
- [14] Schnitzer, J.E., Oh, P., Jacobson, B.S. and Dvorak, A.M. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 1759–1763.
- [15] Cao, G., Yang, G., Timme, T.L., Saika, T., Truong, L.D., Satch, T., Goltsov, A., Park, S.H., Men, T., Kusaka, N., Tian, W., Ren, C., Wang, H., Kadmon, D., Cai, W.W., Chinault, A.C., Boone, T.B., Bradley, A. and Thompson, T.C. (2003) *Am. J. Pathol.* 162, 1241–1248.
- [16] Zager, R.A., Johnson, A., Hanson, S. and Dela Rosa, V. (2002) *Kidney Int.* 61, 1674–1683.
- [17] Féraillé, E. and Doucet, A. (2001) *Physiol. Rev.* 81, 345–417.
- [18] Coelho-Sampaio, T., Teixeira-Ferreira, A. and Vieyra, A. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 10249–10253.
- [19] Boumendil-Podevin, E.F. and Podevin, R.A. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* 735, 86–94.
- [20] Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- [21] Coka-Guevara, S., Markus, R.P., Caruso-Neves, C., Lopes, A.G. and Vieyra, A. (1999) *Eur. J. Biochem.* 263, 71–78.
- [22] Gustavsson, J., Parpal, S., Karlsson, M., Ramsing, C., Thorn, H., Borg, M., Lindroth, M., Peterson, K.H., Magnusson, K.-E. and Stralfors, P. (1999) *FASEB J.* 13, 1961–1971.
- [23] Taussky, H.H. and Shorr, E. (1953) *J. Biol. Chem.* 202, 675–685.
- [24] Inesi, G., Kurzmack, M., Coan, C. and Lewis, D.E. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 3025–3031.
- [25] Sorenson, M.M., Coelho, H.S. and Reuben, J.P. (1986) *J. Membr. Biol.* 90, 219–230.
- [26] Niggli, V., Adunyah, E.S., Penniston, J.T. and Carafoli, E. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 395–401.
- [27] Toledo-Maciel, A., Gonçalves-Gomes, S., de Gouveia Castex, M. and Vieyra, A. (1998) *Biochemistry* 37, 15261–15265.
- [28] Klein, U., Gimpl, G. and Fahrenholz, F. (1995) *Biochemistry* 34, 13784–13793.
- [29] Laemmli, U.K. (1970) *Nature* 227, 680–685.
- [30] Sargiacomo, M., Sudol, M., Tang, Z.-L. and Lisanti, M.P. (1993) *J. Cell Biol.* 122, 789–807.
- [31] Miura, Y., Hanada, K. and Jones, T.L.Z. (2001) *Biochemistry* 40, 15418–15423.
- [32] Rothberg, K.G., Heuser, J.E., Donzell, W.C., Ying, Y.S., Glenney, J.R. and Anderson, R.G. (1992) *Cell* 68, 673–682.
- [33] Pike, L.J. and Casey, L. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 26453–26456.
- [34] Pike, L.J. and Miller, J.M. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 22298–22304.
- [35] Gimpl, G., Burger, K. and Fahrenholz, F. (1997) *Biochemistry* 36, 10959–10974.
- [36] Cornelius, F. (2001) *Biochemistry* 40, 8842–8851.
- [37] Cornelius, F., Turner, N. and Christensen, H.R.Z. (2003) *Biochemistry* 42, 8541–8549.
- [38] Coelho-Sampaio, T., Ferreira, S.T., Benaim, G. and Vieyra, A. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 22266–22272.
- [39] Monteith, G.R. and Roufogalis, B.D. (1995) *Cell Calcium* 18, 459–470.
- [40] Shaul, P.W. and Anderson, R.G.W. (1998) *Am. J. Physiol.* 275, L843–L851.
- [41] Bodin, S., Giuriato, S., Ragab, J., Humbel, B.M., Viala, C., Vieu, C., Chap, H. and Payrastre, B. (2001) *Biochemistry* 40, 15290–15299.
- [42] Isshiki, M., Ando, J., Korenaga, R., Kogo, H., Fujimoto, T., Fujita, T. and Kamiya, A. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 5009–5014.
- [43] Isshiki, M. and Anderson, R.G.W. (1999) *Cell Calcium* 26, 201–208.
- [44] Murata, M., Peranen, J., Schreiner, R., Weiland, F., Kurzchalia, T. and Simons, K. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 10339–10343.
- [45] Stahlhut, M., Sandvig, K. and van Deurs, B. (2000) *Exp. Cell Res.* 261, 111–118.

Sphingosine modulation of a phosphatidylinositol-4 kinase
coupled to a diacylglycerol kinase in kidney basolateral
plasma membranes

Thiago Lemos^a, Osman F. Silva^a, Luciana Nogaroli^a, Thaís A. Bonilha^a, Pilar
A. M. Moreno^a, Róbson R. Bernardo^b, Giovane G. Tortelote^a, Adalberto
Vieyra^a, Marcelo Einicker-Lamas^{a,*}

^a*Laboratório de Físico-Química Biológica Aída Hassón-Voloch, Instituto de Biofísica
Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21949-900, Ilha do
Fundão, Rio de Janeiro, Brazil ;* ^b*Faculdade de Farmácia, Universidade Estácio de Sá,
Barra da Tijuca, 22631-021, Rio de Janeiro, Brazil*

*Corresponding author. Tel.: +55 21 2562 6520; fax: +55 21 2280 8193 *E-mail address:*
einicker@biof.ufrj.br (M. Einicker-Lamas).

Abbreviations: BLM, kidney basolateral membranes; BLM-DGK, diacylglycerol kinase from kidney basolateral membranes; BLM-PI4K, phosphatidylinositol-4 kinase from kidney basolateral membrane; DAG, diacylglycerol; DGK, diacylglycerol kinase; EGTA, ethylene glycol bis(β -amino-ethyl ether)*N,N,N',N'*-tetracetic acid; Hepes, *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid; HPLC, high performance liquid chromatography; LPA, lysophosphatidic acid; NaN₃, sodium azide; PA, phosphatidic acid; [³²P]_iP_i, radioactive orthophosphate; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride; PI-4K, phosphatidylinositol-4 kinase; PtdIns(4)P, phosphatidylinositol-4-phosphate; PtdIns(4)³²P, radioactive phosphatidylinositol-4-phosphate; TLC, thin-layer chromatography.

Abstract

Phosphatidylinositol-4 kinase (PI-4K) is involved in the generation of phosphatidylinositol-4 phosphate (PtdIns(4)P), a potent signaling lipid. In this study we show that there is a sphingosine-modulated PI-4K associated with basolateral membranes (BLM) of kidney proximal tubules. Using an anti- α subunit PI-4K polyclonal antibody, two bands of 57 and 68 kDa were detected. Maximal activity was obtained at 37 °C with a single activation profile and at a pH range around 7.0. The ATP dependence shows that the MgATP²⁻ complex is the true substrate, free Mg²⁺ is an essential cofactor, and higher concentrations of free ATP are inhibitory. Endogenous phosphatidylinositol (PI) was enough for half-maximal activity, revealing that slight modifications of PI levels in the neighboring membrane environment promote significant variations in PI-4K activity. Formation of PtdIns(4)P and phosphatidic acid has a 1:1 stoichiometry, which is modified in opposite directions after addition of sphingosine: PI-4K is stimulated ten times whereas diacylglycerol kinase is inhibited by more than 50%. We propose that a tightly coupled regulatory network involving glycerol- and sphingolipids participates in the regulation of key physiological processes in renal BLM.

Keywords: Phosphatidylinositol-4 kinase; Diacylglycerol kinase; Sphingosine kinase; Basolateral plasma membranes; Kidney transport

1. Introduction

Membrane phospholipids play multiple roles in cells by establishing a hydrophobic barrier, by providing a matrix for many catalytic processes, and by influencing the functional properties of membrane-associated events [1]. It is also well documented that lipids in membranes are directly or indirectly implicated in signal transduction in response to various extracellular stimuli. Phosphatidylinositol (PtdIns) and other inositol-containing lipids represent a small fraction of the phospholipids present in all cellular membranes, which are important in the regulation of various cell functions including cell signaling, membrane trafficking, cell proliferation and cytoskeletal organization [2, 3]. A first step in the synthesis of the different phosphoinositides is the phosphorylation of PtdIns at the D4 position of the inositol ring, producing phosphatidylinositol-4 phosphate (PtdIns(4)P), which is the substrate for another phosphoinositide kinase that catalyzes the phosphorylation of PtdIns(4)P in the D5 position yielding phosphatidylinositol-4,5 bisphosphate (PtdIns(4,5)P₂). An increase in receptor-stimulated phosphoinositide turnover has been the focus of attention for more than five decades, since the observation of a striking increase in ³²P-labeling in PtdIns and phosphatidic acid after cell stimulation [4]. The synthesis, degradation, and subsequent resynthesis of the phosphoinositides form a crucial cellular metabolic cycle known as the phosphoinositide cycle [5, 6]. A major breakthrough on phosphoinositide metabolism, was the discovery of two second messengers, inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃) and diacylglycerol (DAG), which are produced from PtdIns(4,5)P₂ hydrolysis by phospholipase C (PLC). This ubiquitous cell signaling pathway is known to regulate intracellular Ca²⁺ transients through receptor-stimulated events as the hydrophilic headgroup IP₃ mobilizes Ca²⁺ from internal stores, whereas the hydrophobic backbone DAG, activates protein kinase C (PKC) [6-8] leading to different cell responses.

