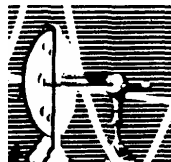


LINDSEY CABRAL

“MODULAÇÃO DA Ca^{2+} -ATPase DE TÚBULOS
PROXIMAIS RENAIIS POR CERAMIDAS ”

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO 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.

Tese de mestrado em Ciências Biológicas (Biofísica) desenvolvida entre março de 2005 e agosto de 2006 sob a orientação do Prof. Marcelo Einicker Lamas no Laboratório de Físico-Química Biológica Aída Hassón-Voloch do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho.

O trabalho foi financiado com auxílios concedidos pelas seguintes agências de fomento:
Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

FICHA CATALOGRÁFICA

Cabral, Lindsey Matos Pomodoro
Modulação da Ca^{2+} -ATPase de Túbulos Proximais
Renais por Ceramidas / Lindsey Matos Pomodoro Cabral.
Rio de Janeiro, 2006.
xv, 66 páginas

Dissertação (Mestrado em Biofísica) –
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto
de Biofísica Carlos Chagas Filho, 2006.

Orientador: Marcelo Einicker Lamas

1. Ca^{2+} -ATPase 2. Ceramida 3. Ceramida-1-fosfato
4. Rim 5. Túbulo Proximal 6. Membrana Basolateral
7. Proteínas cinases 8. Sinalização celular – Teses.

I. Einicker-Lamas, Marcelo (Orient.).
II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto
de Biofísica Carlos Chagas Filho. III. Modulação da Ca^{2+} -
ATPase de Túbulos Proximais Renais por Ceramidas.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Lindsey Matos Pomodoro Cabral

Modulação da Ca^{2+} -ATPase de Túbulos Proximais Renais por Ceramidas

Rio de Janeiro, 18 de agosto de 2006

Dr. Marcelo Einicker Lamas. UFRJ
(Nome do orientador, titulação e Instituição a que pertence)

Dr. Ednildo. UFRJ
(nome, titulação e instituição a que pertence)

Dr. Luiz Leão. UFF
(nome, titulação e instituição a que pertence)

Dr. Marcelo Morales. UFRJ
(nome, titulação e instituição a que pertence)

Aos meus pais Ely e Ruth,
à minha irmã Aline, ao meu namorado
Daniel e ao meu querido orientador Marcelo.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela oportunidade de estar tendo mais uma conquista profissional e pessoal.

Aos meus pais e minha irmã pelo apoio incondicional, não medindo esforços para a concretização deste objetivo; apoiando-me de todas as maneiras, sendo com a preocupação na minha alimentação ou mesmo nas inúmeras caronas de carro à noite no Fundão; além da constante “paparicação” que eu adoro! Amo vocês!

Ao meu namorado Daniel (Dan), por todo suporte visual da tese quanto pelo suporte emocional, demonstrado em suas diárias perguntas: “E o experimento, deu certo?”; mesmo não entendendo nem um pouco de sinalização celular, mas mesmo assim demonstrando-se sempre interessado por cada protocolo novo. Meu lindo, obrigada por você ser quem é. Te Amo!

Ao Professor Adalberto Vieyra pela sua gentileza em ter aberto as portas do laboratório para mais um estudante de Educação Física, além de sua sempre disponibilidade em explicar prontamente qualquer dúvida não solucionada por outros.

Ao meu querido orientador Marcelo, que antes de mais nada é um paizão para todos do laboratório (como minha mãe diz)! Tendo eu a sorte de ser orientada por esta pessoa tão gentil, inteligente, amorosa (como diz minha querida Nogaroli), sensata, extrovertida, paciente, e acima de tudo liberal para qualquer criação e intervenção de seus alunos.

Ao Celso, pelos puxões de orelha, e pela oportunidade de ter estado ao seu lado no laboratório compartilhando meus momentos.

A Luciana Nogaroli, que me acolheu e me introduziu no caminho dos lipídios, sendo antes de mais nada uma amiga e cientista fabulosa!

Ao Giovane, sendo o primeiro a dar a ótima impressão do laboratório, além de companheiro de profissão e amigo.

Aos meus queridos Thiago e Paulo André pelos abraços diários e disponibilidade incontestável.

A Lucienne, Jennifer, Gustavo, Rafael, Flávia pela prontidão em ajudar e somar no singular clima que é o nosso laboratório.

A Mira, que muito me ajudou no crescimento profissional a cada discussão de protocolo e resultados.

Aos meus queridos alunos de iniciação científica que estiverem e que estão comigo: Pedrão (Pedro), Alexandre, Fernando (Fê), Nathalie e Gabriela.

A todos os alunos de iniciação científica que já passaram e os que ainda estão no laboratório, tornando meus dias de grande crescimento pessoal.

RESUMO

Os túbulos proximais renais, estão envolvidos em ~ 70% do processo de reabsorção de fluidos nos rins, sendo este, portanto um segmento fundamental do néfron. A enzima responsável pela regulação do ajuste fino dos níveis intracelulares de Ca^{2+} , a Ca^{2+} -ATPase, se encontra nas membranas basolaterais dos túbulos proximais renais. No presente trabalho, foi mostrado que concentrações nanomolares ($\text{pA } \frac{1}{2} = 8.5$) de Ceramida, dobraram a atividade da Ca^{2+} -ATPase de membranas basolaterais purificadas; não havendo modulação da enzima pelo produto fosforilado da Ceramida, a Ceramida-1-fosfato. O efeito estimulatório da Ceramida ocorre via ativação de PKA, já que foi inibida por 10^{-8} M do inibidor específico de PKA, peptídeo 5-22. A ativação de PKA por Ceramida resulta na fosforilação da Ca^{2+} -ATPase, como detectada pelo anticorpo específico que reconhece o substrato fosforilado por PKA nos resíduos de Ser/Thr. O potente efeito de Ceramida revela um novo ativador fisiológico da Ca^{2+} -ATPase de membrana plasmática, o qual se integra na rede regulatória dos esfingolípídeos presentes na membrana basolateral das células renais.

ABSTRACT

The kidney proximal tubules are involved in ~ 70% of reabsorption process in the kidney, being a key nephron segment. The basolateral membranes from kidney proximal tubules have a Ca^{2+} -ATPase considered to be responsible for the fine tune regulation of intracellular Ca^{2+} levels. In the present work, we show that nanomolar concentrations ($\text{pA } \frac{1}{2} = 8.5$) of Ceramide double Ca^{2+} -ATPase activity in purified basolateral membranes, but the phosphorylated derivative of Ceramide, Ceramide-1-phosphate, have no modulatory action on the Ca^{2+} -ATPase. The stimulatory effect of Ceramide occurs through PKA activation (blocked by 10^{-8} M of the specific inhibitor of PKA, the 5-22 peptide). The activation of PKA by Ceramide results in phosphorylation of the Ca^{2+} -ATPase, as detected by an anti-Ser/Thr specific PKA substrate antibody. The potent effect of Ceramide reveals a new physiological activator of the plasma membrane Ca^{2+} -ATPase, which integrates the regulatory network of sphingolipids present in the basolateral membranes of kidney cells.

ABREVIATURAS

AMPC: adenosina 3',5' monofosfato cíclico

ATP: adenosina 5'-trifosfato

[γ - ^{32}P]ATP : Adenosina trifosfato marcada com ^{32}P na fosforila γ -terminal

Bis-Tris Propano : 1,3-bis[tris(hidroximetil)-metilamino]propano

Cer: Ceramida

CerK: Ceramida cinase

C1P: Ceramida-1-fosfato

CHCl_3 : Clorofórmio

CH_3OH : Metanol

Cph: Calfostina C

DMSO: Dimetil sulfóxido

EDTA: ácido etileno dinitrito tetraacético

EGTA: Ácido etilenoglicol-bis(amino etil éter)-N, N'tetraacético

Hepes: Ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'(2-etano sulfônico)

IP_3 : Inositol (1,4,5) trifosfato

MBL: Membrana basolateral

$\text{Mg} \cdot \text{ATP}^{2-}$: Complexo do Mg^{2+} com o ATP^{4-}

Pi: Fosfato inorgânico

PKA: Proteína cinase A

PKAi: Peptídeo inibidor (5-22) de proteína cinase A

PKC: Proteína cinase C

PLC: Fosfolipase C

PMA: Forbol-12-miristato-13-acetato

PMSF: Fluoreto de fenil-metil-sulfonila

PtdIns: Fosfatidilinositol

SM: Esfingomielina

SMase: Esfingomielinase

Sph: Esfingosina

Tris: Tris(hidroximetil)aminometano

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO.....	1
1.1- A importância dos rins.....	1
1.2- O cálcio como sinalizador intracelular	8
1.3- As Ca^{2+} -ATPases e a manutenção dos níveis basais de Ca^{2+} intracelular ..	9
1.4- Fosfolipídeos e esfingolipídeos de membrana	13
2- OBJETIVO	23
3- MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1- Materiais	24
3.2- Isolamento de MBL	24
3.3- Preparação de $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$	26
3.4- Medida da atividade da Ca^{2+} -ATPase de membrana plasmática	26
3.5- Cálculo das concentrações do complexo $\text{Mg}.\text{ATP}^{2-}$ e das espécies livres de Mg^{2+} , Ca^{2+} e ATP	27
3.6- Medida da atividade de proteína cinase C (PKC)	27
3.7- Medida da atividade de proteína cinase A (PKA)	28
3.8- SDS-PAGE e imunodeteção	29
3.9- Fosforilação da Ca^{2+} -ATPase de membrana plasmática	29
3.10- Análise estatística	30
4- RESULTADOS E DICUSSÃO	31
5- CONCLUSÃO	46
6- PERSPECTIVAS FUTURAS E RESULTADOS PRÉVIOS	50

7- REFERÊNCIAS 55

8- ARTIGO SUBMETIDO 66

1 INTRODUÇÃO

1.1 A importância dos rins

Uma das condições fundamentais para a sobrevivência de um organismo é a capacidade de manter a composição de seus compartimentos líquidos, composição essa que deve ser mantida sob um controle muito eficiente, garantindo assim a homeostasia corporal. O controle observado para a água e praticamente todos os íons do corpo, que seria o equilíbrio entre o aporte (proveniente da ingestão ou da produção metabólica) e a eliminação (decorrente da excreção ou do consumo metabólico), é mantido em grande parte pelos rins. Essa função reguladora dos rins mantém estável a homeostasia do organismo, fator necessário ao desempenho das diversas atividades celulares. Assim, os rins eliminam as substâncias indesejáveis ou que estejam em excesso através da urina, enquanto devolvem ao sangue as substâncias ainda úteis; tudo isso graças às suas múltiplas funções como, por exemplo, excreção de produtos de degradação do metabolismo e de substâncias químicas estranhas, regulação do volume de água do organismo, controle do balanço eletrolítico, regulação do equilíbrio ácido-básico, conservação de nutrientes, participação na regulação do metabolismo ósseo de cálcio e fósforo, regulação da pressão arterial, etc. (FÉRAILLE & DOUCET, 2001).

Quase todo o sangue (90 %) que entra nos rins pelas artérias renais, flui para os glomérulos e, posteriormente atinge os capilares peritubulares, perfundindo as estruturas tubulares. Dos 600 ml de plasma que chegam aos rins por minuto, somente 120 ml (20 %) são filtrados nos glomérulos, sendo que 99% desse volume retornam à circulação peritubular. Dessa forma, apenas 1 a 2 ml de urina são formados por minuto . Cerca de 180 litros de plasma sangüíneo são filtrados diariamente pelos rins e, deste

volume total, menos de 3,6 mL (2 %) são eliminados na forma de urina (FÉRAILLE & DOUCET, 2001).

Os rins são formados por milhares de néfrons que são as suas unidades funcionais. Esses néfrons são formados pelo corpúsculo renal seguido de um sistema tubular no qual ocorre o processamento do fluido filtrado (MELLO-AIRES, 1999); sendo dividido didaticamente em cinco segmentos: glomérulo; túbulo proximal; alça de Henle; túbulo distal; ducto coletor (Fig. 1).

O corpúsculo renal é constituído pelo glomérulo, formado por uma rede de capilares, e pela cápsula de Bowman, estrutura epitelial em forma de cálice que envolve o glomérulo e recebe o plasma recém filtrado. A cápsula de Bowman é formada por duas camadas: o folheto visceral, em contato direto com o glomérulo, e o folheto parietal contíguo ao sistema tubular que se segue (FÉRAILLE & DOUCET, 2001).

O túbulo proximal possui epitélio cúbico com a membrana luminal do tipo “borda em escova”, sendo esse o sítio onde ocorre a reabsorção de substâncias em maior quantidade. O túbulo proximal é a porção do néfron onde ocorre a maior parte da reabsorção de íons do filtrado glomerular.

As células que compõem o epitélio do túbulo proximal apresentam algumas características específicas, quando comparadas com as de outros órgãos e tecidos, destacando-se a sua polaridade morfológica e funcional. A membrana plasmática destas células apresenta duas regiões bem caracterizadas: uma porção apical (voltada para o lúmen tubular) e outra porção basolateral. A membrana apical apresenta um grande número de vilosidades capazes de aumentar a superfície de absorção. Nesta

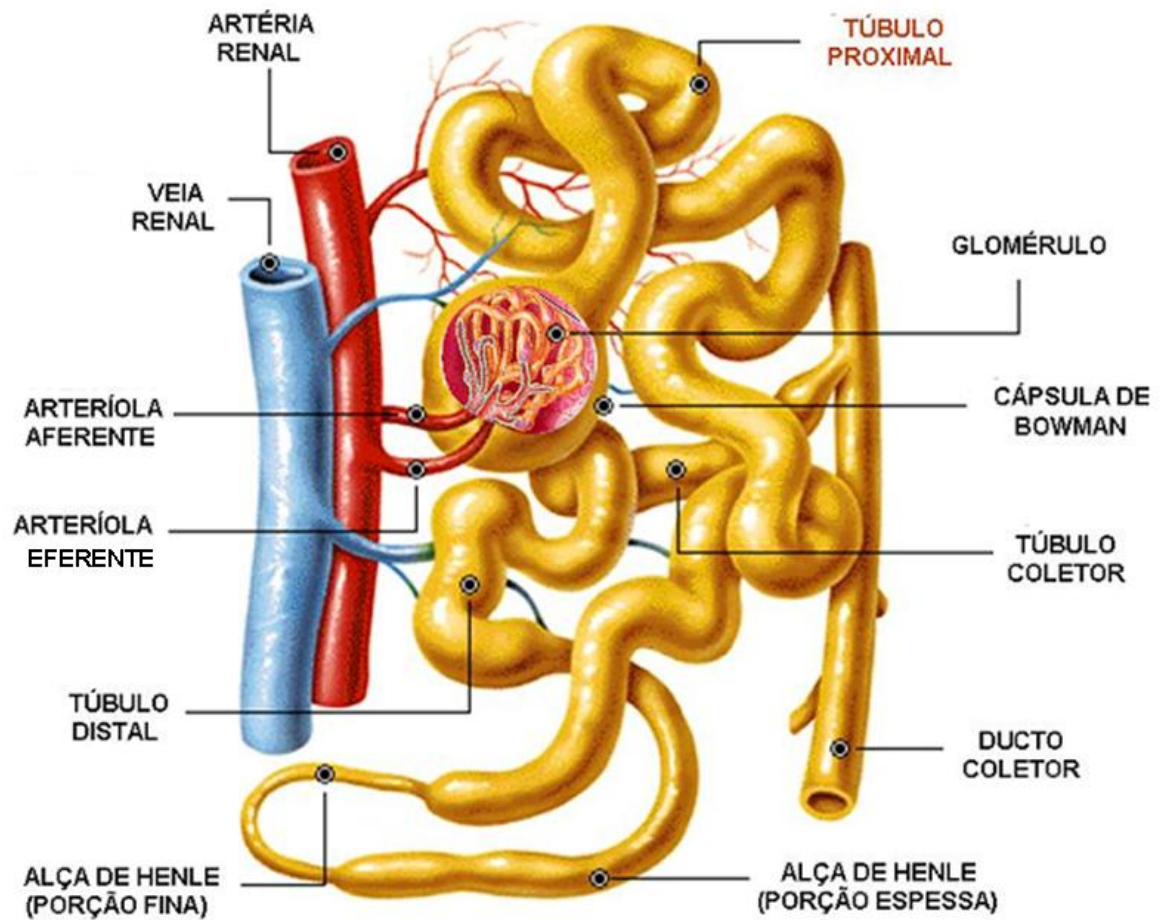


Figura 1: Segmentos de um néfron cortical (unidade funcional do rim).