In the last decade, it has become increasingly clear that phosphoinositides are more than just second messenger precursors. For example, PtdIns(4)P has been implicated as an important physiological direct activator of Ca²⁺-ATPases and therefore, of the active Ca²⁺ fluxes [9-11]. In addition, PtdIns(4)P and other acidic phospholipids are also regulators of ion channels [12]. For this special reason, the enzymes that phosphorylate

PtdIns on the 4-position of the inositol ring, called PtdIns-4 kinases (PI-4K) have become increasingly interesting [13]. They have been classified into two major groups based on their catalytic properties [14]. The type II enzymes are tightly membrane-bound proteins that have been purified from different sources yielding a protein of 54-55 kDa, with high affinity for ATP (K_m in the 10–50 μM range) and hence high sensitivity to inhibition by adenosine (K_i in the 10–70 μM range) [14]. Their activity is greatly stimulated by detergents, and requires Mg^{2+} (or Mn^{2+}) but is inhibited by micromolar concentrations of Ca^{2+} (for review see [14-16]). On the other hand, type III PI-4K are larger proteins with low affinity for ATP (K_m in the 400–800 μM range), low sensitivity to adenosine (K_i above mM) and with only loose attachment (for the most part) to the membranes [3, 14]. The type I PtdIns kinase is in the PI-3K family [17-19].

The basolateral membranes (BLM) from kidney proximal tubules constitute an interesting model for the study of phosphoinositide turnover and its physiological roles, as judged by the presence of different surface receptors, G-proteins, protein kinases, phospholipases and important ion transporters, such as Ca^{2+} -ATPase, $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ and Na^+ -ATPase [20-22]. Previous results from our laboratory have demonstrated the formation of PtdIns(4)P in phosphorylation assays using the purified BLM from pig kidney [11, 23, 24], thus including this signaling lipid in the regulatory network that is associated with this membrane.

The aim of this work is to identify the interplay between PI-4K, DGK and SPK in the purified BLM fraction, since these enzymes have an important role in transepithelial fluxes by locally controlling the levels of lipid mediators such as PtdIns(4)P, DAG and S1P, respectively, with further modulation of the ion pumps and transporters located in the BLM [20-22].

2. Materials and methods

2.1. Materials

Buffers, bovine serum albumin and protease inhibitors were obtained from Sigma Chemical Co. (Saint Louis, MO). Percoll was from Pharmacia (Uppsala, Sweden). Thin

layer chromatography (TLC) plates and all the reagents used in the chromatographic procedures were from Merck (Darmstadt, Germany). All the solutions and films used in autoradiograms were from Kodak (Resende, Brazil). Distilled water deionized with the Milli-Q system of resins (Millipore Corp., Marlborough, MA) was used to prepare all solutions. [$^{32}\text{P}_i$]P $_i$ was obtained from IPEN (São Paulo, Brazil). [γ - ^{32}P]ATP was prepared as described in [25]. The antibody anti-PI-4K α -subunit was purchased from Santa Cruz Research Antibodies (Santa Cruz, CA). All the reagents used for SDS-PAGE and the nitrocellulose membranes, ECL kit and hyperfilm used for the immunoblotting assay were from Amersham Bioscience (Buckinghamshire, UK). All other reagents were the highest purity available.

Pig kidneys were obtained from a slaughterhouse under the supervision of licensed veterinarians. Kidneys were rapidly removed after the animals had been killed, and transported in a chilled solution containing 250 mM sucrose, 10 mM HEPES-Tris (pH 7.6), 2 mM EDTA, 1 mM PMSF, and 0.15 mg/ml of soybean trypsin inhibitor. The external portion of the cortex was carefully removed and immediately used for membrane preparation.

2.2. Isolation of basolateral membranes

Purified basolateral membranes derived from kidney proximal tubules were prepared using the Percoll gradient method [26]. Controls for contamination with other membranes were carried out as previously described [20, 27]. The specific activity of the basolateral membrane marker ($\text{Na}^+\text{+K}^+$)ATPase ($159.2 \pm 1.6 \text{ nmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$) was enriched six-fold when compared to that measured in the starting kidney cortex homogenate. The membranes were stored in 250 mM sucrose in liquid N $_2$, which preserved marker activity for at least 5 months.

2.3. Phosphorylation assay

We used the procedure previously described [11, 23, 24] with slight modifications. Except when otherwise noted, the standard assay medium (1 ml) contained 30 mM MES-Tris (pH 7.0), 1 mM [γ - ^{32}P]ATP (specific activity 10^5 cpm/nmol), 1.1 mM MgCl $_2$ or 1

mM EDTA for Mg^{2+} -free conditions, 10 mM NaN_3 , 0.5 mM ouabain, and 0.5 mM EGTA. The reaction was started by the addition of $[\gamma\text{-}^{32}P]ATP$ to the membranes (0.1 mg protein/ml) and the incubation time was 10 min at 37 °C. Except when noted, the different substances to be tested under each experimental condition were added immediately before addition of $[\gamma\text{-}^{32}P]ATP$.

2.4. Lipid analysis

Total lipids were extracted, after incubation of the membranes, by adding 5 ml of chloroform/methanol/HCl (2:1:0.075, v/v) as described in [28]. The resulting organic phase was dried under N_2 , reconstituted in 90 μ l of chloroform/methanol: H_2O (7.5:2.5:0.2 v/v), and spotted onto heated-activated silica-gel 60 TLC plates. The plates were developed in chloroform/acetone/methanol/acetic acid/water (120:45:39:36:24, v/v), and the lipids phosphorylated by $[\gamma\text{-}^{32}P]ATP$ were detected in the autoradiograms of the TLC plates as described elsewhere [11, 23, 24]. Bidimensional chromatography was performed as described in [29].

2.5. Identification of *PtdIns(4)P* by HPLC analysis

High performance liquid chromatography (HPLC) analysis was performed using an SCL-10AVP System (Shimadzu Corp., Tokyo, Japan) connected to a 20- μ l loop (model LC-10AT). Radiolabeled $PtdIns(4)^{32}P$ detected on the TLC plates was recovered by scraping its corresponding spots and re-extracted from the silica as described above; then it was deacylated and analyzed by HPLC according to [30]. The retention time was compared with those of deacylated $[^3H]PtdIns(4)P$ and $PtdIns(3)^{32}P$ standards ($[^3H]Gro\text{-}PtdIns(3)P$ and $[^3H]Gro\text{-}PtdIns(4)P$ respectively), which were prepared as previously described [31]. A Partisphere Sax column (Whatman Inc., Clifton, NJ) was used and the mobile phase was a 1 M $(NH_4)_2HPO_4$ solution (pH adjusted to 3.8 with phosphoric acid) [30]. Samples were collected at 30 s intervals and counted in a liquid scintillation counter.

2.6. Measurement of phosphatidylinositol-4 kinase activity

The PtdIns(4)³²P spots detected by autoradiography were scraped from the TLC plate, put in a vial and counted in a liquid scintillation counter. The activity was expressed as pmol PtdIns(4)P \times mg⁻¹ \times min⁻¹.

2.7. Determination of free ATP and the MgATP²⁻ complex concentrations

Free ATP and MgATP²⁻ at different ATP and MgCl₂ concentrations were calculated using a computer program that took into account the different species involved in the equilibria between EGTA, contaminant Ca²⁺ (10 μ M), ATP, Mg²⁺ and H⁺, and the influence of ionic strength on the association constants for ATP and Mg²⁺ [32].

2.8. Protein determination assay

A 10 μ l aliquot (in triplicate) was used for the protein determination assay, which was performed using the Folin phenol method described by Lowry et al. [33] with the addition of 5% SDS in the samples, and bovine serum albumin as standard.