O glomérulo é o local de filtração do plasma. A porção do néfron que circunda o glomérulo é a cápsula da Bowman. A partir da cápsula de Bowman, o líquido tubular passa pelo túbulo proximal, pela alça de Henle, pelo túbulo distal e pelo ducto coletor (retirado do <http://www.edumed.org.br>).

face da célula residem ectoenzimas, canais e sistemas transportadores específicos, muitos dos quais utilizam o gradiente de Na^+ como força acoplada aos fenômenos de fluxo. A membrana basolateral (MBL) é a região da célula em contato com o interstício, contém canais e outros sistemas de transporte como, por exemplo, a $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) \text{ATPase}$, a $\text{Ca}^{2+} \text{-ATPase}$ e a segunda bomba de Na^+ ou $\text{Na}^+ \text{-ATPase}$, além de uma grande variedade de receptores para diferentes hormônios e autacóides (CARUSO-NEVES, 2000; ASSUNÇÃO-MIRANDA, 2005; LARA, 2005) (Fig. 2). A ativação desses receptores leva à produção de mensageiros secundários capazes de desencadear modificações funcionais específicas no metabolismo celular, regulando o fluxo iônico através das duas membranas (apical e basolateral) e do epitélio como um todo (APERIA *et al.*, 1994; VIEYRA, 1996).

Devido à presença de grande variedade de receptores capazes de regular a função renal (APERIA *et al.*, 1994; FÉRAILLE & DOUCET, 2001), a MBL das células epiteliais de túbulos proximais funciona como uma estrutura transdutora de mensagens. Assim, a MBL constitui um interessante modelo para o estudo de moléculas associadas às vias de sinalização, como por exemplo, receptores, proteínas G triméricas, fosfolipases, proteínas cinases, proteínas fosfatases e lipídeos sinalizadores (CARUSO-NEVES *et al.*, 2000; RANGEL *et al.*, 2002; EINICKER-LAMAS *et al.*, 2003; NOGAROLI *et al.*, 2005; CABRAL *et al.*, 2006).

Os mecanismos de reabsorção transcelular de solutos no rim dependem principalmente do gradiente renal de Na^+ . A $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) \text{ATPase}$ transporta 3 Na^+ para fora da célula e 2 K^+ para dentro (utilizando a energia proveniente da hidrólise de ATP), portanto contra o gradiente de concentração de Na^+ e K^+ , mantendo os níveis de Na^+

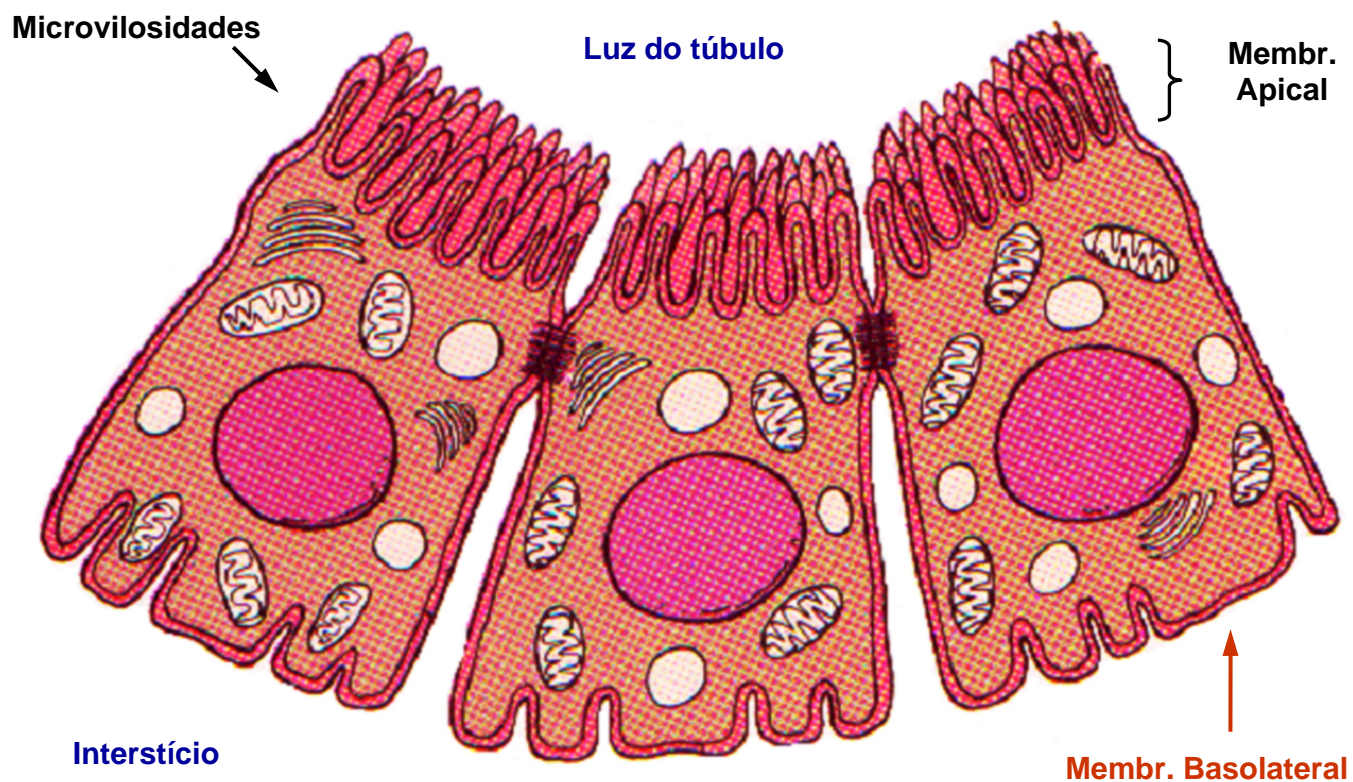


Figura 2: Morfologia das células do túbulo proximal renal.

As células do túbulo proximal renal são ditas polarizadas por apresentarem diferenças morfológicas entre duas porções bem distintas (com a presença de microvilosidades na face apical da célula e ausência delas na face basolateral) (retirado de SCHAUF et al., 1993).

baixos dentro da célula epitelial, e garantindo, assim, a energia do gradiente de Na^+ através da membrana apical, que será usada para o transporte de Na^+ e outros solutos através de co-transportadores.

Os co-transportadores que não utilizam a energia proveniente diretamente da hidrólise do ATP são denominados transportadores ativos secundários. Esse transporte é dependente de um gradiente iônico gerado por um transportador ativo primário (utiliza a energia proveniente da hidrólise de ATP). A reabsorção de glicose e de aminoácidos são exemplos clássicos de transportes ativos pela membrana luminal. A diminuição da concentração de Na^+ no meio intracelular, garantida pela $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$, favorece a entrada deste íon na célula. No entanto, o Na^+ só pode ser transportado pela membrana se acoplado a esse transporte houver o transporte de glicose (ou aminoácido): 2 molécula de sódio e uma molécula de glicose (ou aminoácido). No caso do co-transporte $\text{Na}^+/\text{glicose}$, a glicose acumulada dentro da célula é transportada para o interstício por difusão facilitada através de proteínas carreadoras (Figura 3).

Pode-se concluir então, que a presença de transportadores diferentes nas membranas basolateral e luminal é o fator que direciona o movimento do soluto, da luz tubular para o interstício, acarretando a sua reabsorção.

De todos os sistemas de transporte presentes nas células epiteliais renais, iremos focalizar nosso estudo sobre a $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$ de membrana plasmática, já que esta é responsável pelo ajuste fino das concentrações intracelulares de Ca^{2+} , responsável assim pela homeostasia intracelular deste íon.

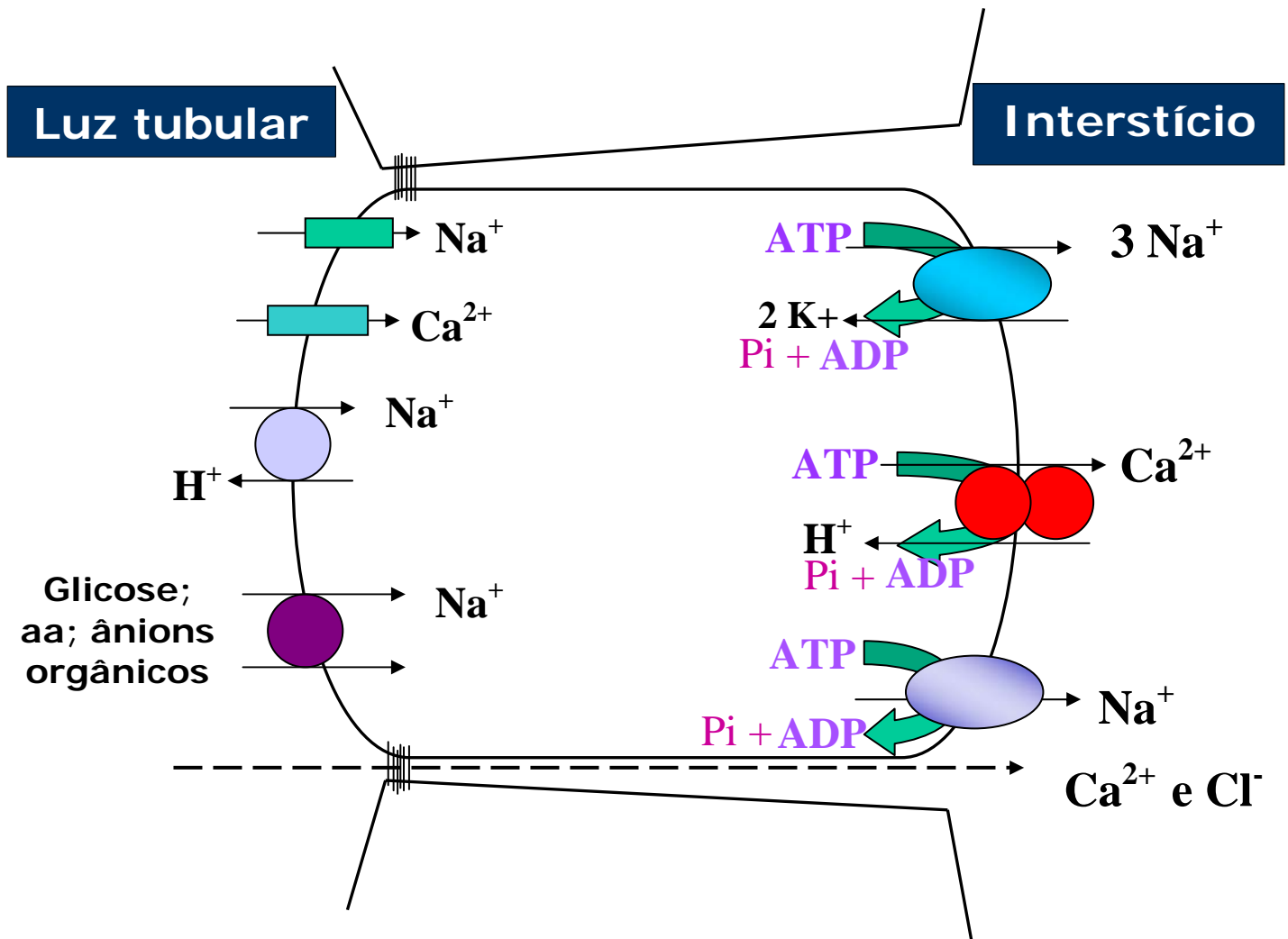


Figura 3: Diferença funcional das membranas apical e basolateral, evidenciando os principais mecanismos de transporte.

A face apical (voltada para a luz do túbulo), apresenta transportadores ativos secundários, que utilizam a energia do íon co-transportado com ele. Já na face basolateral, há a presença de transportadores ativos primários, que utilizam a energia proveniente da hidrólise de ATP para transportar o íon contra seu gradiente eletroquímico.

1.2 O cálcio como sinalizador intracelular

A célula está constantemente exposta a diversos estímulos provenientes do meio extracelular, tais como hormônios, autacóides, íons, estresse mecânico, etc. A forma como a célula interpreta e responde a esses estímulos envolve uma, ou várias, vias de sinalização.

Dentre as diversas moléculas e íons envolvidos em vias de sinalização celular, sem dúvida o íon Ca^{2+} é um dos mais importantes personagens da vida e da morte celular (CARAFOLI, 2002). O íon Ca^{2+} participa de um grande número de processos celulares, como proliferação, movimento celular, secreção de substâncias e diferenciação, sendo todos estes processos desencadeados por um aumento transitório das concentrações de Ca^{2+} citossólico e nuclear (NOWYCKY & THOMAS, 2002). Talvez, o aspecto mais interessante seja como o Ca^{2+} está envolvido em tantas vias celulares diferentes, e como a célula controla apuradamente sua concentração intracelular.

Dentre as proteínas que têm suas atividades moduladas por Ca^{2+} estão aquelas que possuem domínios de ligação ao íon, conhecidas como mãos EF. As proteínas com domínios mãos EF são muito mais que simples quelantes de Ca^{2+} pois desempenham papéis importantes nas respostas celulares a variações na concentração intracelular de Ca^{2+} (MEANS, 2000; CARAFOLI, 2002).

De todas as proteínas ligadoras de Ca^{2+} , a mais conhecida é a calmodulina (CaM). A CaM apresenta um par de domínios mãos EF em cada extremidade, com afinidade de aproximadamente 1 μM . Quando os níveis citossólicos de Ca^{2+} aumentam, este se liga aos domínios mãos EF, fazendo com que a proteína sofra uma mudança conformacional, tornando-se ativa e capaz de se ligar a proteínas que possuem

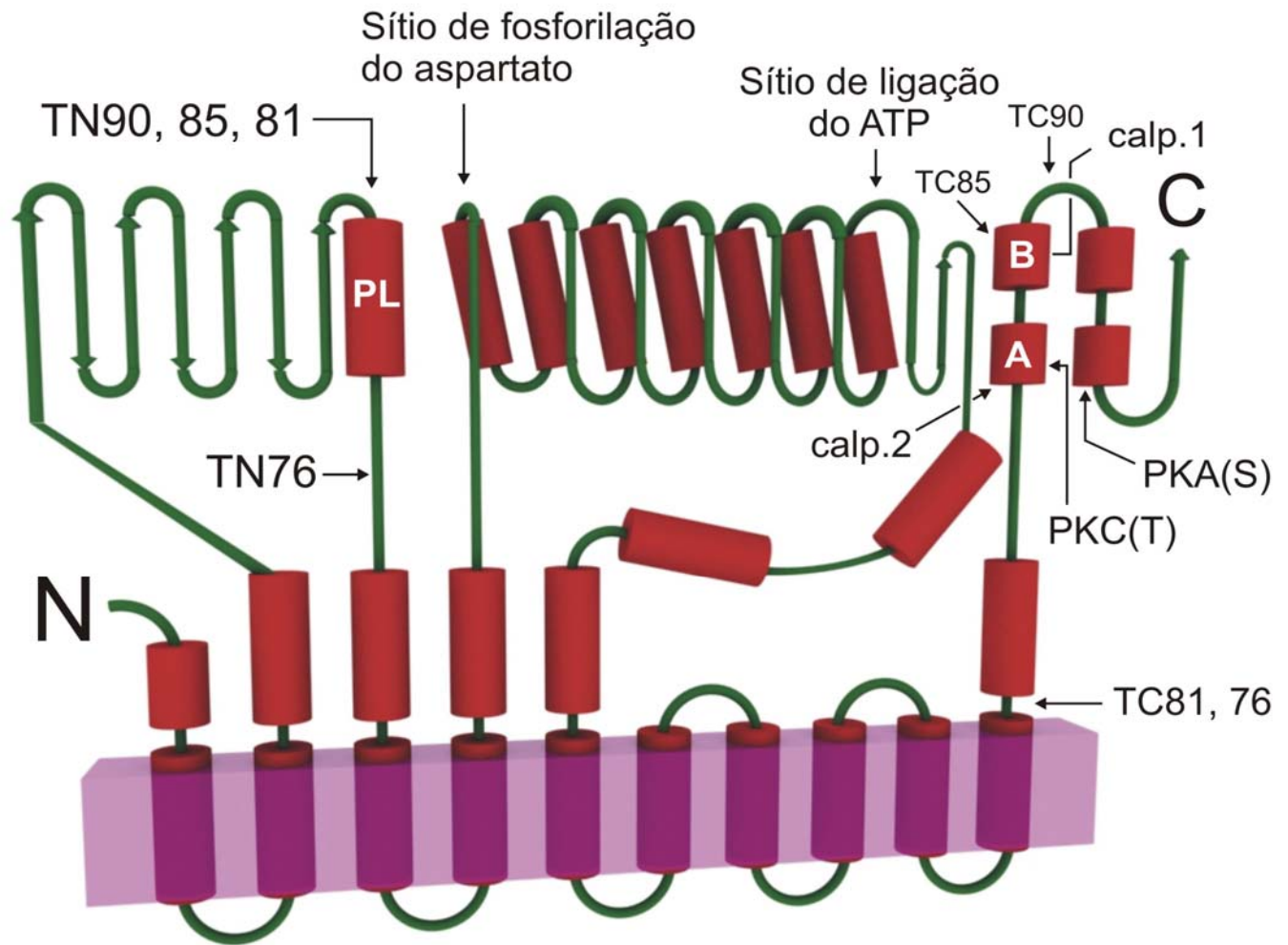
domínios de ligação para o complexo Ca^{2+} /calmodulina, como a Ca^{2+} -ATPase de membrana plasmática, CaM cinase, dentre outras (MEANS, 2000; NOWYCKY & THOMAS, 2002).

Diante da importância do Ca^{2+} para a homeostasia celular, é possível entender como é importante para a célula, controlar de forma extremamente precisa variações nas concentrações intracelulares deste íon. Exemplos de respostas celulares ao aumento das concentrações intracelulares do Ca^{2+} , são a ativação de duas famílias da PKC, a clássica ($\text{PKC}\alpha$, $\text{PKC}\beta$, $\text{PKC}\gamma$) e a novel ($\text{PKC}\delta$, $\text{PKC}\epsilon$, $\text{PKC}\eta$, $\text{PKC}\theta$), que possuem domínios C2 de ligação ao Ca^{2+} . (PARKER & MURRAY-RUST, 2004). A ativação destas cinases leva a respostas celulares variadas, como modulação de ATPases, proliferação, diferenciação, apoptose, dentre outras (ALBERTS *et al.*, 2002).

1.3 As Ca^{2+} -ATPases e a manutenção dos níveis basais de Ca^{2+} intracelular

O retorno aos níveis intracelulares basais de Ca^{2+} , aumentados em resposta a algum estímulo, deve ser extremamente rápido e acurado de forma que este Ca^{2+} intracelular em alta concentração não desencadeie processos deletérios à célula, e que a homeostasia celular do Ca^{2+} seja restabelecida. Para tanto, ou a célula bombeará o Ca^{2+} para o interior de organelas, como o retículo sarco(endo)plasmático, através da Ca^{2+} -ATPase de retículo sarco(endo)plasmático (SERCA), ou ativará mecanismos de extrusão de Ca^{2+} presentes na membrana plasmática, como a Ca^{2+} -ATPase de membrana plasmática (Fig. 4), ou ainda o trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ que utiliza o gradiente eletroquímico de Na^+ criado pela $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{ATPase}$, para a extrusão de Ca^{2+} (WHITE *et al.*, 1997; CARAFOLI, 2001; STREHLER & ZACHARIAS, 2001).

Meio intracelular



Meio extracelular

Figura 4. Esquema da estrutura da Ca^{2+} -ATPase de membrana plasmática e localização de seus principais sítios.

A e B são os dois domínios de ligação da calmodulina. A PKA (S) é a serina fosforilada por PKA, e PKC (T) é a treonina fosforilada por PKC. Calp 1 e 2, são os dois sítios de clivagem pela calpaína. TN e TC referem-se às terminações NH_2 - e COOH - dos fragmentos com peso molecular de 90, 85, 81 e 76 kDa produzidos pela tripsina. PL identifica o sítio responsivo aos fosfolipídeos (adaptado do Carafoli *et al.*, 1992).

É sabido que a SERCA participa do transporte em massa do Ca^{2+} , enquanto a Ca^{2+} -ATPase de membrana plasmática faz o ajuste fino das concentrações intracelulares do mesmo, sendo esta a nossa enzima de interesse. Tanto a Ca^{2+} -ATPase de membrana plasmática quanto a SERCA, são ATPases transportadoras de Ca^{2+} , enquadrando-se na categoria das P-ATPases (Fig. 5), que são transportadores ativos primários (por usarem energia da hidrólise de ATP).

As P-ATPases constituem uma importante família de enzimas, tanto de origem eucariótica quanto procariótica, que estão, em sua maioria, envolvidas com o transporte ativo de cátions através de membranas biológicas (MULLER *et al.*, 1995). A denominação de P-ATPases deve-se à formação de um intermediário fosforilado, do tipo acil-fosfato, durante seu ciclo catalítico. Possuindo uma arquitetura de dez segmentos transmembrana. A Ca^{2+} -ATPase de membrana plasmática é uma P-ATPase do tipo IIB, com um peso molecular de ~140 kDa (STREHLER & ZACHARIAS, 2001), com capacidade de bombear o íon Ca^{2+} para o meio extracelular (CARAFOLI, 1987) e sensível ao vanadato, um conhecido inibidor de todas as P-ATPases (CARAFOLI, 1991; STREHLER & ZACHARIAS, 2001).

Embora a Ca^{2+} -ATPase de membrana plasmática tenha uma distribuição extremamente ampla nas células eucarióticas, em algumas células, como as de túbulo proximal renal, a Ca^{2+} -ATPase de membrana plasmática encontra-se polarizada em uma porção distinta da membrana, a face basolateral, com a função de fazer o ajuste fino dos níveis intracelulares deste íon, o que se reflete diretamente na fisiologia celular, pois a maioria dos processos celulares é dependente de Ca^{2+} (VIEYRA *et al.*, 1986; CARAFOLI *et al.*, 1987).

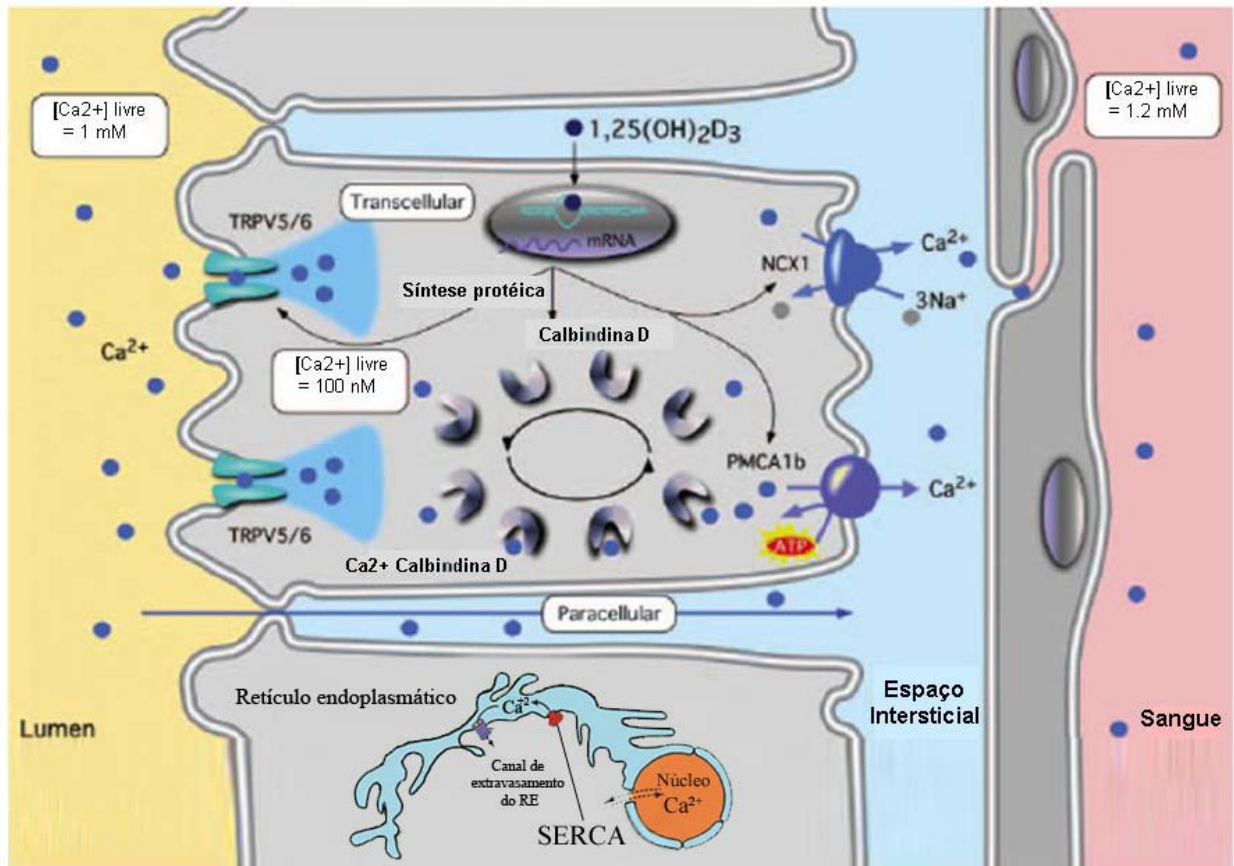


Figura 5. Mecanismos de transporte de Ca^{2+} no epitélio renal.

O íon Ca^{2+} pode ser absorvido pelo transporte paracelular e transcelular. Os transportes passivo e paracelular de Ca^{2+} são dirigidos pelo seu gradiente eletroquímico, que está representado pela seta azul, e que é responsável pela maior taxa de reabsorção de Ca^{2+} . Também há a entrada de Ca^{2+} através dos canais de Ca^{2+} (hetero)tetraméricos, TRPV5 e TRPV6. O Ca^{2+} , em altas concentrações no citosol, é bombeado para dentro do retículo sarco(endo)plasmático através da SERCA. No lado basolateral, o Ca^{2+} é bombeado via Ca^{2+} -ATPase de membrana (PMCA 1b) e, também, transportado pelo trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX1) (adaptado do <http://www.biochemj.org>).

1.4 Fosfolipídeos e esfingolipídeos de membrana

Dentre os constituintes das membranas biológicas, destacam-se os lipídeos. Estes lipídeos apresentam diferentes propriedades, estando divididos em diversas classes, de acordo com sua estrutura química, essencialmente derivada de um esqueleto hidrocarbônico.

Os ácidos graxos podem combinar-se com o glicerol para a formação de uma classe de compostos denominados acilgliceróis ou glicerídios. A reação faz-se por esterificação de uma ou mais hidroxilas, originando moléculas conhecidas como monoglicerídio, diglicerídio e triglicerídio. Esta última classe de compostos é a forma mais comum de armazenagem de gorduras.

Os lipídeos de membrana mais abundantes são os fosfolipídeos. Estes têm um grupamento polar numa extremidade (cabeça polar) e duas caudas de hidrocarboneto de característica hidrofóbica. As caudas são normalmente ácidos graxos, que podem apresentar diferentes comprimentos (eles normalmente contêm entre 14 a 24 átomos de carbono). Uma cauda possui, de modo geral, uma ou mais ligações duplas em cis (isto é, é insaturado), enquanto a outra cauda não (isto é, é saturado) (Fig 6).

A importância dos lipídeos para os organismos uni e pluricelulares não está apenas associada à manutenção da estrutura das membranas celulares ou ao armazenamento de energia, mas também participam de eventos de sinalização celular extremamente importantes, como a geração de segundos mensageiros como o DAG e o IP₃, por exemplo (Fig. 7) (NISHIZUKA, 1992; BERRIDGE & IRVINE, 1984). Um dos primeiros trabalhos que descreve o papel sinalizador dos lipídeos foi publicado em 1953 pelo casal HOKIN.

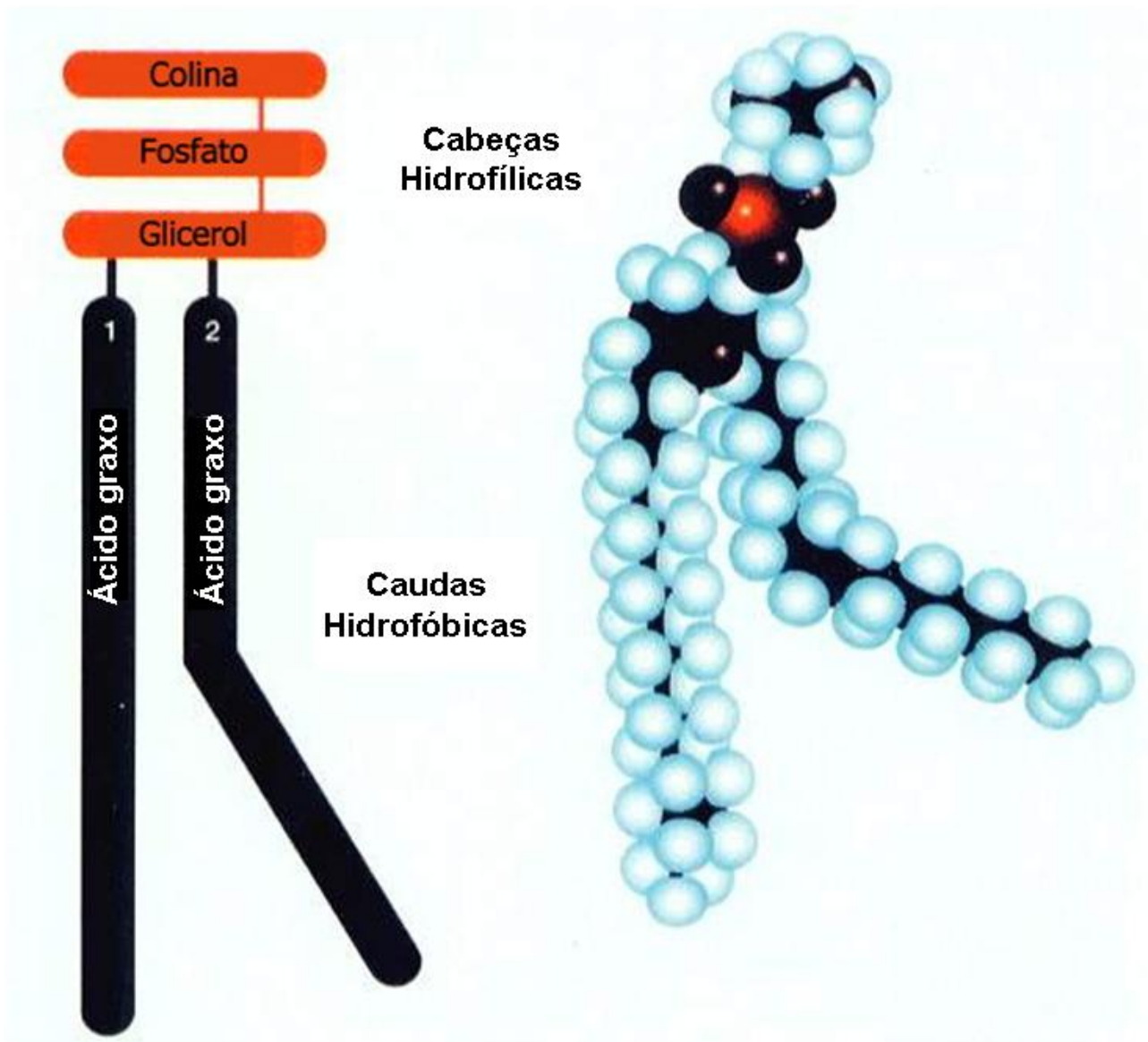


Figura 6. Estrutura de um fosfolípido.

Os fosfolípídeos são os componentes principais das membranas biológicas. As suas cabeças polares se constituem de um grupo fosfato esterificado à cabeça alcoólica (em vermelho), além de possuir duas caudas hidrofóbicas compostas por ácidos graxos (adaptado de [http:// www.biologia.arizona.edu](http://www.biologia.arizona.edu)).

Embora os fosfolipídeos derivados do glicerol sejam os lipídeos mais comumente encontrados tanto em membranas celulares vegetais quanto animais, existe uma outra classe de lipídeos que corresponde aos esfingolipídeos, cujo representante mais conhecido é a esfingomielina (SM), abundante em células do sistema nervoso central de mamíferos (SHAYMAN, 2000). Os esfingolipídeos são, por definição, componentes que contêm uma base esfingóide, ou seja, uma longa cadeia de amino álcool com a esterificação de um ácido graxo no carbono C-1, sendo esta a estrutura de uma esfingosina (Sph) (componente mais simples dos fosfolipídeos). Com a ligação de um ácido graxo no carbono C-2 do amino álcool, há a formação da Ceramida (Cer). A SM possui como estrutura básica a Cer, tendo no carbono C-3 a ligação de um grupamento fosfato e de uma colina (Fig. 8).