2.9. SDS-PAGE and immunoblotting

The BLM fractions were solubilized in a small volume of sample buffer to a final concentration of 2 μ g/ μ l. The maximal volume/slot was 50 μ l. The total BLM proteins were separated and identified in 12.5% sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), using a Mini PROTEAN[®]3 System (Bio-Rad Laboratories, Hércules, CA) at 60 mA/gel. The proteins were transferred at 350 mA to a Hybond[™] nitrocellulose membrane (Amersham Bioscience, Uppsala, Sweden) using the same Bio-Rad system described above for approximately 90 min. The nitrocellulose membrane containing the immobilized proteins was first blocked with non-fat dry milk (5%) plus BSA (1%) in Tris buffered saline containing Tween (0.001%) (TBS-T), for 90 min. After the blockage, the membrane was washed twice in TBS-T under constant stirring for 3 min. Next, the membrane was incubated with the polyclonal antibody anti-PI-4K α -subunit (1:300) under constant stirring for 2 h at room temperature. The membrane was

washed again (five times, 3 min each) with TBS-T. The secondary antibody used was an anti-mouse HRP (1:2000) which was incubated with the membrane for 90 min at room temperature under constant stirring with a sequential wash (five times, 3 min each) with TBS-T. The PI-4K was detected using the chemiluminescence ECLTM system and Hyperfilm. The molecular weight was determined by using pre-stained molecular weight standards.

2.10. Statistical analysis

The results were expressed as means \pm SE of at least three separate determinations done in triplicate, with different membrane preparations.

3. Results

3.1. PtdIns(4)P is formed in the isolated BLM fraction

Fig. 1 shows the formation of PtdIns(4)³²P, after pre-incubation of this membrane fraction in the presence of [γ -³²P]ATP, followed by lipid extraction and separation by TLC as described in Section 2. Although the presence of different phospholipids is clearly identified by the iodine vapors (data not shown), only two phospholipids are significantly labeled with the use of a specific activity of 10⁵ cpm/nmol [γ -³²P]ATP¹, as revealed by the autoradiogram of the respective TLC plate (Fig. 1A): PtdIns(4)³²P and ³²P-phosphatidic acid (PA) (see also [24]). To confirm the identity of the phosphorylated lipid, we compared its mobility in unidimensional and bidimensional TLC with the commercial standards. The HPLC analysis of the radiolabeled PtdIns(4)³²P demonstrates that it was really the reference lipid (Fig. 1B). These results clearly show that there is a PI-4K associated with the BLM, which was further confirmed by immunoblotting using a polyclonal antibody anti-PI-4K α -subunit. Fig. 1C shows that the antibody recognizes two bands at 57 and 62 kDa, which are also present in the positive control used, rat cerebellum.

¹ PtdIns(4,5)P₂ is detected at highest specific activity (10¹¹ cpm/nmol) [34]

3.2. Requirements for the PI-4K activity

A time-course study for the formation of PtdIns(4)P was also performed. Fig. 2A shows that the PI-4K activity is linear in the first 15 min, reaching a plateau after 30 min of reaction time. We have also studied the protein concentration dependence for the formation of PtdIns(4)P, and as can be seen in Fig. 2B, increasing the protein concentration in the reaction medium, promotes a continuous rise in PI-4K activity. Boiled membrane fractions were not able to produce PtdIns(4)P, showing that the formation of the lipid is an enzyme-mediated process. The temperature dependence is shown in Fig. 3. The PI-4K activity from BLM gradually increases from 17 °C, reaching its maximal value at 37 °C (main panel). The inset to Fig. 3 shows that a single Arrhenius function adjusts to the experimental points in the temperature interval 17–37 °C, with an energy of activation value of $58.6 \text{ kJ} \times \text{mol}^{-1}$. The pH effect for the PI-4K activity was also investigated, and it can be seen in Fig. 4 that the optimal pH was 6.9–7.1.

3.3. Substrate dependence for the BLM-PI-4K activity

PI-4K is an enzyme with two substrates (the phosphorylatable PtdIns and the phosphorylating ATP) and a cofactor (Mg^{2+} ; see Fig. 1A). Fig. 5 shows that BLM endogenous PtdIns is enough for half-activation of the enzyme and Fig. 6 shows that the true phosphorylating substrate is the MgATP^{2-} complex, since (i) the PI-4K activity increases (main panel in Fig. 6A) in parallel with the concentration of MgATP^{2-} (compare with the dashed line in the inset), (ii) the correlation of PI-4K activity vs PI-4K activity/[substrate] gives a straight line when the MgATP^{2-} complex is used (Fig. 6B) (half-maximal activation in the energy–donor substrate curve was found at $24 \text{ } \mu\text{M}$ MgATP^{2-}). Moreover, Table 1 clearly shows that free ATP is an inhibitor of the enzyme, probably by competition with the MgATP^{2-} complex. When the kinetics of PI-4K activation is examined as a function of total MgCl_2 , a sigmoidal profile is obtained (Fig. 6A). The cooperativity of the total magnesium curve ($n \approx 2$) suggests that two sites for the cation are present in PI-4K (this point is considered below).

In a recent study of mutual interactions in the metabolic pathways of glycerol- and sphingolipids in BLM, attenuation of PA labeling was also observed in phosphorylation assays after addition of sphingosine (Sph) [23]. Figure 7 shows the influence of Sph on the DGK and PI-4K in assays carried out in parallel. This quantitative trend shows that addition of 100 μ M Sph simultaneously decreases DGK activity by \approx 50% while stimulates PI-4K by about one order of magnitude. Under these conditions, a strong phosphorylation of Sph to S1P occurs [23]. Figure 8 shows that activation of PI-4K by Sph is the same, whether or not enzyme activity is measured with exogenous substrate.

4. Discussion

Signaling roles for phosphoinositides that involve their exquisitely regulated synthesis and hydrolysis to generate exchangeable second messengers have been well characterized [2, 3, 13]. In addition, recent work has revealed additional roles for phosphoinositides that do not involve their hydrolysis [13, 14]. Common themes of localized signal generation and the spatially localized recruitment of effector proteins appear to underlie the mechanisms employed in signal transduction events and their impact on cytoskeletal rearrangements, membrane trafficking and transport across the cell membrane [35].

Phosphatidylinositol kinase activity has been reported to be present in a great variety of cellular membranes, and multiple isozymes of PI-4K are present within the cell, suggesting that the product of this reaction may have more than one biological function and different mechanisms for their regulation [5]. The presence of a PI-4K associated with the BLM has already been reported in previous work from our laboratory; we detected the formation of PtdIns(4)P in purified BLM fractions after the addition of labeled ATP [11, 23, 24]. Additional information is now added to the evidence of a PI-4K in the BLM from kidney proximal tubules. The immunodetection of two bands of 57 and 62 kDa in the BLM is related to the already identified type II PI-4K, which is known to be associated with plasma membranes and was purified from different sources with similar molecular weight [14-16]. The K_{mMgATP} found in Fig. 6B (24 μ M) is also compatible with that

described for isoform II of PI-4K [3, 14]. The existence of two Mg sites revealed by the cooperativity of the MgCl_2 curve ($n = 1.85$; Fig. 6A), the observation that the MgATP^{2-} complex is the true energy-donor substrate and $K_{\text{Mg}} = 4.7$ mM, i.e., in the extracellular concentration range, are compatible with a model in which BLM PI-4K has a cytosolic active site (for the complex MgATP^{2-}) and a regulatory site for free Mg^{2+} facing the interstitial space. In the same membrane, activation by free Mg^{2+} was observed for DGK [24], the enzyme which appears to be tightly coupled to the PI4-K characterized here.

Although the presence and importance of phosphoinositides for cell signaling events in kidney have been studied for a number of years [36, 37], to the best of our knowledge there is no substrate characterization of the PI-4K associated with BLM of the proximal tubule cells [23] and, especially, its strong activation by Sph has not been previously demonstrated. The physiological relevance for localization of PI-4K in BLM can be directly associated with ion transport across the renal epithelium, as judged by the modulatory effect of $\text{PtdIns}(4)\text{P}$ on different plasma membrane ion transporters and channels [9, 11, 12]. The generation of $\text{PtdIns}(4)\text{P}$ in the BLM of proximal tubule cells can also be important for other cell processes [38], as well as being converted to $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ [39] or $\text{PtdIns}(3,4)\text{P}_2$, which are involved in a myriad of cellular events including ion transport [13, 40]. Different points of convergence among these different signaling cascades are therefore interacting and can play important physiological roles in the BLM [23, 41-44]. The first product of PI-4K described here can be considered the first messenger of this interacting network that modulates the most relevant function of these cells: the reabsorption of large amounts of fluid.