Da mesma forma que os fosfolipídeos, os esfingolipídeos apresentam enorme interesse do ponto de vista fisiológico por não serem apenas componentes estruturais das membranas, mas por também atuarem em importantes sistemas de sinalização celular envolvidos em diferentes respostas celulares (HOLTHUIS *et al.*, 2001; COLOMBAIONI & GARCIA-GIL, 2004).

Atualmente, os esfingolipídeos constituem uma classe de mediadores de interesse crescente, classe esta que inclui Cer e seu derivado fosforilado, a Ceramida-1-fosfato (C1P), moléculas estas relacionadas a diferentes respostas através da ativação de diferentes cascatas celulares, nos mais diversos tipos celulares (ZHANG *et al.*, 1991; KOLESNICK & GOLDE, 1994; SPIEGEL & MERRILL JR., 1996; MEYER ZU HERINGDORF *et al.*, 1997; GOMEZ-MUÑOZ, 2004).

As duas principais vias de formação de Cer são: a quebra de uma SM por uma esfingomielinase (SMase), tendo como produto a Cer; e também a síntese *de novo*

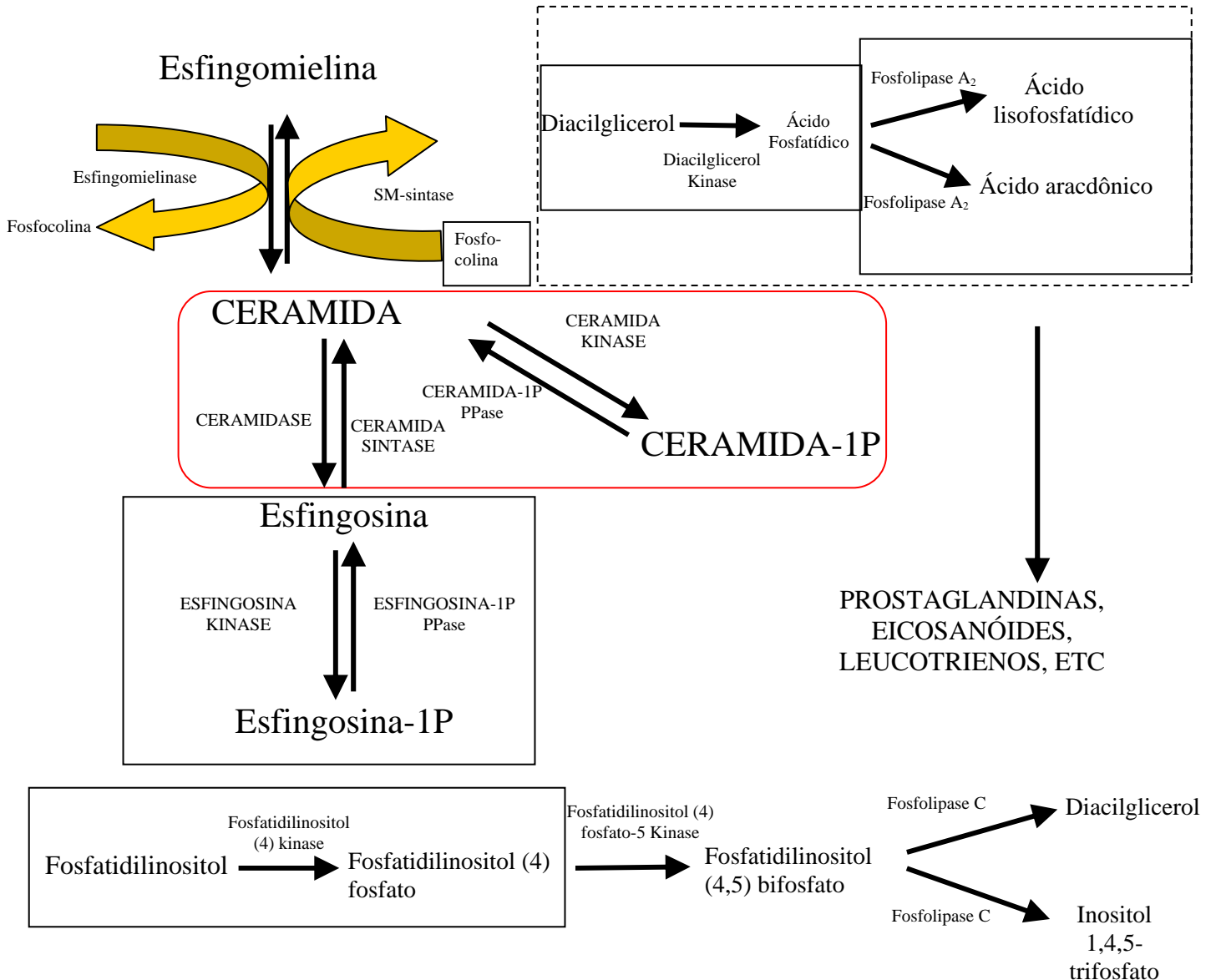


Figura 7. Via de sinalização de esfingolípídeos.

A importância dos lipídeos para os organismos uni e pluricelulares não está apenas associada à manutenção da estrutura das membranas celulares ou ao armazenamento de energia, mas também à transdução de sinais intracelulares em resposta a vários estímulos extracelulares. Na figura encontra-se em destaque, a parte que compreende a Ceramida e seu derivado fosforilado Ceramida-1-fosfato, ponto desta rede regulatória presente na MBL, de nosso interesse neste trabalho (Esquema original).

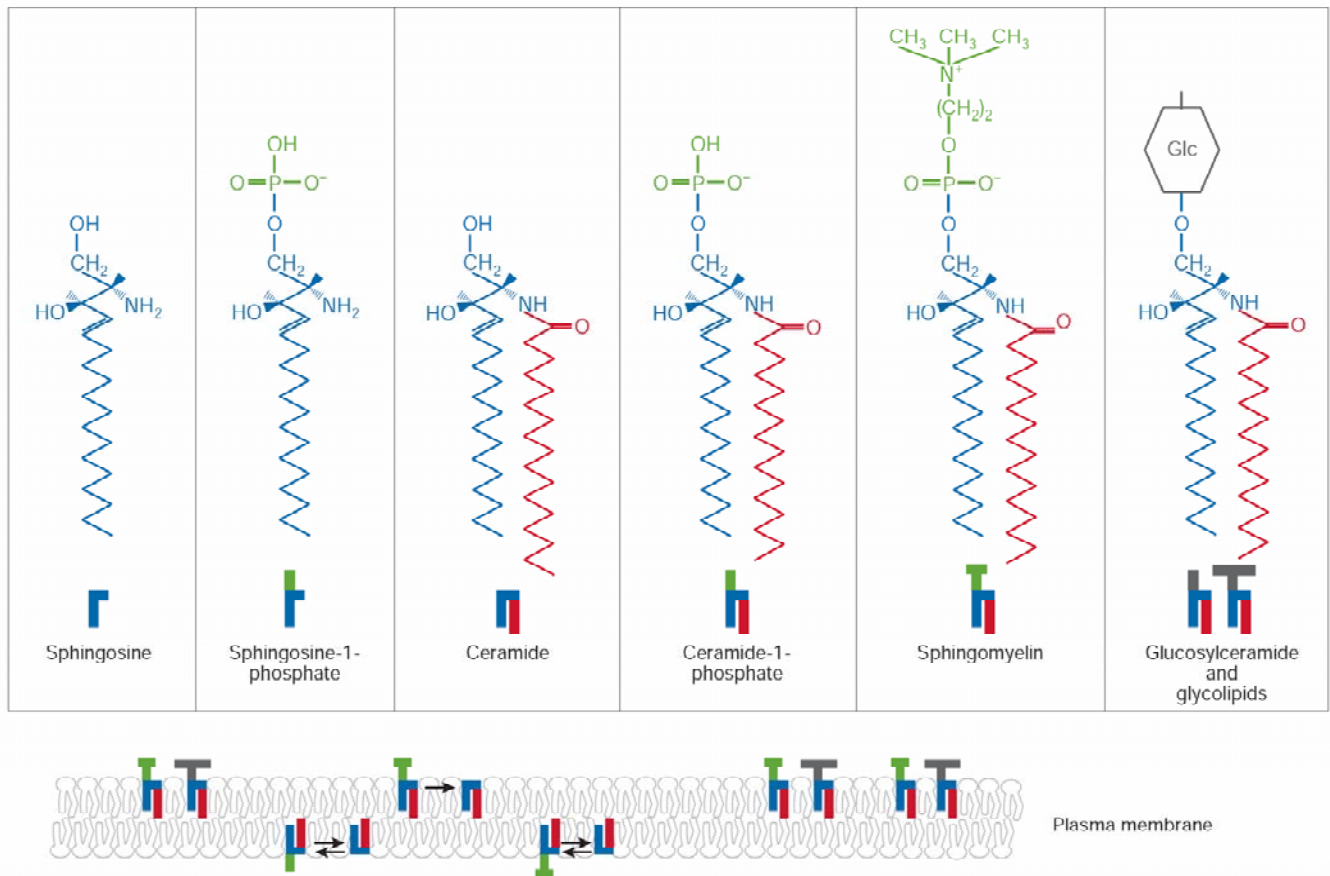


Figura 8. Esfingolípídeos.

Os esfingolípídeos possuem uma base esfingóide, e com a ligação de um ácido graxo no carbono C-2, há a formação de Ceramida, sendo seu produto fosforilado, a Ceramida-1-fosfato, com a ligação de um grupamento fosfato no carbono C-3. A Esfingomielina possui como estrutura básica a Ceramida mais a ligação de um grupamento fosfato e de uma colina (retirado do FUTERMAN & HANNUN, 2004).

dependente da Cer sintase que converte Sph em Cer (KOLESNICK & KRÖNKE, 1998).

A síntese de Cer ocorre no retículo endoplasmático. Sua natureza hidrofóbica evita sua transferência espontânea através do citossol (VENKATARAMAN & FUTERMAN, 2000). A transferência da Cer do retículo endoplasmático para o Golgi, ocorre tanto por transporte em vesículas, quanto por transporte independente de vesículas (FUKASAWA & HANADA, 1999). O transporte independente de vesículas, é feito pela proteína CERT (do inglês “ceramide transfer protein”), que transporta a Cer das membranas (HANADA *et al.*, 2003).

Há mais de 10 anos atrás, foi sugerido que Cer poderia ser fosforilada por uma Ceramida cinase (CerK), resultando em outro esfingolípídeo bioativo, a C1P, com funções diferenciadas dependendo do tipo celular em questão, incluindo modulação de Fosfolipase A₂ (PETTUS *et al.*, 2004) e canais iônicos (TÖRNQUIST *et al.*, 2004; SZABÒ *et al.*, 2004). A CerK humana só foi clonada recentemente (SUGIURA *et al.*, 2002), o que pode explicar a pouca literatura sobre a ativação desta enzima e, conseqüentemente, ação da C1P. Receptores para Cer e C1P, não foram ainda detectados.

É bastante conhecido o papel das ceramidas na regulação de importantes funções celulares incluindo proliferação celular, diferenciação, apoptose, inflamação, etc. (KOLESNICK & KRÖNKE, 1998). Toda essa gama de eventos celulares ocorre por ativação ou modulação de diversas proteínas efetoras (Fig 9), incluindo proteínas cinases, fosfatases, e lipídeo cinases (SPIEGEL & MERRILL JR., 1996; MEYER ZU HERINGDORF *et al.*, 1997; GOMEZ-MUÑOZ, 2004).

A C1P é igualmente relacionada a diferentes e importantes eventos celulares (Fig. 10), por exemplo, bloqueia a apoptose, controla a fagocitose, é mediadora de

respostas inflamatórias e é mitogênica (GOMEZ-MUÑOZ, 2004). Desta maneira, a lipídeo cinase CerK modula os níveis de dois importantes lipídeos sinalizadores.

Além de sua ação como molécula sinalizadora, a Cer participa decisivamente da organização de microdomínios regulatórios presentes nas membranas plasmáticas, chamados de rafts, que são enriquecidos em esfingolipídeos e colesterol (SIMONS & IKONEN, 1997). Esses microdomínios lipídicos, têm como funções: o transporte de membranas seletivas e a transmissão de sinais intracelulares (SIMONS & IKONEN, 1997).

A geração de moléculas de Cer leva a mudanças significativas na organização da membrana plasmática com maior formação de pequenos microdomínios ricos em Cer, os quais são capazes de se unir espontaneamente a outros microdomínios, resultando assim nas chamadas plataformas sinalizadoras (HOLOPAINEN *et al.*, 1998; KOLESNICK *et al.*, 2000; NURMINEN *et al.*, 2002). Desta maneira, microdomínios ricos em Cer desempenham a importante função de facilitar e amplificar processos de sinalização via diferentes tipos de receptores celulares, resultando na ativação de uma maquinaria celular que tem como produto final a resposta celular (BOLLINGER *et al.*, 2005).

A SM está predominantemente presente no folheto externo da membrana plasmática, assim como os rafts. É importante destacar que a formação do folheto externo dos rafts lipídicos pode alterar o folheto interno, facilitando assim a coordenação de diferentes estágios requeridos para a transdução de sinais (BOLLINGER *et al.*, 2005).

Um tipo muito conhecido de raft é a cavéola, com papel importante em eventos de sinalização celular (ANDERSON, 1998; RAZANI *et al.*, 2002). As cavéolas

apresentam uma proteína, a caveolina, que está associada à face interna da bicamada lipídica interagindo com o colesterol, levando então a uma invaginação da membrana (ROTHBERG *et al.*, 1992).

Recentemente, nosso grupo demonstrou a presença de cavéolas na MBL e a localização exclusiva da Ca^{2+} -ATPase nestes microdomínios ricos em caveolina (TORTELOTE *et al.*, 2004).

A localização da Ca^{2+} -ATPase de MBL nestes domínios ricos em colesterol e esfingolípídeos, sugere que os esfingolípídeos, incluindo a Cer, poderiam atuar como reguladores da bomba de Ca^{2+} .

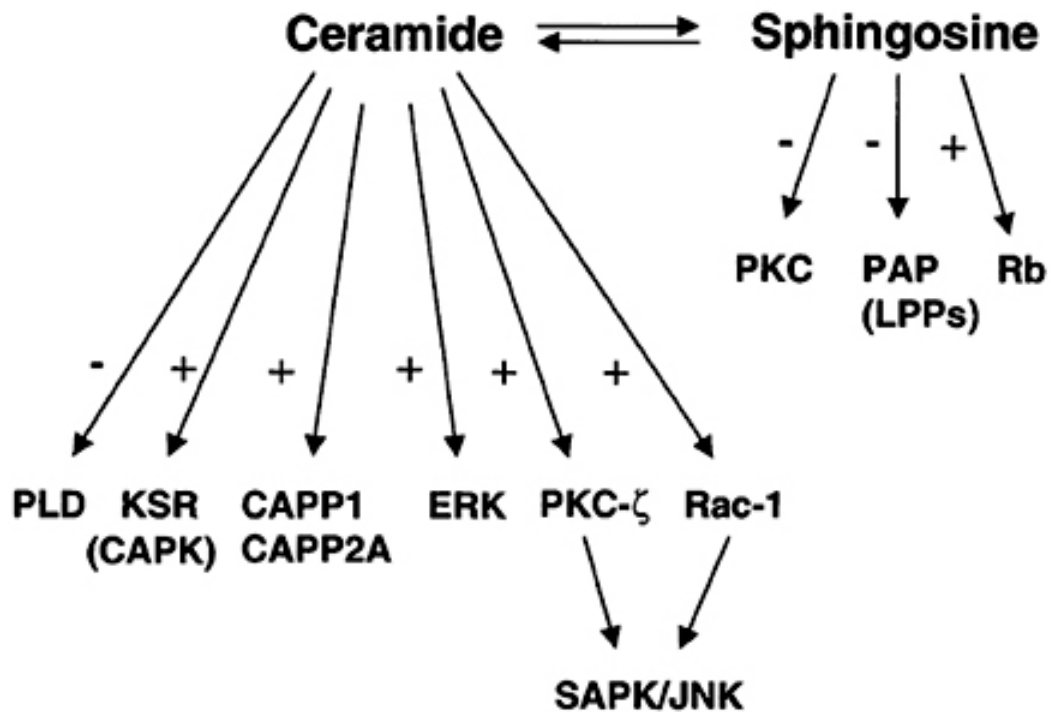


Figura 9. Vias de sinalização ativadas por esfingolípídeos bioativos.