$\text{PtdIns}(4)\text{P}$ and PA are the only products simultaneously phosphorylated in picomolar stoichiometric amounts and at the same rate at pH 7.0, 37 °C, 1 mM ATP and 1.1 mM MgCl_2 (Fig. 7, white bars), suggesting that PI-4K (this paper) and DGK [24] are tightly coupled in BLM. This could also be important in the regulation of transport events, since the substrate for DGK, the DAG molecule, is an activator of PKC, which in turn is a potent inhibitor of Ca^{2+} transport [20, 45] and an activator of Na^+ transport [34, 46]. The different thermal behavior of PI-4K and DGK (Fig. 3; compare with Fig. 3 in [24] and, especially, the contrasting response to Sph in conditions in which the phosphorylated

form of this sphingolipid prevails (Fig. 7, filled bars; and [23], indicate that alterations in the neighboring lipid microenvironment of the two glycerolipid kinases could be important in the balance of PtdIns(4)P/PA within the renal membranes. The additive effects of PtdIns and Sph on PI-4K activity (Fig. 8) may indicate that the efficient modulation triggered via sphingolipids can occur independently of the local PtdIns fluctuations.

The opposite effects of Sph on DGK and PI4-K deserve further mention due to their potential physiological relevance. It can be hypothesized that under conditions in which ceramidase activity and Sph release are stimulated above the normal [47, 48] with preservation of high DAG levels as in the case of a rise in circulating angiotensin II and concomitant activation of PLC [45], the huge stimulation of PtdIns(4)P formation by Sph (Fig. 7), could compensate for uncontrolled increase in intracellular Ca^{2+} in kidney cells. Plasma membrane Ca^{2+} -ATPase driven Ca^{2+} efflux, which is considered the mechanism for the fine-tuned regulation of cytosolic Ca^{2+} [49, 50], is strongly stimulated by PtdIns(4)P [9, 11], whereas it is attenuated by triggering a DAG-stimulated PKC-mediated response to increasing angiotensin II levels [45]. Therefore, a metabolic loop involving Sph (and S1P) could play an essential and integrative role between PI4-K and DGK in kidney membranes.

Since the present work was carried out in the absence of any agonist, it can be postulated that different hormones and/or autacoids able to activate PKC, such as adenosine and angiotensin II [20, 45], are physiological cognates in the modulation of PI-4K and DGK, and in their associated regulatory networks in kidney cells.

Acknowledgments

The authors would like to thank Ms. Monica Cristina dos Santos Vieira for helpful technical assistance. MCSV was the recipient of a technical assistance fellowship from the PROFIX Program, CNPq-Brasil. TAB and PAMM were undergraduate students of the PINC/Federal University of Rio de Janeiro Medical School Program and fellows of the

PROFIX Program. The authors also acknowledge Mrs. Lorna O'Brien for the needed corrections in English.

References

- [1] Y. Nozawa, A thematic series on lipid signaling: prologue, *J. Biochem.* 131 (2002) 283–284.
- [2] M. P. Czech, PIP2 and PIP3: complex roles at the cell surface, *Cell* 100 (2000) 603–606.
- [3] T. Balla, Pharmacology of phosphoinositides, regulators of multiple cellular functions, *Curr. Pharm. Des.* 7 (2001) 475–507.
- [4] M. Hokin, L. Hokin, Enzyme secretion and the incorporation of ^{32}P of pancreas slices, *J. Biol. Chem.* 203 (1953) 967–977.
- [5] L. J. Pike, Phosphatidylinositol 4-kinases and the role of polyphosphoinositides in cellular regulation, *End. Rev.* 13 (1992) 692–706.
- [6] Y. Nishizuka, Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C, *Science* 258 (1992) 607–614.
- [7] R. H. Michell, Inositol phospholipids and cell surface receptor function. *Biochim. Biophys. Acta* 415 (1975) 81–147.
- [8] D. E. Clapham, Calcium signaling, *Cell* 80 (1995) 259–268.
- [9] L. Missiaen, L. Raeymaekers, F. Wuytack, M. Vrolics, H. de Smedt, R. Casteels, Phospholipid-protein interactions of the plasma-membrane Ca^{2+} -transporting ATPases. Evidence for a tissue-dependent functional difference, *Biochem. J.* 263 (1989) 687–694.

- [10] A. P. Starling, J. M. East, A. G. Lee, Phosphatidylinositol 4-phosphate increases the rate of dephosphorylation of the phosphorylated Ca^{2+} -ATPase, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 14467-14470.
- [11] A. Guilherme, C. Reis-Silva, J. Moraes-Albuquerque, M. M. Oliveira, A. Vieyra, A novel phosphorylated lipid counteracts activation of the renal plasma membrane ($\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$)ATPase by endogenous phosphatidylinositol-4-phosphate, *Biosc. Rep.* 18 (1998) 79–89.
- [12] H. P. Ma, S. Saxena, D. G. Warnock, Anionic phospholipids regulate native and expressed epithelial sodium channel (ENaC), *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 7641–7644.
- [13] D. A. Fruman, R. E. Meyers, L. C. Cantley, Phosphoinositide kinases, *Ann. Rev. Biochem.* 67 (1998) 481–507.
- [14] T. Gehrman, L. M. G. Heilmeyer, Phosphatidylinositol 4-kinases, *Eur. J. Biochem.* 253 (1998) 357–370.
- [15] Y. Kanaho, T. Suzuki, Phosphoinositide kinases as enzymes that produce versatile signaling lipids, phosphoinositides, *J. Biochem.* 131 (2002) 503-509.
- [16] L. M. Jr. Heilmeyer, G. Jr. Vereb, G. Vereb, A. Kakuk, I. Szivak, Mammalian phosphatidylinositol 4-kinases, *IUBMB Life* 55 (2003) 59-65.
- [17] M. Whitman, C. P. Downes, M. Keeler, T. Keeler, L. Cantley, Type I phosphatidylinositol kinase makes a novel inositide phospholipid, phosphatidylinositol-3-phosphate, *Nature* 332 (1988) 644–646.
- [18] A. Toker, L. C. Cantley, Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase, *Nature* 387 (1997) 673–676.
- [19] B. Vanhaesebroeck, M. Waterfield, Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases, *Exp. Cell Res.*, 253 (1999) 239–254.

- [20] S. Coka-Guevara, R. P. Markus, C. Caruso-Neves, A. G. Lopes, A. Vieyra, Adenosine inhibits the renal plasma-membrane ($\text{Ca}^{2+}+\text{Mg}^{2+}$)-ATPase through a pathway sensitive to cholera toxin and sphingosine, *Eur. J. Biochem.* 263 (1999) 71–78.
- [21] E. Féraillé, A. Doucet, Sodium potassium adenosine triphosphatase dependent sodium transport in the kidney: hormonal control, *Physiol. Rev.* 81 (2001) 345-418.
- [22] L. S. Lara, R. B. Bica, S. L. Sena, J. S. Correa, M. F. Marques-Fernandes, A. G. Lopes, C. Caruso-Neves, Angiotensin-(1-7) reverts the stimulatory effect of angiotensin II on the proximal tubule Na^{+} -ATPase activity via a A779-sensitive receptor, *Reg. Pep.* 103 (2002) 17–22.
- [23] M. Einicker-Lamas, L. D. Wenceslau, R. R. Bernardo, L. N. C. de Bittencourt-Navarrete, A. Guilherme, M. M. Oliveira, A. Vieyra, Sphingosine-1 phosphate formation activates phosphatidylinositol-4-kinase in basolateral membranes from kidney cells: crosstalk in cell signaling through sphingolipids and phospholipids, *J. Biochem.* 134 (2003) 529–536.
- [24] L. Nogaroli, O. F. Silva, T. A. Bonilha, P. A. M. Moreno, R. R. Bernardo, A. Vieyra, M. Einicker-Lamas, Diacylglycerol kinase activity in purified basolateral membranes of kidney tubules I. Evidence for coupling with phospholipase C, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37 (2005) 79-90.
- [25] J. C. C. Maia, S. L. Gomes, M. H. Juliani, Preparation of (γ - ^{32}P) and (α - ^{32}P) nucleoside triphosphates with high specific activity, in: C. M. Morel (Ed.), *Genes of parasites: a laboratory manual*, Editora Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil, 1983, pp. 146–167.
- [26] E. F. Boumendil-Podevin, R. A. Podevin, Isolation of basolateral and brush-border membranes from the rabbit kidney cortex: vesicles integrity and membrane sidedness of the basolateral fraction, *Biochim. Biophys. Acta* 735 (1983) 86–94.

- [27] A. Vieyra, L. Nachbin, E. Dios-Abad, M. Goldfeld, J. R. Meyer-Fernandes, L. de Moraes, Comparison between calcium transport and adenosine triphosphatase activity in membrane vesicles derived from rabbit kidney proximal tubules. *J. Biol. Chem.* 261 (1986) 4247–4255.
- [28] J. Horwitz, R. L. Perlman, Phospholipid metabolism in PC12 pheochromocytoma cells, *Meth. Enzymol.* 141 (1987) 169–175.
- [29] M. M. Oliveira, M. F. Alves, A. A. Brigante, Differences in phospholipid composition of autotrophic and heterotrophic *Euglena gracilis*, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 23 (1990) 1237–1241.
- [30] L. A. Serunian, K. R. Auger, L. C. Cantley, Identification and quantification of phosphoinositides produced in response to platelet-derived growth factor stimulation. *Met. Enzymol.* 198 (1991) 78–87.
- [31] A. G. Todorov, M. Einicker-Lamas, S. L. De Castro, M. M. Oliveira, A. Guilherme, Activation of host cell phosphatidylinositol-3-kinases by *Trypanosoma cruzi* infection, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 32182–32186.
- [32] M. M. Sorenson, H. S. Coelho, J. P. Reuben, Caffeine inhibition of calcium accumulation by the sarcoplasmic reticulum in mammalian skinned fibers, *J. Memb. Biol.* 90 (1986) 219–230.
- [33] O. H. Lowry, N. J. Rosenbrough, A. L. Farr, R. J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–275.
- [34] L. B. Rangel, C. Caruso-Neves, L. S. Lara, A. G. Lopes, Angiotensin II stimulates renal proximal tubule Na⁺-ATPase activity through the activation of protein kinase C. *Biochim. Biophys. Acta* 1564 (2002), 310–316.
- [35] T. F. Martin, Phosphoinositide lipids as signaling molecules: common themes for signal transduction, cytoskeletal regulation and membrane trafficking, *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 14 (1998) 231–264.

- [36] D. A. Troyer, D. W. Schwertz, J. I. Kreisberg, M. A. Venkatachalan, Inositol phospholipid metabolism in the kidney, *Ann. Rev. Physiol.* 48 (1986) 51–71.
- [37] C. L. Chou, S. I. Rapko, M. A. Knepper, Phosphoinositide signaling in rat inner medullary collecting duct, *Am. J. Physiol.* 274 (1998) F564–F572.
- [38] J. R. Bruns, M. A. Ellis, A. Jeromin, O. A. Weisz, Multiple roles for phosphatidylinositol 4-kinase in biosynthetic transport in polarized Madin-Darby canine kidney cells, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 2012–2018.
- [39] L. B. A. Rangel, A. G. Lopes, L. S. M. Lara, T. L. G. Carvalho, I. V. Silva, M. M. Oliveira, M. Einicker-Lamas, A. Vieyra, L. Nogaroli, C. Caruso-Neves, PI-PLC β is involved in the modulation of the proximal tubule Na⁺-ATPase by angiotensin II, *Reg. Pep.* 127 (2005) 177-182.
- [40] D. W. Hilgemann, S. Feng, C. Nasuhoglu, The complex and intriguing lives of PIP₂ with ion channels and transporters, *Science's STKE* 111 (2001) 1–7.
- [41] T. Yorio, L. W. Frazier, Phospholipids and electrolyte transport. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 195 (1990) 293–303.
- [42] H. Hohage, M. Lohr, U. Querl, J. Greven, The renal basolateral transport system for organic anions: properties of the regulation mechanism, *J. Pharm. Exp. Ther.* 269 (1994) 659–664.
- [43] A. Z. Fernandis, G. Subrahmanyam, Protein tyrosine phosphorylation activates rat splenic type II phosphatidylinositol-4 kinase in vitro, *FEBS Lett.* 441 (1998) 432–436.
- [44] D. N. Brindley, D. English, C. Pilquil, C., K. Buri, Z. C. Ling, Lipid phosphate phosphatases regulate signal transduction through glycerolipids and sphingolipids, *Biochim. Biophys. Acta* 1582 (2002) 33–44.

- [45] I. Assunção-Miranda, A. Guilherme, C. Reis-Silva, G. Costa-Sarmiento, M. M. Oliveira, A. Vieyra, Protein kinase C-mediated inhibition of renal Ca^{2+} -ATPase by physiological concentrations of angiotensin II is reversed by AT_1 - and AT_2 -receptor antagonists, *Reg. Pep.* 127 (2005) 151-157.
- [46] L. B. Rangel, A. T. Malaquias, L. S. Lara, I. V. Silva, A. M. De Souza, A. G. Lopes, C. Caruso-Neves, Protein kinase C-induced phosphorylation modulates the Na^+ -ATPase activity from proximal tubules, *Biochim. Biophys. Acta* 1512 (2001) 310–316.
- [47] K. Geoffroy, N. Wiernsperger, M. Lagarde, S. El Bawab, Bimodal effect of advanced glycation and products on mesangial cell proliferation is mediated by neutral ceramidase regulation and endogenous sphingolipids, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 34343–34352.
- [48] K. Geoffroy, L. Troncy, N. Wiernsperger, M. Lagarde, S. El Bawab, Glomerular proliferation during early stages of diabetic nephropathy is associated with local increase of sphingosine-1-phosphate levels, *FEBS Lett.* 579 (2005) 1249–1254.
- [49] E. Carafoli, M. Brini, Calcium pumps: structural basis for and mechanism of calcium transmembrane transport, *Curr. Op. Chem. Biol.* 4 (2000) 152–161.
- [50] G. G. Tortelote, R. R. H. F. Valverde, T. Lemos, A. Guilherme, M. Einicker-Lamas, A. Vieyra, The plasma membrane Ca^{2+} pump from proximal kidney tubules is exclusively localized and active in caveolae, *FEBS Lett.* 576 (2004) 31-35.

LEGENDS TO FIGURES

Fig. 1. Evidence for the presence of a PI-4K in BLM from kidney proximal tubules (A) Autoradiogram of a TLC plate showing that only PtdIns(4)³²P and ³²PA are formed after the phosphorylation assay carried out as described in Section 2 (taken from [24]). (B) Immunoblotting detection of the PI-4K α -subunit. (C) HPLC profile of the eluted Gro-PtdIns(4)³²P (solid line) and the [³H]Gro-PtdIns(3)P and [³H]Gro-PtdIns(4)P standards (dashed line), as described in Methods.

Fig. 2. Formation of PtdIns(4)P increases with time and membrane protein concentration. (A) The BLM preparation was incubated in the medium described in Section 2. At the times indicated on the abscissa, aliquots were removed to measure the amount of PtdIns(4)³²P formed after lipid extraction and separation by TLC. The zero time sample was obtained by adding the reaction medium to the membranes previously solubilized with the extraction solvents. Data points show the mean \pm SEM of at least five different experiments carried out in triplicate. (B) Experiments as in (A) were carried out with the membrane protein concentrations shown on the abscissa. The arrow and the square show that PtdIns(4)³²P formation was barely detectable in previously boiled membranes.

Fig. 3. Temperature dependence of the PI-4K activity. Main panel: PI-4K activity was measured at the temperatures indicated on the abscissa. Inset: Arrhenius plot of the activation in the temperature range 17–37 °C. The activation energy (58.6 kJ mol⁻¹) was calculated from the slope of the regression line ($r^2 = 0.96$).

Fig. 4. pH-dependence of PI-4K activity. Formation of PtdIns(4)P was assayed in the reaction medium described in Section 2 except that pH values were those shown on the abscissa. The data points are the mean \pm SEM of five different experiments carried out in triplicate.

Fig. 5. Comparison of PI-4K activities with and without exogenous PtdIns. PI-4K activity was assayed in the absence or presence (50 and 500 nM) of PtdIns as shown. Data are the mean \pm SEM of four different experiments carried out in triplicate.