Ceramida e Esfingosina são capazes de modular proteínas efetoras, como lipases, cinases e fosfatases, levando assim a diferentes respostas celulares (retirado de GÓMEZ-MUÑOZ, 2004).

PLD: fosfolipase D

PKC: proteína cinase C

KSR: cinase supressora de Ras

CAPK: cinase dependente de Ca^{2+}

CAPP: fosfatase dependente de Ca^{2+}

ERK: cinase regulada por sinal extracelular

SAPK/JNK: proteína cinase ativada por estresse

Rac: proteína G monomérica

PAP: proteína associada a pancreatite

LPP: lipoproteína

Rb: proteína de retinoblastoma

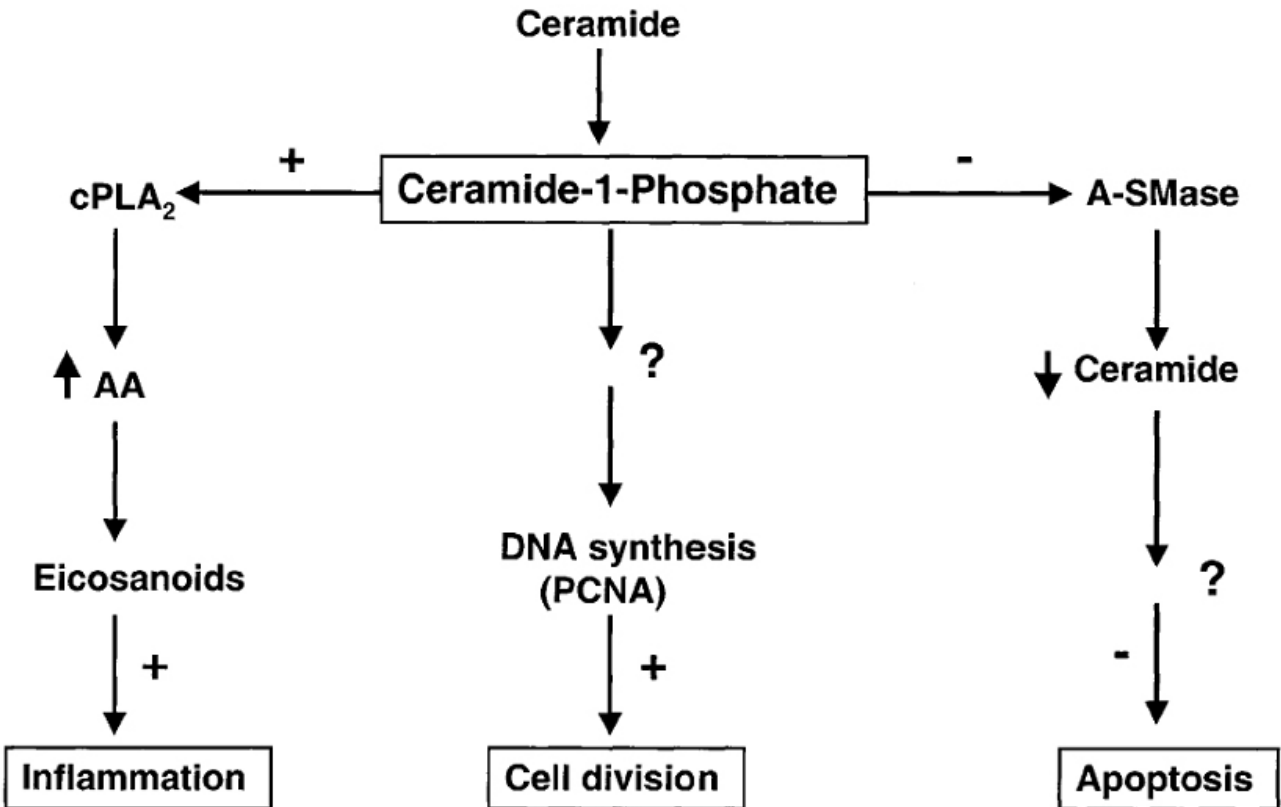


Figura 10. Vias de sinalização ativadas por C1P.

A estimulação da Ceramida kinase resulta na geração da Ceramida-1-fosfato que, por um mecanismo ainda desconhecido, estimula a síntese de DNA e leva à divisão celular. A Ceramida-1-fosfato pode aumentar o número de células, bloqueando a apoptose através da inibição da Esfingomielinase. Além disso, a Ceramida-1-fosfato pode ativar a fosfolipase A₂ e, como resposta final, levar a inflamação (retirado de GÓMEZ-MUÑOZ, 2004).

cPLA₂: fosfolipase A₂

A-SMase: esfingomielinase ácida

AA: ácido aracdônico

2 OBJETIVO

Com base em dados anteriores do nosso laboratório mostrando que a Ca^{2+} -ATPase de membrana plasmática está localizada em microdomínios lipídicos na MBL (TORTELOTE *et al.*, 2004), sendo esses microdomínios ricos em esfingolipídeos como a Cer e a C1P (HOLOPAINEN *et al.*, 1998; KOLESNICK *et al.*, 2000; NURMINEN *et al.*, 2002), decidimos em nosso modelo biológico (membrana basolateral de túbulos proximais renais):

1. Investigar a ação de Cer e seu derivado fosforilado (C1P) sobre a atividade da Ca^{2+} -ATPase de membrana plasmática.
2. Identificar o(s) sistema(s) de sinalização envolvido(s).
3. Investigar a participação de proteínas cinases, como efetoras de Cer e de C1P.
4. Verificar se as alterações na atividade da Ca^{2+} -ATPase de membrana plasmática estariam relacionadas à fosforilação de resíduos potencialmente regulatórios, ou se seriam apenas um efeito causado pela mudança da organização das MBL.
5. Propor um modelo de ação de Cer e C1P sobre a atividade da Ca^{2+} -ATPase da MBL.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

ATP, ouabaína, sacarose, EDTA, PMSF, inibidor de tripsina, Bis-Tris Propano, EGTA, Hepes, Tris, AMPc, Calfofostina C, PMA, peptídeo inibidor de PKA (5-22), Ceramida, Ceramida-1-fosfato e Histona H8 foram obtidos da Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA. Percol foi comprado da Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden). Todos os outros reagentes foram da mais alta pureza disponível. Todas as soluções foram preparadas com água deionizada do Sistema Milli-Q de resinas (Millipore Corp., Marlborough, MA). [^{32}P]P_i foi obtido do Instituto Brasileiro de Energia e Pesquisas Nucleares (IPEN) em São Paulo, Brasil. O anticorpo contra Ca²⁺-ATPase de membrana plasmática (clone 5f10) foi obtido da Affinity Bioreagents (Golden, CO). O anticorpo policlonal que reconhece o substrato fosforilado nos resíduos de Ser/Thr por PKA foi comprado da Cell Signaling Technology (Beverly, MA). Membrana de nitrocelulose (Hybond) e Kit ECLTM foram comprados da Amersham Biosciences (Buckinghamshire, UK). Filme X-OmatTM foi obtido da Eastman Kodak Co. (Resende, Brasil), assim como as soluções de revelação e fixadores dos filmes de raio-X.

3.2 Isolamento de membrana basolateral

As preparações de homogeneizado de córtex e de MBL de túbulo proximal foram feitas a partir de rins de porcos adultos. Os rins foram removidos imediatamente após a morte dos animais e mantidos em solução gelada contendo: sacarose 250 mM, HEPES-Tris (pH 7,6) 10 mM, EDTA 2 mM e PMSF 1 mM. Fatias bem finas de córtex externo

foram removidas com bisturi e, após a dissecação, as fatias foram homogeneizadas na mesma solução com uso de um homogeneizador do tipo potter.

O homogeneizado foi centrifugado a 1.500 g, por 10 minutos, a 4° C, na centrífuga SCR20B, usando o rotor RPR12-2 (Hitachi). Após a centrifugação descartou-se o precipitado, composto por células inteiras e núcleos, e o homogeneizado foi coletado. Uma alíquota foi separada e estocada a -4° C para alguns ensaios posteriores. O restante sofreu uma série de centrifugações para o isolamento da MBL. Inicialmente, o homogeneizado foi centrifugado a 13.000 g, por 44 minutos, a 4° C, na ultracentrífuga Beckman, utilizando o rotor 45Ti. Após a centrifugação, descartou-se o sobrenadante e, utilizando uma solução contendo sacarose 250 mM e EDTA com pH 7,6, coletou-se apenas a camada superficial do precipitado, que corresponde à fração microssomal (fração que contém todos os tipos de membranas). Logo após, utilizando um gradiente de Percoll (concentração final 12 % v/v), a fração microssomal foi centrifugada a 40.000 g, por 1 hora, a 4° C, em ultracentrífuga Beckman, utilizando o rotor 70Ti, para a formação do gradiente de densidade de Percoll e conseqüente separação das diferentes frações de membranas contidas na porção bruta de membranas plasmáticas (BOUMENDIL-PODEVIN *et al.*, 1983). A fração correspondente à MBL foi, então, recolhida e homogeneizada com homogeneizador do tipo potter e centrifugada a 200.000 g, por 1 hora, a 4° C, em ultracentrífuga Beckman, utilizando o rotor 90Ti para a sedimentação do Percoll. A preparação de membrana foi ressuspensa em sacarose 250 mM, numa concentração final de aproximadamente 25 mg ptn x ml⁻¹, e estocada em nitrogênio líquido. A atividade específica da (Na⁺+K⁺)ATPase, um marcador de membrana basolateral, é sempre dosada como controle da purificação, e fica em torno de 220,6 ± 20,3 nmol Pi x mg⁻¹ x min⁻¹,

correspondente a um enriquecimento de ± 8 vezes, quando comparada à atividade medida em homogeneizado total de córtex renal.

3.3 Preparação de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$

A marcação de ATP com ^{32}P na posição γ foi realizada como descrito por Maia *et al.* (1983). Resumidamente, o procedimento consiste em promover a ligação covalente de ^{32}P (ortofosfato radioativo) ao ADP, formando assim $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$. Para isso, são montadas *in vitro* duas reações sucessivas da via glicolítica: a de oxidação do gliceraldeído-3-fosfato, com fosforilação concomitante por ^{32}P no seu carbono 1, formando 1,3-difosfoglicerato, e a de transferência da fosforila marcada deste último composto para o ADP. As concentrações dos reagentes e das enzimas envolvidas (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e fosfoglicerato cinase) foram escolhidas para garantir o deslocamento das reações (que envolvem pequenas variações de ΔG°) no sentido favorável à formação de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$.

3.4 Medida da atividade da Ca^{2+} -ATPase de membrana plasmática

Para investigar os efeitos de Cer e C1P sobre a atividade da Ca^{2+} -ATPase da membrana basolateral, as frações de membrana foram sonicadas (Unique Sonifier Cleaner) em um meio contendo tampão Bis-Tris Propano 50 mM (pH 7,4), azida sódica 10 mM, ouabaína 0,5 mM, MgCl_2 5 mM e as concentrações de Cer ou C1P indicadas na abscissa das figuras 11, 12, 15 e 16. Depois das amostras serem pré-incubadas a 37° C, por 10 min, na presença de 0,2 mg x ml^{-1} de proteína e, quando indicado, na presença de Calfofostina C 10^{-12} M (inibidor de PKC) ou PKAi 10^{-8} M (peptídeo 5-22 inibidor de PKA) foram adicionados KCl 120 mM e ATP 5 mM para iniciar a reação.

Após 20 min, a reação foi interrompida pela adição de 1,5 ml de carvão ativado (0,17 g/mL) com HCl 0,1 N para adsorção do ATP ainda presente na solução. As amostras foram imediatamente centrifugadas em centrífuga Spin VI (Incibrás), a 1.000 rpm, por 40 min. Alíquotas de 0,5 ml dos sobrenadantes foram retiradas e o Pi determinado colorimetricamente pelo método de Fiske-Subbarow modificado (TAUSSKY & SHORR, 1952). A concentração de proteína das preparações de MBL foram determinadas pelo método de Folin fenol (LOWRY, 1951), usando albumina bovina sérica como padrão. A atividade da Ca^{2+} -ATPase foi calculada pela diferença entre as atividades medidas com e sem EDTA 2 mM (quelante de Ca^{2+}).

3.5 Cálculo das concentrações do complexo $\text{Mg}\cdot\text{ATP}^{2-}$ e das espécies livres de Mg^{2+} , Ca^{2+} e ATP no meio de reação

As concentrações de Mg^{2+} , Ca^{2+} , ATP livre (ATP^{4-} e HATP^{3-}) e do complexo $\text{Mg}\cdot\text{ATP}^{2-}$ ($\text{Mg}\cdot\text{ATP}^{2-}$ predominante e $\text{Mg}\cdot\text{HATP}^{-}$ em concentrações várias ordens de grandeza menores) foram calculadas utilizando um programa de computador (MCalc) (Inesi *et al.*, 1980), modificado por Sorenson *et al.* (1986) a partir do original desenvolvido por Fabiato & Fabiato (1979). Este programa leva em consideração as diferentes espécies envolvidas no equilíbrio entre Mg^{2+} , Ca^{2+} , ATP, EGTA e H^{+} . A partir das informações fornecidas ao programa sobre as concentrações dos componentes do meio de reação (notadamente ATP e MgCl_2).

3.6 Medida da atividade de proteína cinase C (PKC)

A atividade de PKC em MBL isolada foi medida pela incorporação de ^{32}P i à histona. A reação, com volume final 0,1 ml, foi iniciada com a adição de 10 μM de $[\gamma$ -

^{32}P]ATP (sal de magnésio, $7 \mu\text{Ci} \times \mu\text{mol}^{-1}$). A composição do meio de reação foi: MgCl_2 4 mM, HEPES-Tris (pH 7,0) 20 mM, $1,5 \text{ mg} \times \text{ml}^{-1}$ de histona, $0,7 \text{ mg} \times \text{ml}^{-1}$ de proteína e Cer ($2 \times 10^{-7} \text{ M}$) ou C1P (10^{-7} M). Após 10 minutos, a 37° C , a reação foi parada com a adição de TCA 40% e imediatamente colocada em gelo até a filtração em filtros Milipore ($0,45 \mu\text{m}$). Os filtros foram lavados com solução gelada de TCA 20% e tampão fosfato 2 mM (pH 7,0).

A radioatividade incorporada foi quantificada através de contagem de cintilação líquida em contador de cintilação Packard Tri-Carb 2100 TR. A atividade de PKC foi calculada pela diferença de incorporação de ^{32}P i em histonas, na presença e na ausência do inibidor de PKC (Calfostina C).

3.7 Medida da atividade de proteína cinase A (PKA)

A atividade de PKA em MBL isolada foi medida pela incorporação da fosforila γ -terminal do $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP à histona, na presença ou ausência do peptídeo (5-22) inibidor de PKA (PKAi). A reação, com volume final 0,1 ml, foi iniciada com a adição de $10 \mu\text{M}$ de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP (sal de magnésio, $7 \mu\text{Ci} \times \mu\text{mol}^{-1}$). A composição do meio de reação foi: MgCl_2 4 mM, HEPES-Tris (pH 7,0) 20 mM, $1,5 \text{ mg} \times \text{ml}^{-1}$ de histona, $0,7 \text{ mg} \times \text{ml}^{-1}$ de proteína e Cer ($2 \times 10^{-7} \text{ M}$) ou C1P (10^{-7} M). Após 10 minutos a 37° C , a reação foi parada com a adição de TCA 40% e imediatamente colocada em gelo até a filtração em filtros Millipore ($0,45 \mu\text{m}$). Os filtros foram lavados com solução de TCA 20% e tampão fosfato 2 mM (pH 7,0). A radioatividade incorporada foi quantificada através da contagem de cintilação líquida dos filtros com histonas em contador de cintilação Packard Tri-Carb 2100 TR.

3.8 SDS-PAGE e imunodeteccção

Proteínas totais das amostras de MBL foram separadas em SDS-PAGE de acordo com o método de LAEMMLI, 1970.

Os ensaios de imunodeteccção com anticorpos anti Ca^{2+} -ATPase de membrana plasmática (5f10) e anti substrato fosforilado (Ser/Thr), foram realizados de acordo com protocolos recentes do nosso laboratório (TORTELOTE *et al*, 2004; VALVERDE *et al.*, 2005).