Fig. 6. Dependence on MgCl₂ and ATP concentrations. (A) PI-4K activity was measured at the total MgCl₂ concentrations shown on the abscissa in the presence of ATP 1 mM and the other standard conditions described in Section 2. The smooth curve was adjusted to the experimental points by non-linear regression using the equation $\text{PI-4K activity} = V_{\max} \times [\text{MgCl}_2]^n / \{(K_{0.5 \text{ Mg}})^n + [\text{MgCl}_2]^n\}$. $K_{0.5 \text{ Mg}} = 4.7$ mM is the concentration of MgCl₂ that gives half-maximal velocity ($V_{\max} = 67.5$ pmol \times mg⁻¹ \times min⁻¹) and n is a cooperativity index (1.85). Inset: variation in the concentrations of the MgATP²⁻ complex and of free ATP with increasing MgCl₂ concentrations. (B) Abscissa: PI-4K activity/[MgATP²⁻]; ordinate: PI-4K activity. The straight line was adjusted to the data by least squares using the equation $\text{PI-4K} = V_{\max} - b \times [\text{MgATP}^{2-}]$. Values of $V_{\max} = 65.9$ pmol mg⁻¹ \times min⁻¹ and $K_m \text{ MgATP} = 24$ μ M were calculated from the y - and x -intercepts, respectively. The concentrations of MgATP²⁻ complex (1 mM total ATP, varying MgCl₂ concentrations) were calculated as described in Section 2.

Fig. 7. Comparison of PI-4K and DGK activities in the absence and presence of Sph. PI-4K and DGK activities were measured in the same assays carried out in the absence (white bars) or presence (filled bars) of 100 μ M Sph, as shown on the abscissa. Data are the mean \pm SEM of at least four different experiments carried out in triplicate.

Table 1. Free ATP inhibits PI-4K activity^a

Total ATP (mM)	MgATP ²⁻ /free ATP ratio	PI-4K activity (pmol × mg ⁻¹ × min ⁻¹)
0.7	5.0	44.9
1.0	3.2	32.7
1.5	1.6	24.0
2.0	1.0	14.9
5.0	0.3	9.0

^aPI-4K activity was measured under the standard conditions described in Section 2 at the total [γ -³²P]ATP concentrations shown. Free ATP and MgATP²⁻ concentrations (obtained with 1.1 mM MgCl₂ and varying the total ATP) were calculated as described in Section 2 [32].

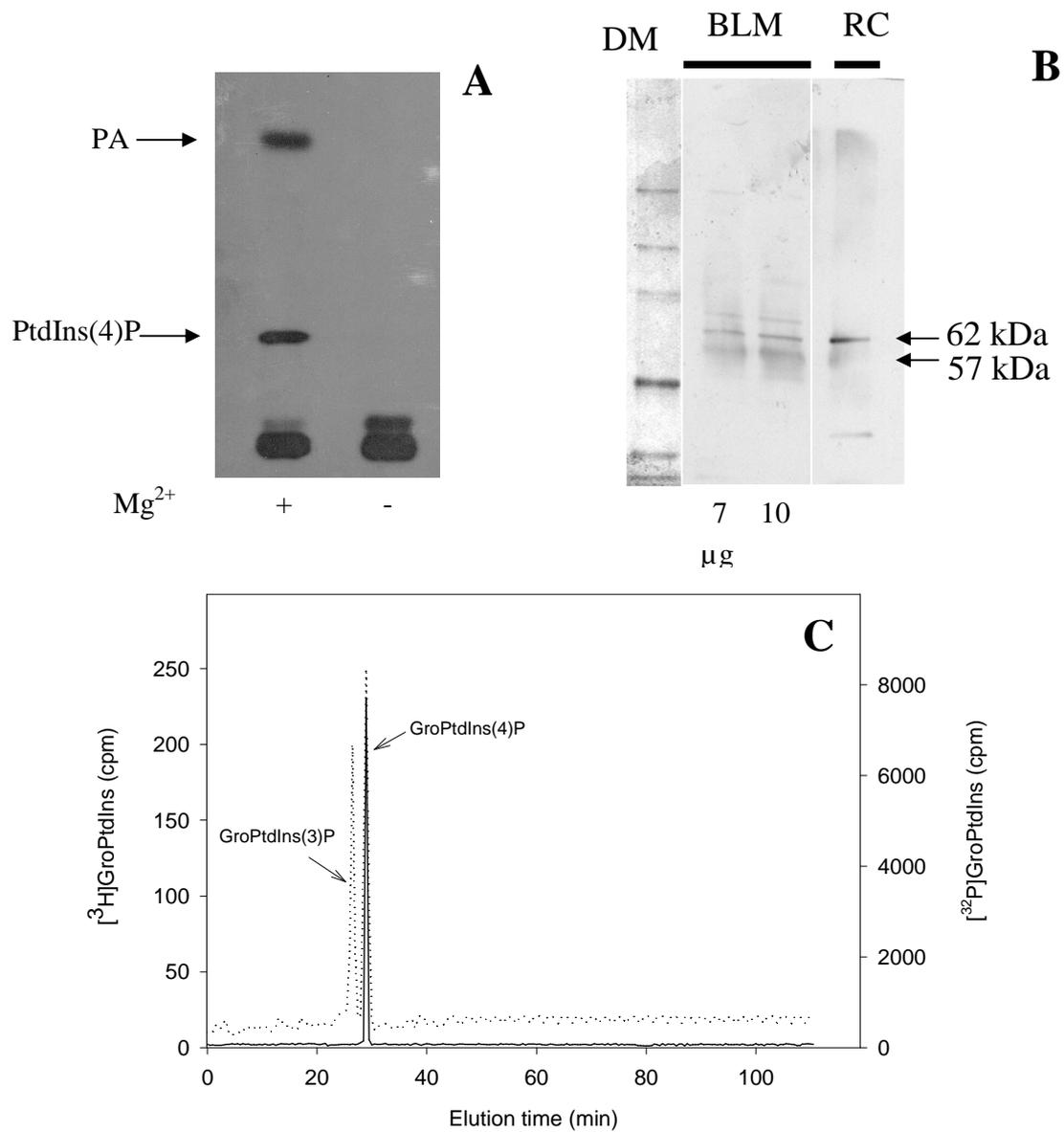
Fig.1 Lemos *et al.*, 2006

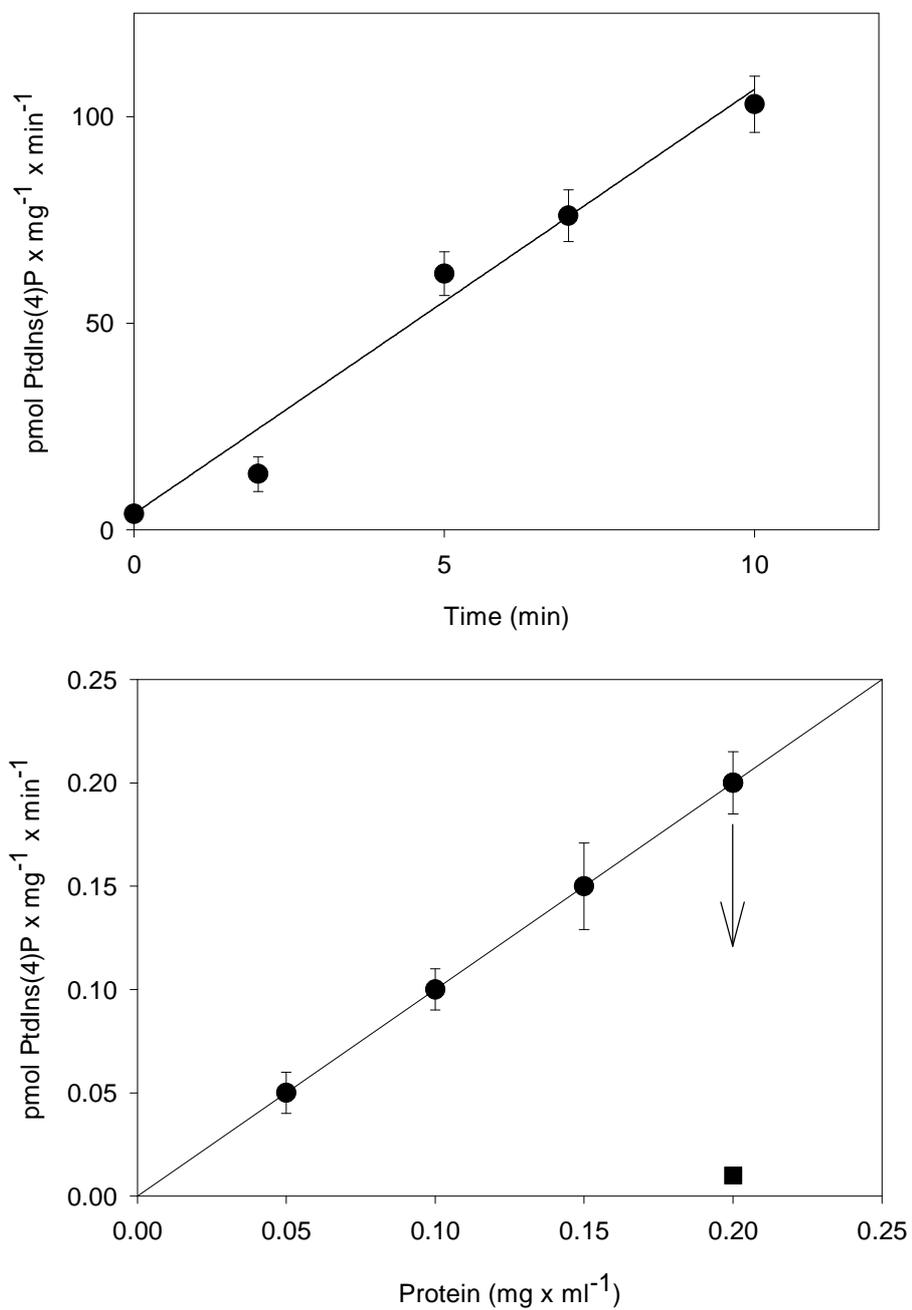
Fig.2 Lemos *et al.*, 2006

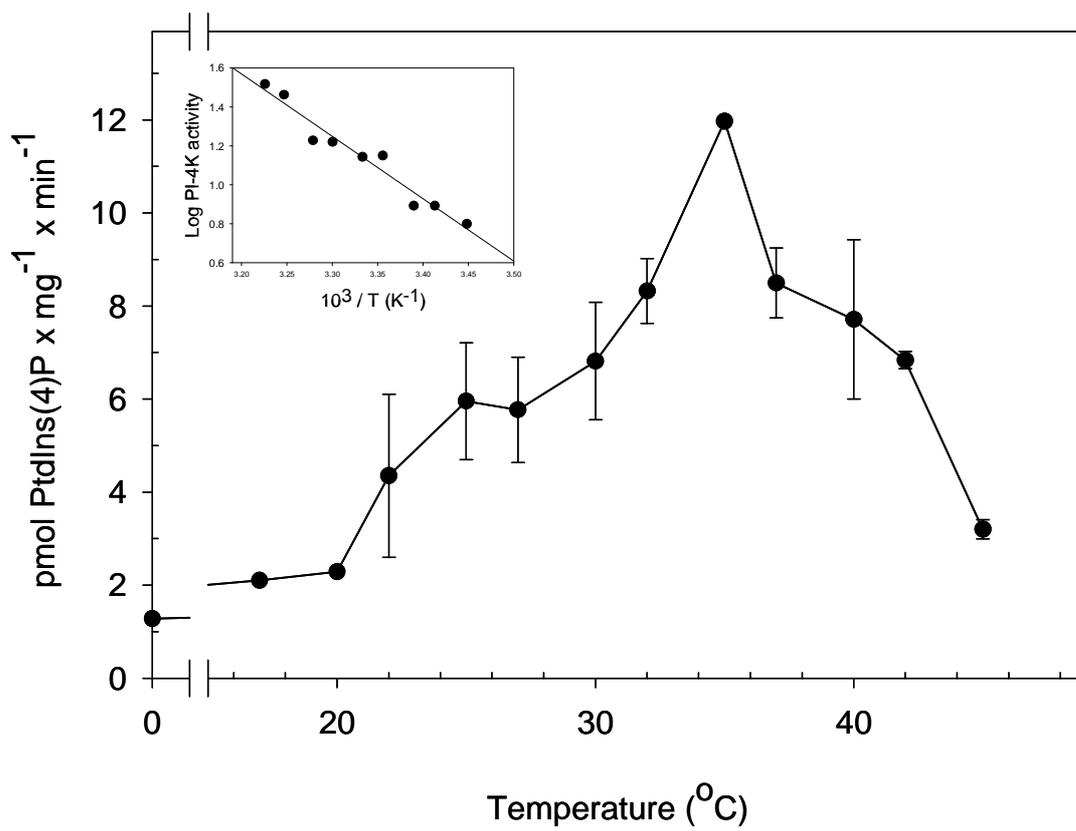
Fig.3 Lemos *et al.*, 2006

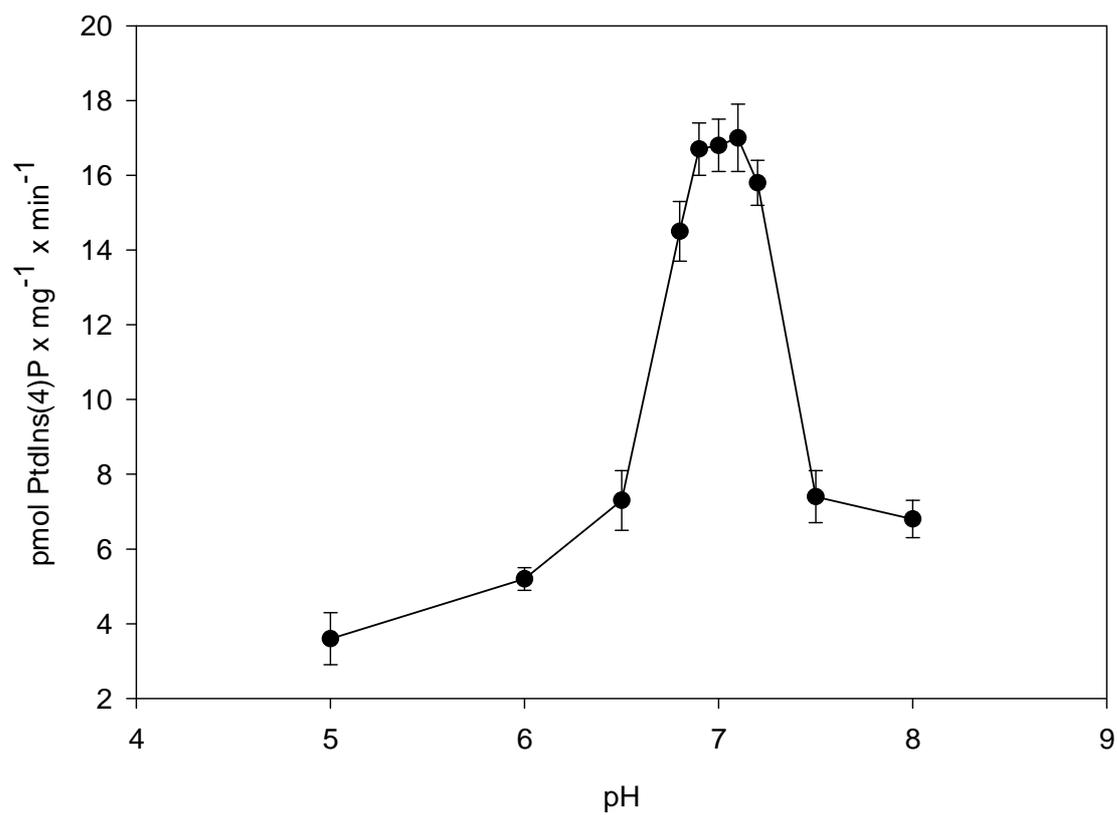
Fig.4 Lemos *et al.*, 2006