3.9 Fosforilação da Ca^{2+} -ATPase de membrana plasmática

As frações de membranas foram pré-incubadas com o mesmo meio de reação utilizado para medir a atividade da Ca^{2+} -ATPase, na presença de Cer (5×10^{-8} M), C1P (5×10^{-7} M), Calfofostina C (10^{-12} M), PMA (10^{-12} M) e PKA_i (10^{-8} M) nas combinações mostradas na abscissa das figuras 19 e 20. Para o início da reação, foi adicionado ATP 5 mM. Depois de 20 min, a reação (200 μl ; 100 μg de proteína) foi parada com 50 μl de tampão de amostra 3X concentrado (2.31 g DTT; 3 g SDS; 12 ml Tris 1.0 M pH 6.8; 15 ml 10% glicerol em 50 ml de volume final de água) e 100 μl das amostras solubilizadas foram aplicadas em cada poço para as proteínas serem separadas por SDS-PAGE (10% acrilamida). As proteínas do gel foram transferidas para a membrana de nitrocellulose. Na análise da fosforilação da Ca^{2+} -ATPase por PKA, os resíduos de fosfo-Ser/Thr foram identificados pelo anticorpo policlonal que reconhece substratos fosforilados por PKA como descrito anteriormente (VALVERDE *et al.*, 2005).

Na análise da fosforilação da Ca^{2+} -ATPase por PKC, a membrana foi exposta “overnight” no “phosphor screen” e analisada usando o PhosphorImager Storm 860 (Molecular Dynamics, Amersham Pharmacia Biotech), pois além do ATP frio, foi utilizado o $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (5×10^7 cpm/ μmol). A intensidade das bandas de ~ 140 kDa fosforiladas foram reconhecidas pelo anticorpo 5f10. As bandas foram quantificadas pelo Programa Scion Image.

3.10 Análise estatística

Quando indicado, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando o software SPSS 8.0. Quando foram observadas diferenças significativas entre as médias, utilizou-se o teste de Bonferroni com $p \leq 0,05$ (nível de confiança).

Os dados são apresentados como média \pm erro padrão.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre as principais funções dos rins, está a de regular o transporte de íons, água e solutos. Diferentes sistemas de sinalização celular, agem sobre transportadores ativos que estão normalmente localizados na MBL, e estão envolvidos em vários sistemas transportadores; sendo as faces da membrana celular do epitélio renal diferentes tanto funcionalmente quanto morfológicamente, caracterizando assim um epitélio polarizado (FÉRAILLE & DOUCET, 2001).

Nos últimos cinco anos, nosso laboratório vem estudando as vias de geração de lipídeos bioativos na MBL, bem como de que maneira estes lipídeos podem modular transportadores iônicos presentes nesta membrana, com ênfase na Ca^{2+} -ATPase de membrana plasmática. Recentemente, nosso laboratório demonstrou que a Ca^{2+} -ATPase da MBL encontra-se exclusivamente localizada em rafts lipídicos ricos em colesterol e caveolina (TORTELOTE *et al.*, 2004). Sabendo que a composição lipídica destes rafts é majoritariamente de esfingolipídeos, temos estudado o potencial regulador desta classe de lipídeos.

Neste trabalho, focalizamos nosso estudo sobre a Cer e seu derivado fosforilado, a C1P, por serem estes esfingolipídeos potenciais moduladores de diferentes vias de sinalização celular, atuando sobre proteínas cinases, fosfatases, lipases, dentre outras (RUVOLO *et al.*, 2002; GÓMEZ-MUÑOZ, 2004; BOLLINGER *et al.*, 2005). Outro fato que torna as ceramidas interessantes do ponto de vista da regulação de fenômenos celulares é a sua ação na fusão de pequenos rafts inativos, levando a formação das chamadas plataformas de sinalização celular em membranas biológicas (HOLOPAINEN *et al.*, 1998; KOLESNICK *et al.*, 2000; NURMINEN *et al.*, 2002). Dessa forma, além de

sua ação direta sobre proteínas efetoras, Cer pode alterar as características físico-químicas das membranas, levando a respostas celulares.

A figura 11 mostra que a pré-incubação da MBL com concentrações crescentes de Cer, leva a um efeito bifásico na atividade da Ca^{2+} -ATPase de membrana plasmática, sendo baixas concentrações de Cer (10^{-8} e 10^{-7} M) capazes de promover uma estimulação significativa sobre a atividade da bomba ($\sim 100\%$). Altas concentrações de Cer levaram ao retorno da atividade da Ca^{2+} -ATPase de membrana plasmática a níveis controle também. Foi testado o derivado fosforilado de Cer, a C1P, que em concentrações crescentes não levou a qualquer alteração significativa da Ca^{2+} -ATPase de MBL (Figura 12). O efeito observado de Cer sobre a atividade da Ca^{2+} -ATPase de membrana plasmática, poderia ser tanto uma consequência de mudanças estruturais na membrana como aquelas observadas após à ativação de SMases com consequente elevação dos níveis de Cer na membrana (FUTERMAN & HANNUN, 2004), ou ainda devido a uma ativação direta de proteínas efetoras. É importante reforçar que Cer por ser mais concentrada em rafts, já seria um candidato natural para a regulação da Ca^{2+} -ATPase, co-localizada nesses microdomínios lipídicos (TORTELOTE *et al.*, 2004). O resultado da figura 11, nos permite classificar a Cer como um lipídeo ativador natural da Ca^{2+} -ATPase de membrana plasmática, assim como a calmodulina, pois concentrações bem baixas (20 – 50 nM), dobram a atividade desta bomba.

Proteínas cinases, sabidamente PKC e PKA, tem sido relacionadas com a modulação da Ca^{2+} -ATPase de membrana plasmática e de outros transportadores de íons a partir de diferentes estímulos em diferentes modelos biológicos, incluindo tecido renal (CARAFOLI *et al.*, 2001), o que nos levou a investigar se a modulação da Ca^{2+} -

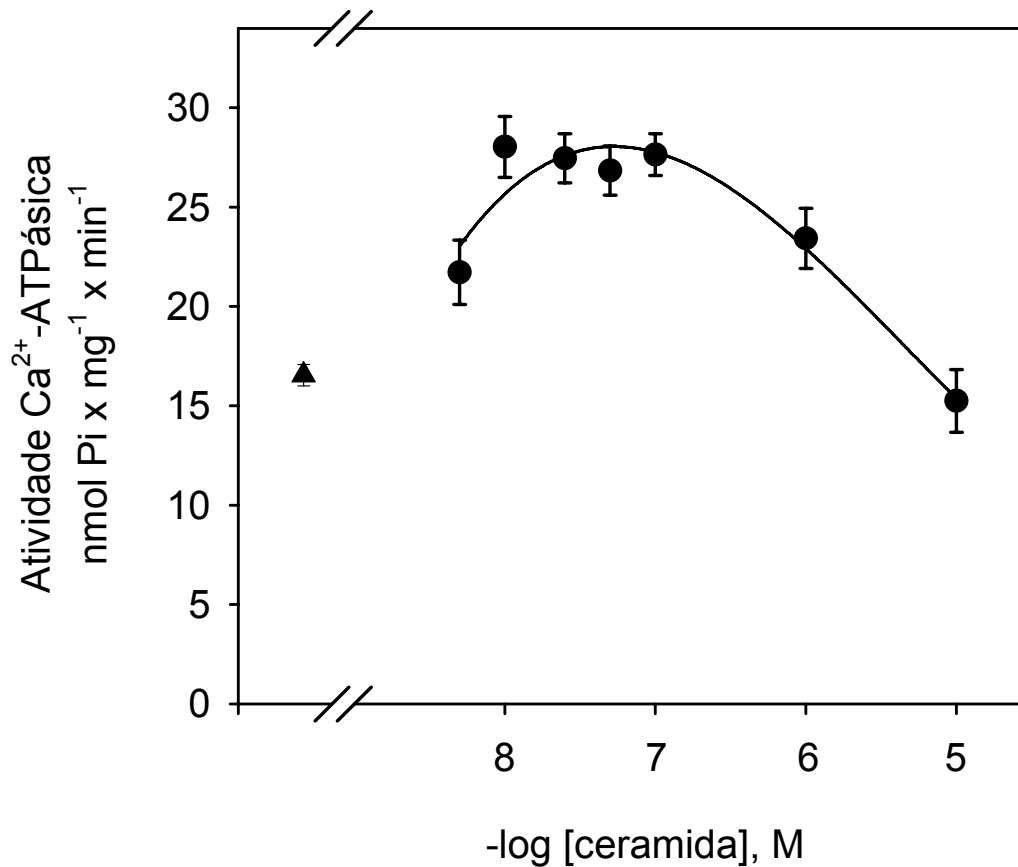


Figura 11. Modulação da atividade da Ca^{2+} -ATPase de membrana plasmática por Cer.

A atividade da Ca^{2+} -ATPase de membrana plasmática foi determinada depois da pré-incubação das frações das membranas basolaterais nas concentrações de Ceramida indicadas na abscissa, conforme descrito em Materiais e Métodos. O gráfico mostra a média \pm erro padrão de 6 experimentos diferentes feitos em triplicata, com preparações de membrana basolateral diferentes.

ATPase de membrana plasmática por Cer envolvia a ativação de PKC e PKA, duas cinases residentes na MBL renal (CARUSO-NEVES *et al.*, 2000; CARAFOLI *et al.*, 2001, ASSUNÇÃO-MIRANDA *et al.*, 2005).

As PKCs, clássica e novel, possuem um domínio de ligação para Ca^{2+} , chamado domínio C2, sendo que a PKC novel é insensível ao Ca^{2+} e sensível ao diacilglicerol (DAG), e a PKC clássica é sensível ao Ca^{2+} e ao DAG. Existe ainda uma terceira família de PKC, a atípica, que é insensível ao Ca^{2+} e ao DAG, possuindo um domínio PB1, sendo sua ativação através de interação proteína-proteína. A PKC é uma serina/treonina cinase, ou seja, ela tem a capacidade de fosforilar resíduos de serina ou treonina que estejam em domínios específicos, reconhecidos pela enzima. A PKC tem diversos alvos intracelulares, influenciando processos fisiológicos variados, como proliferação celular, diferenciação celular, secreção, tráfico de vesículas, internalização de substâncias e regulação do transporte iônico (DEMPSEY *et al.*, 2000).

Trabalhos na literatura mostram que a Cer é considerada um ativador direto da PKC ζ (zeta) atípica, sendo esta ativação envolvida na proliferação celular e na ativação de cascatas de MAPK (MULLER *et al.*, 1995; BOURBON *et al.*, 2000). Em células mesangiais renais, foi observado que a Cer pode ativar outras isoformas de PKC, sabidamente PKC α (clássica) e PKC δ (novel) (HUWILER *et al.*, 1998), o que confere à Cer, um papel importante na regulação de eventos mediados por PKC. Por outro lado, a adição de Cer à MBL pode levar a uma reorganização de rafts lipídicos mimetizando o efeito de ativação de SMases. Por tudo isso, decidimos estudar o potencial de Cer e C1P modularem proteínas cinases residentes na MBL.

Na figura 13 é mostrada a ativação significativa de PKC por Cer (2×10^{-7} M), concentração esta que promove a máxima ativação da Ca^{2+} -ATPase da MBL. Esta

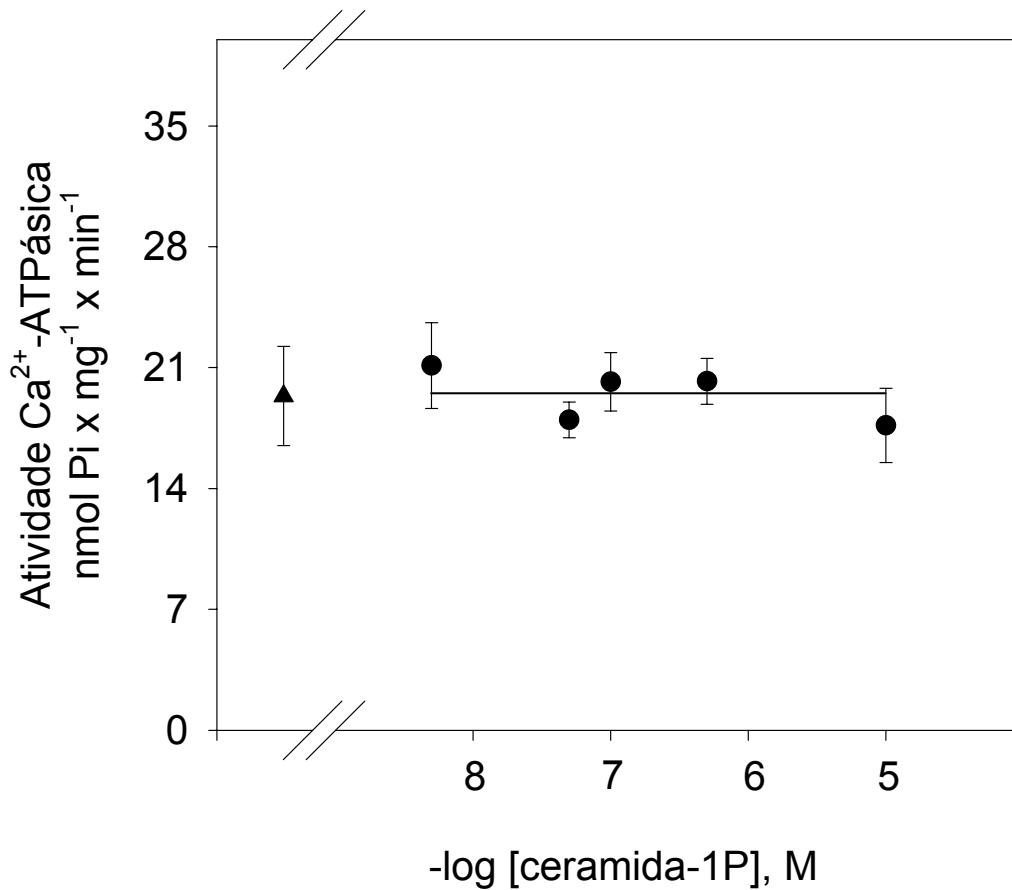


Figura 12. C1P não atua como modulador da Ca^{2+} -ATPase em MBL isolada.

A atividade da Ca^{2+} -ATPase de membrana plasmática foi ensaiada na presença das concentrações de Ceramida-1-fosfato mostradas na abscissa, como descrito em Materiais e Métodos. O resultado foi obtido a partir de 6 experimentos diferentes feitos em triplicata, com diferentes preparações de membrana basolateral. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão.

ativação é equivalente a observada com PMA, que é um ativador clássico da PKC (comparar a segunda e a terceira barra da figura 13). Em contraste, a incubação da MBL com C1P (10^{-7} M) (sem efeito na atividade da Ca^{2+} -ATPase), levou à inibição da PKC, sendo que esta inibição não é observada quando C1P e PMA (10^{-12} M) são adicionados juntos ao ensaio (comparar as duas últimas barras da figura 13).

Foi também testada a capacidade de Cer e de C1P em modularem a atividade da PKA (proteína cinase dependente de AMPc). Pode-se observar na figura 14, que os dois esfingolípídeos (nas mesmas concentrações da figura 13) foram capazes de ativar a PKA, sendo esta ativação comparada com seu ativador fisiológico, o AMPc (10^{-7} M). Quando as frações de membranas são tratadas com Cer e AMPc simultaneamente, observamos um efeito aditivo na ativação da PKA, o que nos leva a postular a presença de ao menos dois “pools” de PKA residentes na MBL, com ativação dependente de Cer ou de AMPc.

Os resultados obtidos nas figuras 13 e 14, sugerem que Cer pode mediar eventos dependentes de PKC e PKA na MBL. Dados da literatura mostram que ceramidas podem ativar proteínas cinses levando a respostas como proliferação, apoptose, fagocitose, inflamação, etc. (GOMEZ-MUÑOZ, 2004; BAUMRUKER *et al.*, 2005), mas não há nenhum relato na literatura da modulação de PKA por Cer ou por C1P. Desta forma, esta é a primeira evidência de que Cer e C1P também são capazes de estimular PKA, pelo menos em MBL.