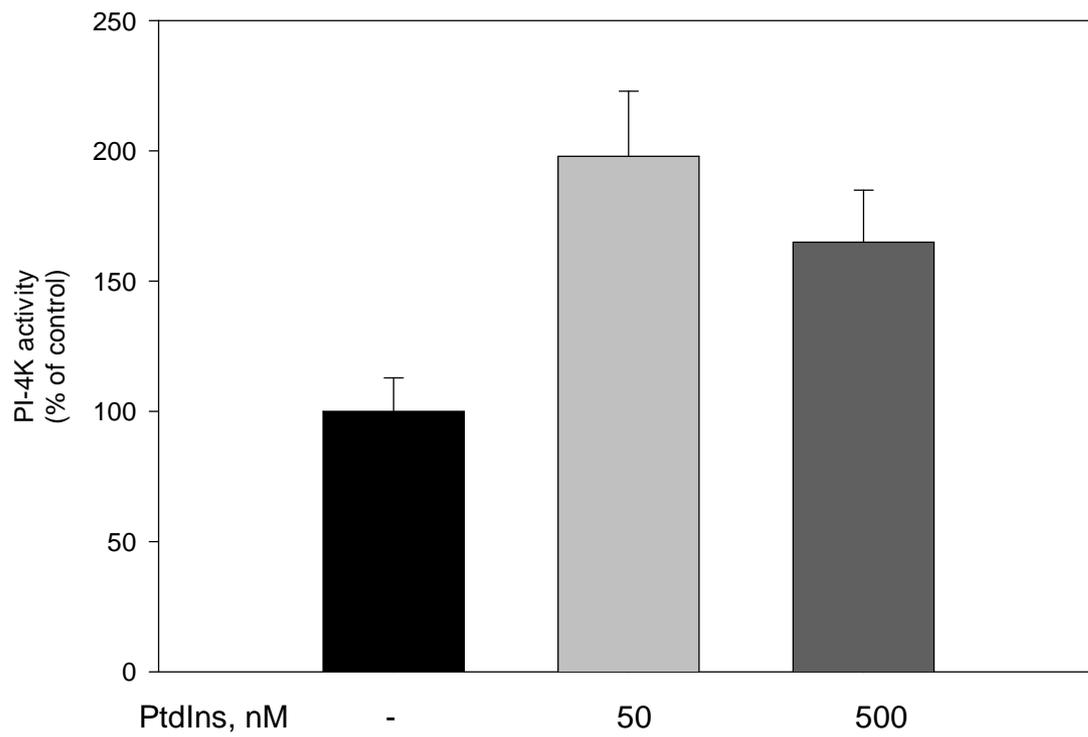
Fig.5 Lemos *et al.*, 2006

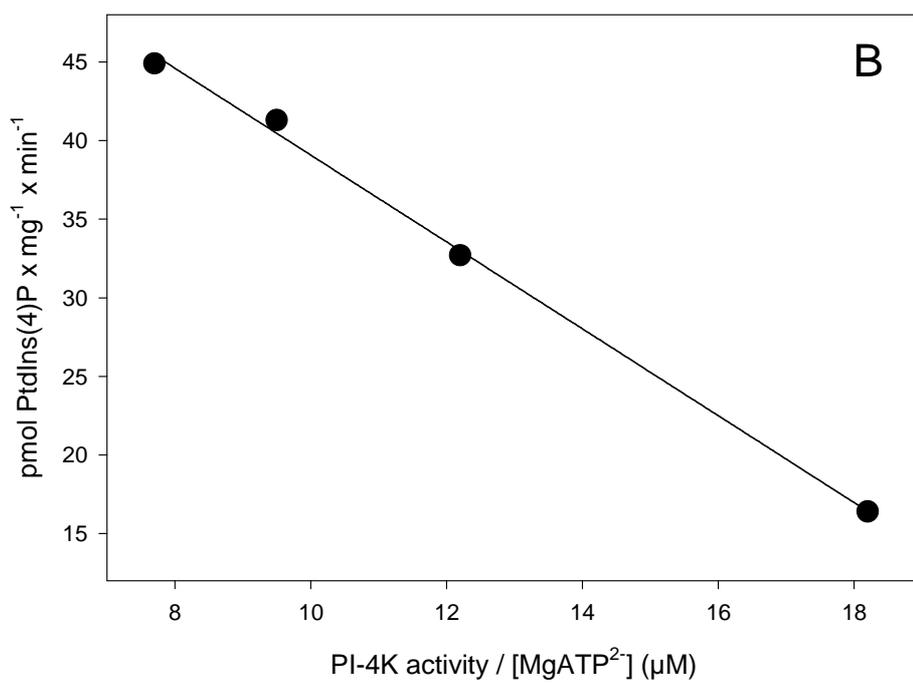
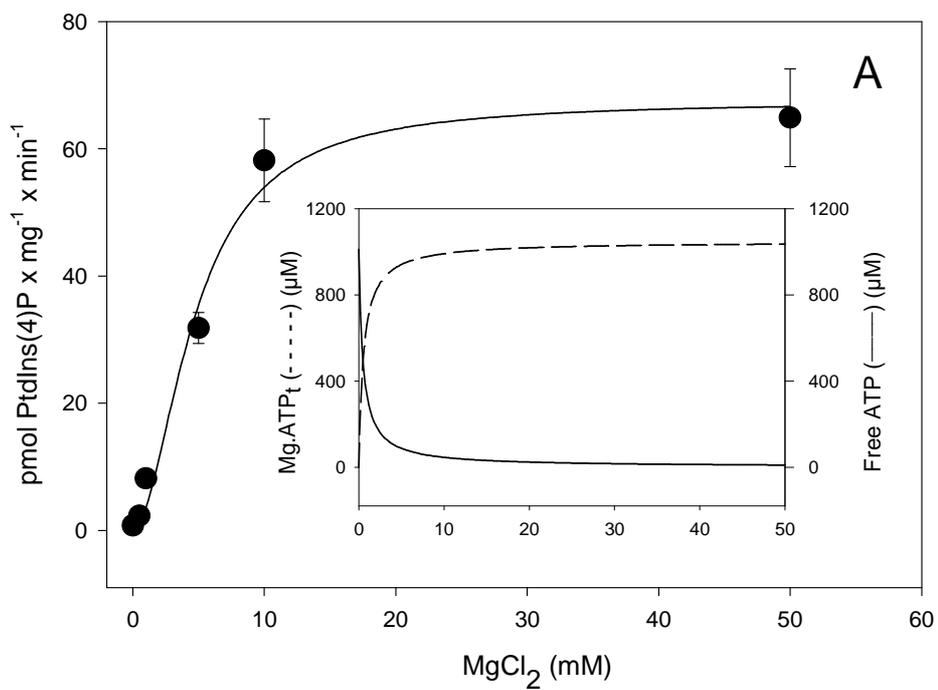
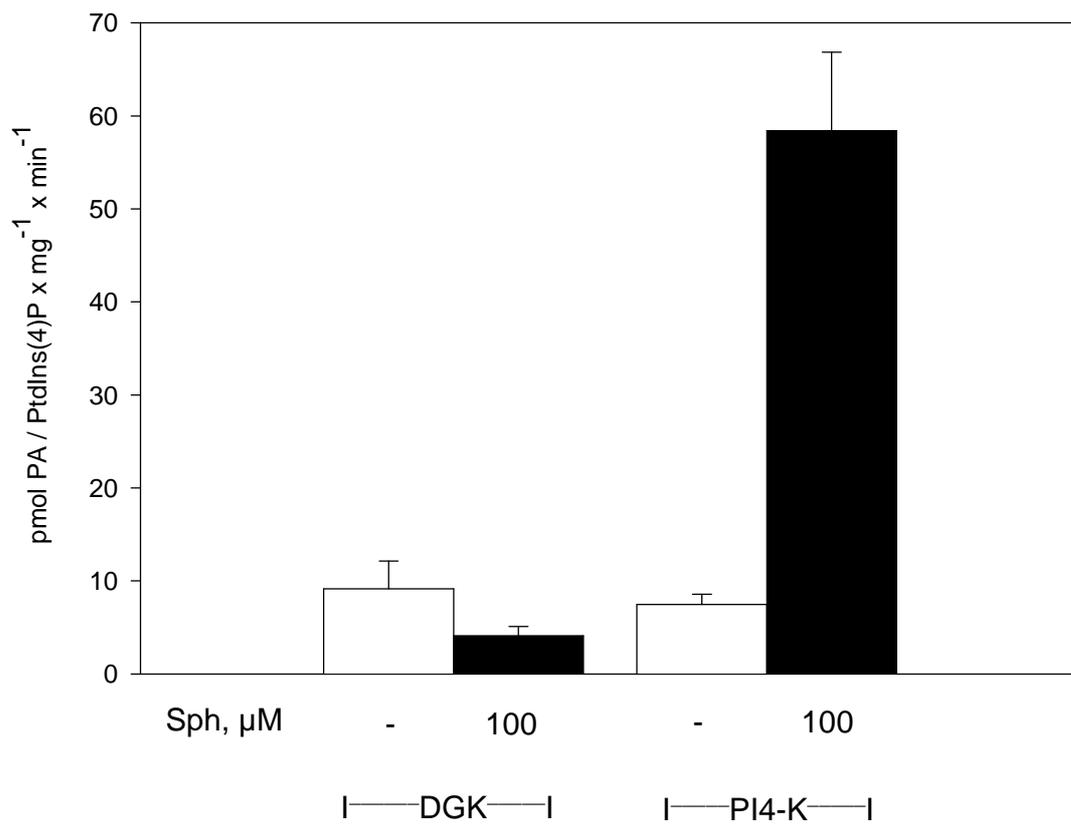
Fig.6 Lemos *et al.*, 2006

Fig.7 Lemos *et al.*, 2006

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)