Com os resultados de ativação das proteínas cinases A e C por Cer, decidimos investigar o possível envolvimento de uma dessas cinases na ativação da Ca^{2+} -ATPase de MBL. A Figura 15 mostra que a Calfofostina C (inibidor seletivo de PKC), não foi capaz de reverter a estimulação por Cer na atividade da Ca^{2+} -ATPase. Por outro lado, pré-

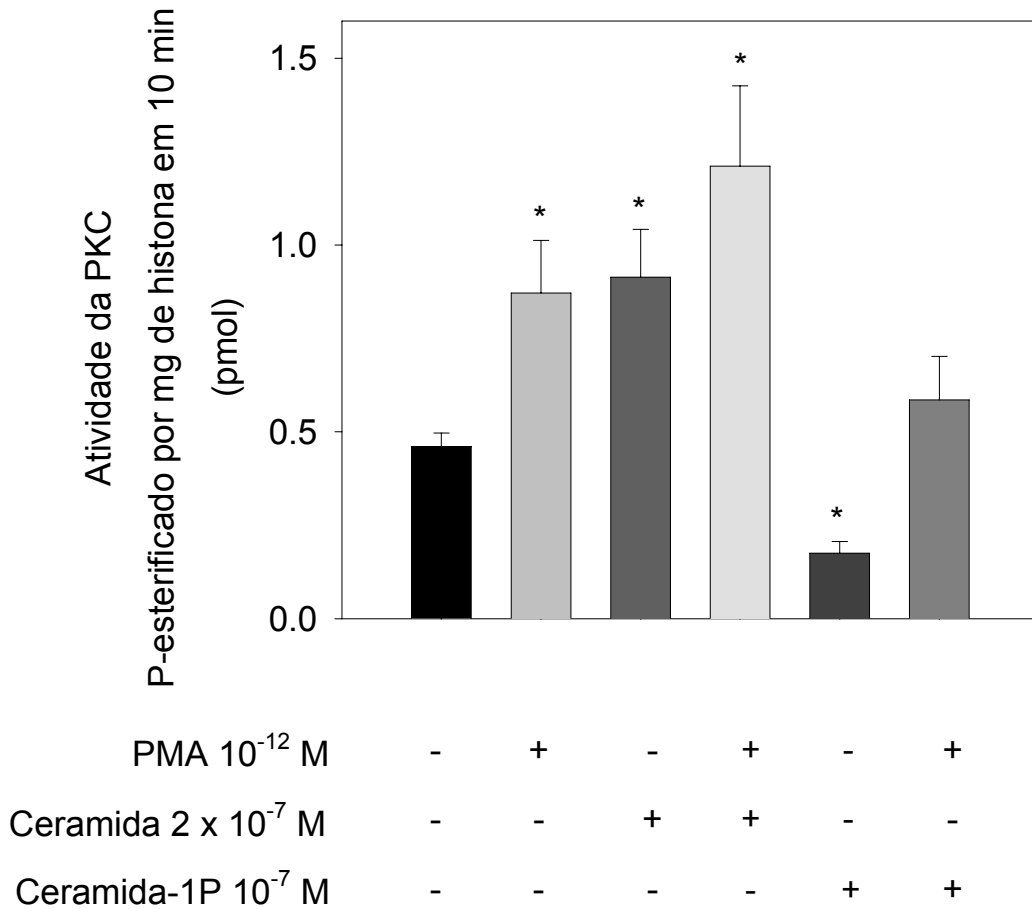


Figura 13. Efeitos antagônicos de Cer e C1P na modulação da PKC.

A atividade da cinase foi determinada como descrito em Materiais e Métodos, na presença ou na ausência de Ceramida, Ceramida-1-fosfato e PMA. A atividade foi calculada pela diferença das histonas fosforiladas na ausência e presença de Calfofostina C 10^{-12} M. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão, de 5 experimentos diferentes feitos em triplicata, com diferentes preparações de membrana basolateral.

* indica as barras que são significativamente diferentes em relação ao controle.

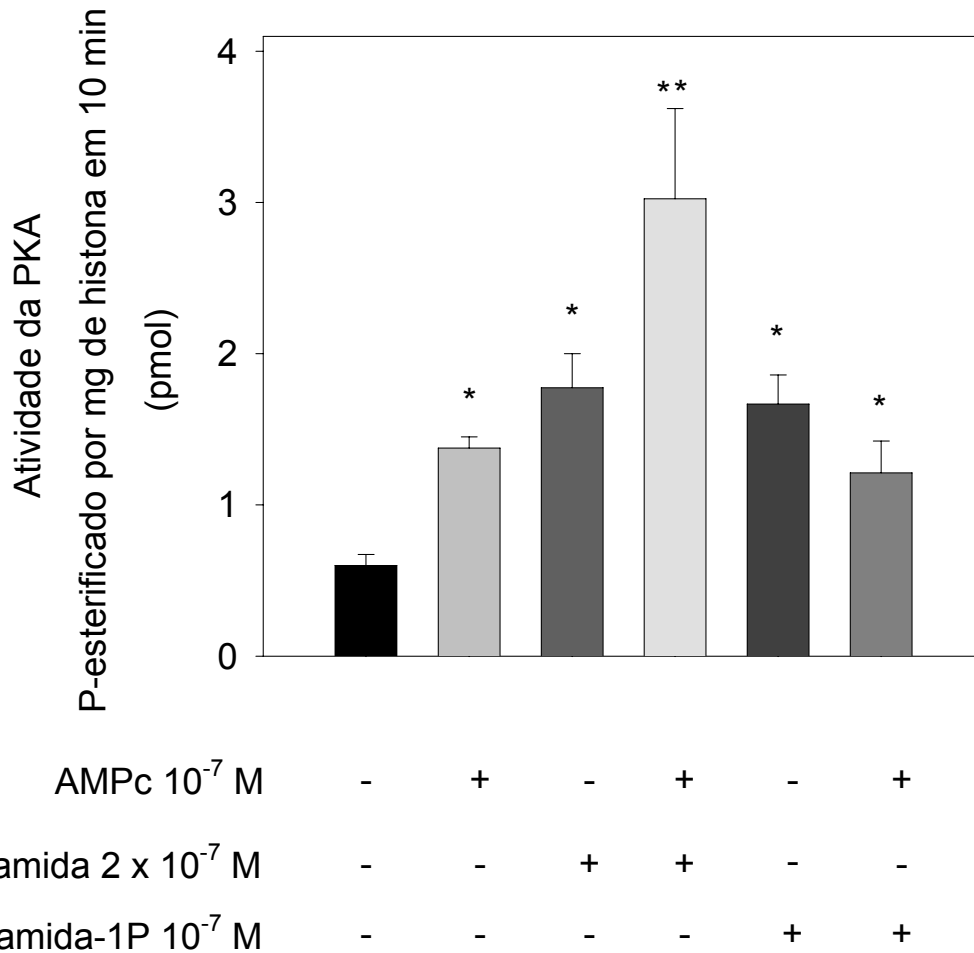
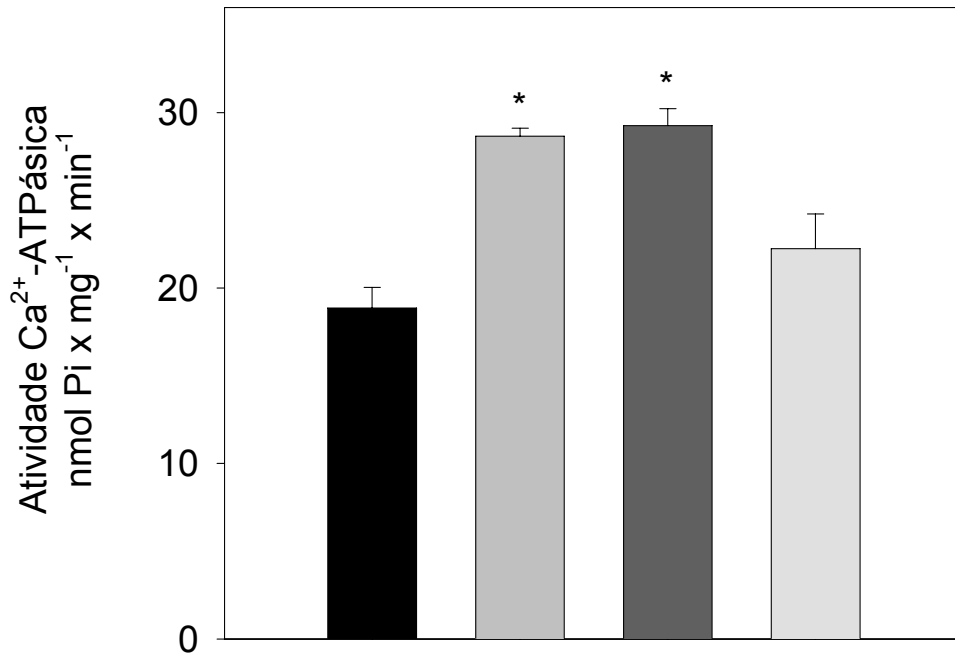


Figura 14. Ativação da PKA por Cer e C1P.

A atividade da PKA foi determinada como descrito em Materiais e Métodos, na presença ou na ausência de Cer, C1P e AMPc. A atividade de PKA foi calculada pela diferença das histonas fosforiladas na presença e na ausência de PKAi 10^{-8} M. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão, de 5 experimentos diferentes feitos em triplicata, com diferentes preparações de MBL.

* indica as barras que são significativamente diferentes em relação ao controle.

** indica a barra que é significativamente diferente em relação ao controle e as demais barras.



Ceramida 5 x 10 ⁻⁸ M	-	+	+	-
Calfostina C 10 ⁻¹² M	-	-	+	+

Figura 15. Cer ativa Ca²⁺-ATPase de membrana plasmática por uma via independente de PKC.

A atividade da PKC de membrana basolateral foi ensaiada como descrito em Materiais e Métodos na presença de Calfostina C (inibidor da PKC) e/ou Cer nas combinações indicadas na abscissa. A atividade da Ca²⁺-ATPase de membrana plasmática foi medida em 5 experimentos diferentes feitos em triplicata, com diferentes preparações de MBL. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão.

* indica as barras que são significativamente diferentes em relação ao controle.

incubando a MBL com Cer e com o inibidor de PKA (PKAi), o efeito estimulatório de Cer sobre a Ca^{2+} -ATPase de membrana plasmática não é mais observado, sugerindo assim que a Cer estimula a atividade da Ca^{2+} -ATPase de MBL via PKA (Figura 16). Nosso laboratório mostrou recentemente que a PKA ativa a Ca^{2+} -ATPase de membrana de eletrócitos, outro modelo de célula polarizada, fazendo parte de uma via de ativação que envolve também a CaMK II (VALVERDE *et al.*, 2005). Nosso grupo já demonstrou a presença de PKA em frações enriquecidas de MBL e, também já relacionou esta cascata de sinalização com outras ATPases transportadoras como a Na^+ -ATPase (CARUSO-NEVES *et al.*, 2000).

A correlação entre a adição de Cer e a fosforilação regulatória da Ca^{2+} -ATPase de MBL por PKA, foi demonstrada nos experimentos da figura 17. Pode-se observar que Cer promove um aumento significativo na fosforilação da Ca^{2+} -ATPase de membrana plasmática, pela PKA, como detectado pelo anticorpo anti-substratos fosforilados nos resíduos de Ser/Thr por PKA (Figura 17 A). A razão entre as Figuras 17 A e 17 B (imunodeteção da Ca^{2+} -ATPase de membrana plasmática, usando o anticorpo monoclonal 5f10), é representada pela Figura 17 C. Também é possível observar na Figura 17, que a C1P também promove a fosforilação da Ca^{2+} -ATPase via PKA, no entanto, esta fosforilação não está relacionada com a modulação da bomba (ver Fig. 12).

Os resultados das figuras 14, 15 e 17 indicam que a cascata de sinalização celular iniciada por Cer é uma eficiente via de ativação da Ca^{2+} -ATPase em células do túbulo proximal renal, envolvendo a PKA residente na MBL daquelas células. Vale lembrar que nestas membranas, a ativação da cascata de PKA por toxina da cólera ou forskolina, resultam na modulação da Na^+ -ATPase (CARUSO-NEVES *et al.*, 2000),

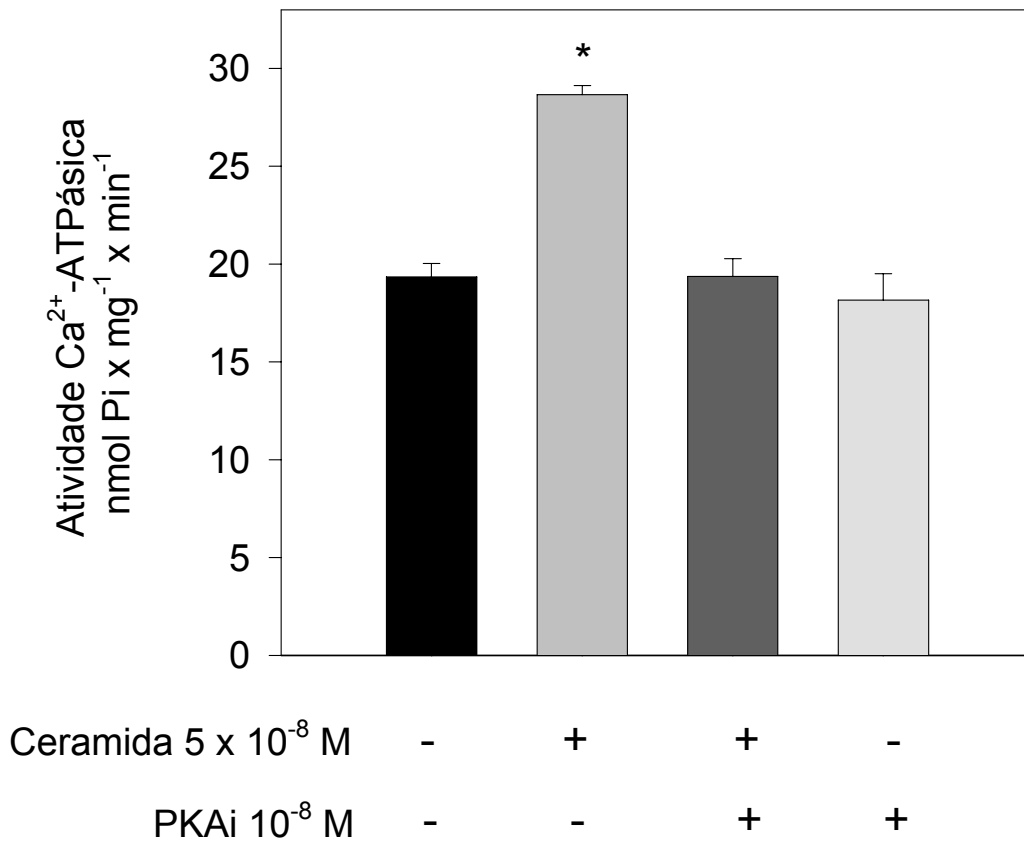


Figura 16. Cer ativa Ca^{2+} -ATPase de membrana plasmática via PKA.

As frações da membrana basolateral foram incubadas com Cer e/ou PKAi (inibidor de PKA) como descrito em Materiais e Métodos e indicado na abscissa. A atividade da Ca^{2+} -ATPase de membrana foi medida em 5 experimentos diferentes feitos em triplicata. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão.

* indica a barra que é significativamente diferente em relação ao controle.

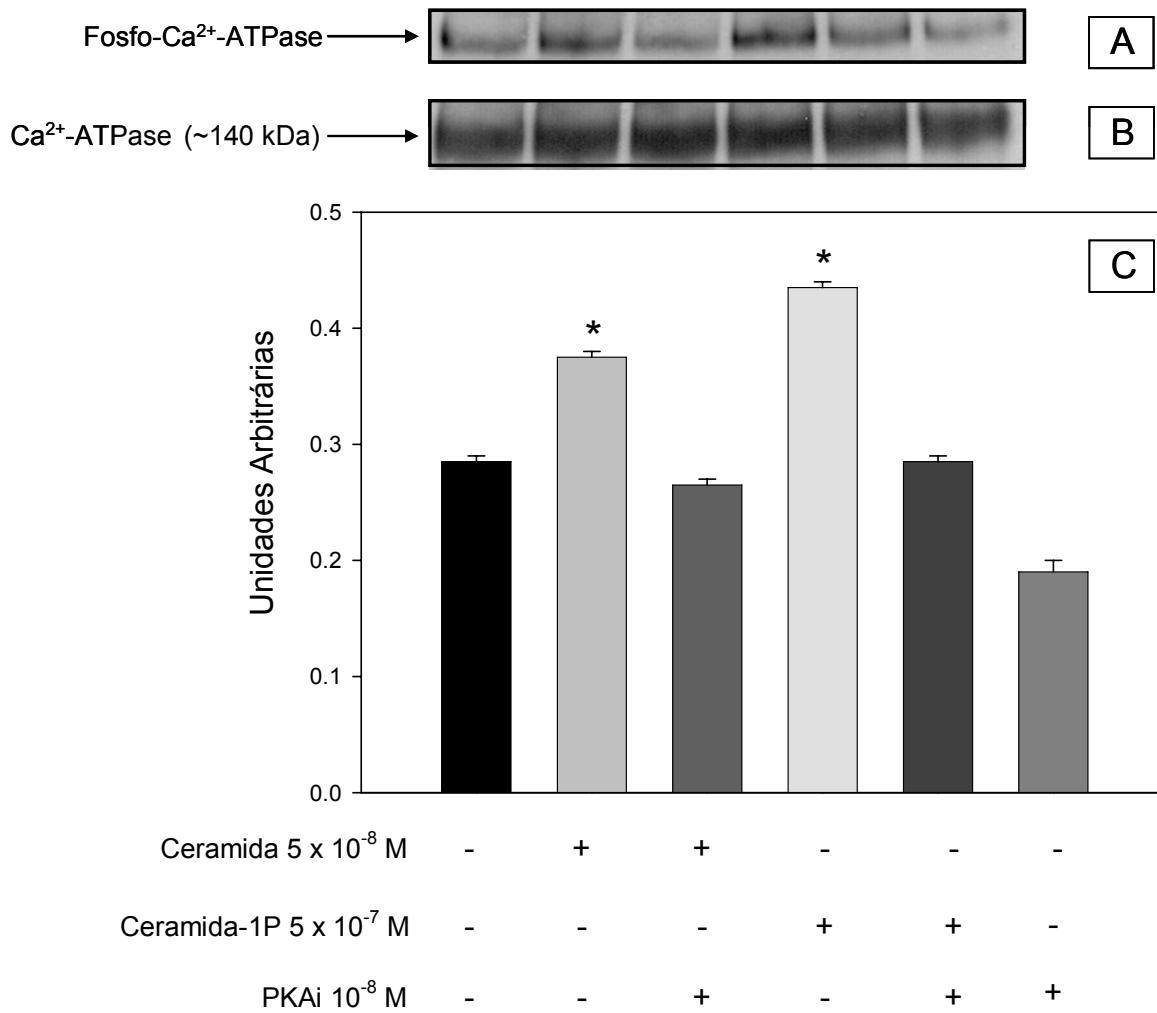


Figura 17. Fosforilação da Ca^{2+} -ATPase de MBL por PKA ativada por Cer e C1P.

A, imunodeteção do substrato específico fosforilado nos resíduos de Ser/Thr por PKA, como descrito em Materiais e Métodos. B, imunodeteção da Ca^{2+} -ATPase de membrana plasmática (usando o anticorpo monoclonal 5f10) no blotting representativo mostrado na imagem A. C, razão da análise densitométrica pelo Programa Scion das imagens A e B. As análises foram feitas na presença e na ausência de Cer, C1P e PKA_i nas combinações mostradas na abscissa. A figura é representativa de 3 experimentos diferentes.

* indica as barras que são significativamente diferentes em relação ao controle.

sendo este outro exemplo da participação dessa cinase na regulação de transporte iônico em MBL. Essas observações demonstram a importante participação da PKA no ajuste fino dos fluxos de Ca^{2+} e Na^+ no segmento do néfron onde a reabsorção de mais de dois terços do ultrafiltrado glomerular ocorre.

Além da PKA, a PKC desencadeia diferentes cascatas de sinalização celular, sendo esta última ativada por hormônios e autacóides nos rins, levando à inibição da Ca^{2+} -ATPase de membrana plasmática (COKA-GUEVARA *et al.*, 1999; ASSUNÇÃO-MIRANDA *et al.*, 2005). Com base nesses dados, fomos verificar se haveria fosforilação da Ca^{2+} -ATPase, de MBL, pela PKC ativada por Cer.

A figura 18 C é a razão da análise densitométrica das figuras 18 A (marcação de ^{32}P na banda de ~ 140 kDa reconhecida pelo Phosphor Imager) e 18 B (imunodeteção da Ca^{2+} -ATPase de MBL, usando o anticorpo monoclonal 5f10). Na figura 18 C, vemos que Cer e C1P levam a um significativo aumento na fosforilação da Ca^{2+} -ATPase de membrana plasmática por PKC, sendo esta fosforilação inibida quando na presença de Calhostina C (inibidor específico de PKC). Com isso podemos dizer que Cer e C1P modulam diferentemente PKC residente em MBL (comparar a terceira e a quinta barra da fig. 13), que por sua vez promovem “fosforilações silenciosas”, ou seja, fosforilações em domínios não regulatórios da Ca^{2+} -ATPase de membrana plasmática. Essa fosforilação silenciosa induzida por Cer pode ocorrer por pelo menos dois motivos: (1) fosforilação que ocorre naturalmente em resíduos não regulatórios e; (2) mudança da conformação da Ca^{2+} -ATPase fosforilada por PKA, expondo um sítio não regulatório de fosforilação para PKC.

A ativação da Ca^{2+} -ATPase por Cer, pode estar relacionada a dois mecanismos: (1) a característica da Cer em formar plataformas sinalizadoras, nas quais a Ca^{2+} -

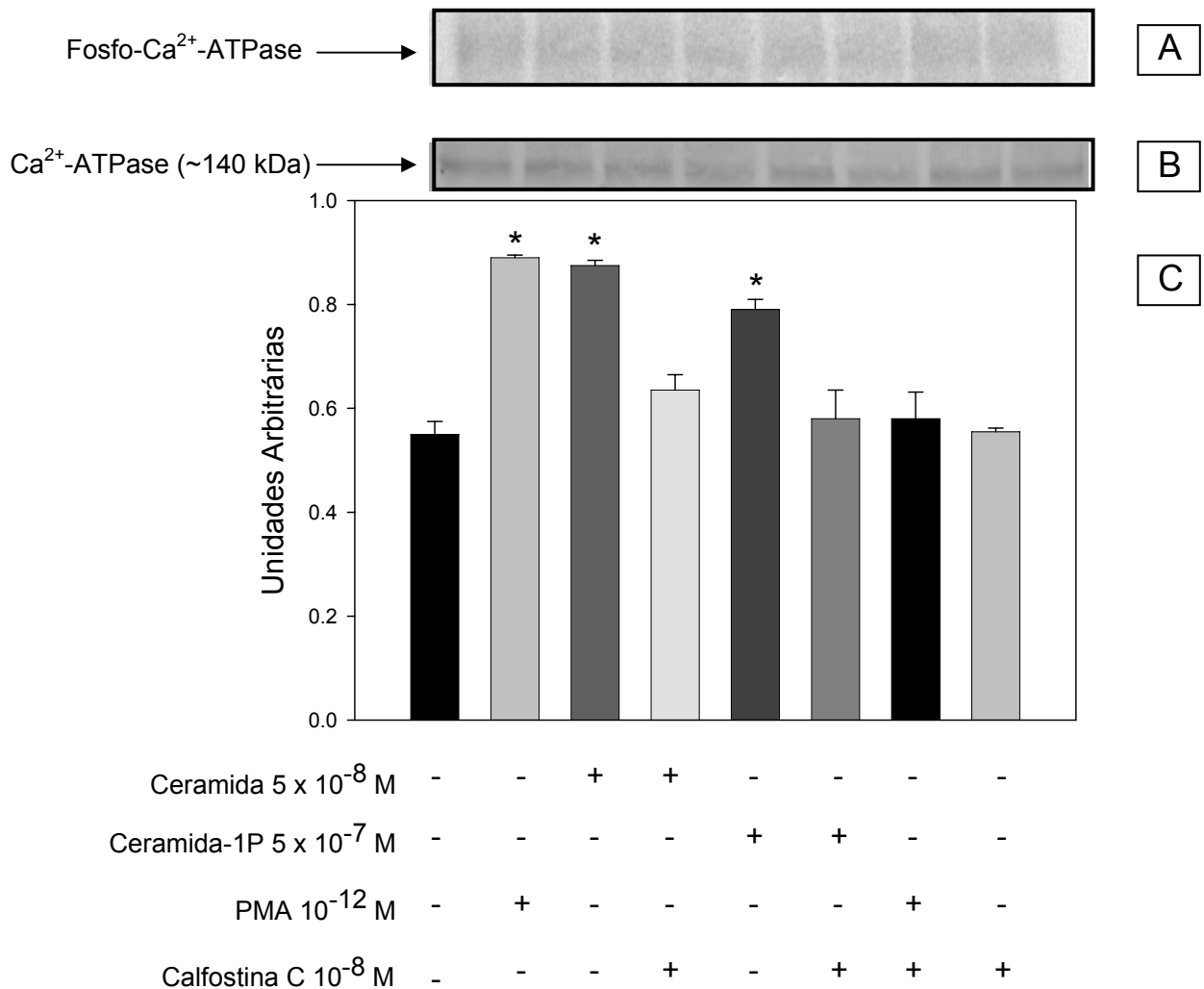


Figura 18. Fosforilação da Ca^{2+} -ATPase de MBL por PKC ativada por Cer e C1P.

Fosforilação da Ca^{2+} -ATPase de membrana plasmática na presença e na ausência de Calyculin C, foi determinada como descrito em Materiais e Métodos utilizando as combinações de Cer, C1P, PMA e Calyculin C indicadas na abscissa. A, marcação de ^{32}P na banda de ~ 140 kDa. B, imunodeteção da Ca^{2+} -ATPase de membrana plasmática (usando anticorpo monoclonal 5f10). C, Razão da análise densitométrica pelo Programa Scion Image das imagens A e B, respectivamente. A figura é representativa de 3 experimentos diferentes.

* indica as barras que são significativamente diferentes em relação ao controle.

ATPase está exclusivamente localizada na MBL renal, pode favorecer a oligomerização da ATPase seguida de sua ativação; (2) estimulação da Cer e a fosforilação da Ca^{2+} -ATPase mediada por PKA, pode levar a ativação direta da Ca^{2+} -ATPase por calmodulina através do impedimento de ligação ao domínio auto-inibitório.

O presente trabalho coloca a Cer dentre os lipídeos bioativos que regulam o transporte de íon no túbulo proximal renal, através da ativação de uma via dependente de PKA. Esta é a primeira vez que se mostra a ativação de PKA por ceramidas.

5 CONCLUSÃO

A regulação do transporte de fluidos através do epitélio tubular, é uma das principais funções dos rins. Transportadores ativos localizados na MBL são alvos de diferentes sistemas de sinalização celular (FÉRAILLE & DOUCET, 2001). O transporte vetorial em células epiteliais renais polarizadas é o resultado de mecanismos coordenados do transporte através das faces apical e basolateral dessas células. Foi demonstrado que esfingolípídeos atuam em diferentes processos de sinalização celular envolvendo diversos componentes de membrana, tais como proteínas cinases, lipases e fosfatases (HOEKSTRA *et al.*, 2003; RUVOLLO, 2003; VAN BLITTERSWIJK *et al.*, 2003; GULBINS *et al.*, 2004).

A partir dos dados obtidos, chegamos às seguintes conclusões, posteriormente esquematizadas na Fig. 19:

- 1- A Cer exógena ativa um pool de PKA (PKA1) que fosforila a Ca^{2+} -ATPase de membrana plasmática, ativando-a (ver Figuras 11, 14, 16 e 17)
- 2- A Cer exógena ativa a PKC atípica (PKC2), e inibe a PKC novel (dependente de diacilglicerol) (PKC1). A Cer ativa a PKC2, pois dados do nosso laboratório mostram que a PKC1 ativada inibe a Ca^{2+} -ATPase (ASSUNÇÃO-MIRANDA *et al.*, 2005), e dados obtidos durante o meu mestrinho, mostram que a PKC2 ativada por Cer leva à fosforilação silenciosa da Ca^{2+} -ATPase de membrana plasmática, ou seja, fosforila a Ca^{2+} -ATPase de MBL em resíduo não relacionado com a ativação da enzima (ver Figuras 13, 15 e 18).

Em situações nas quais a mesma molécula sinalizadora modula diferentes proteínas cinases, pode-se imaginar que estas cinases tenham sua ativação/inibição em momentos distintos e de forma seqüencial. Desta maneira, a fosforilação de uma proteína alvo por um tipo de cinase, levaria a uma alteração conformacional, expondo sítios de fosforilação para outro set de cinases, levando assim à regulação da proteína alvo.

Na Fig. 20 estão esquematizadas as seguintes conclusões:

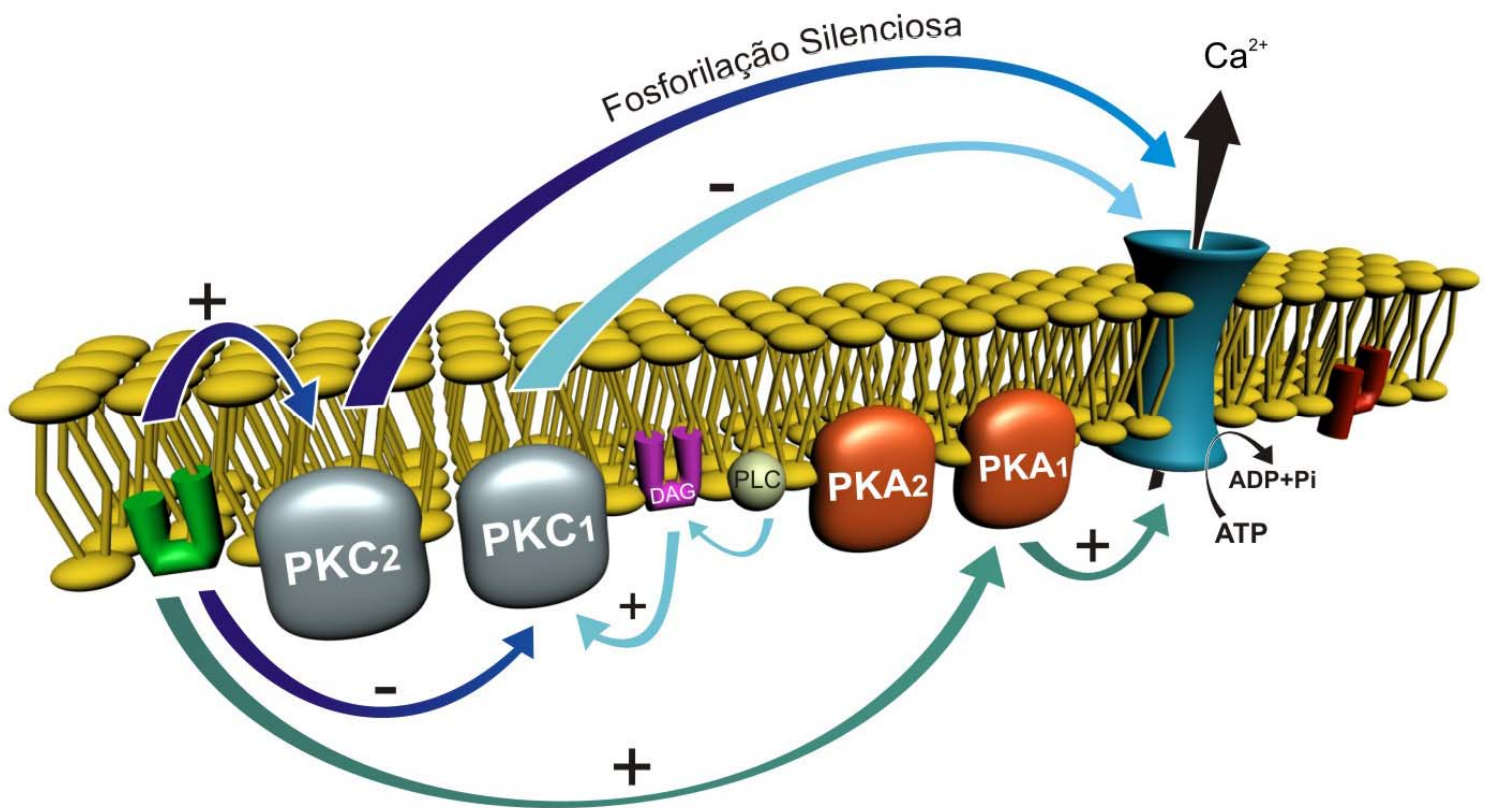
3- A C1P exógena ativa um pool de PKA (PKA2), diferente do pool de PKA ativada por Cer (PKA1), pois quando as frações de membranas são tratadas com Cer + AMPc a atividade da PKA é aditiva, já na presença de C1P + AMPc não é aditiva à atividade da PKA (ver Fig. 14).

4- A ativação de PKA2 por C1P, fosforila a Ca^{2+} -ATPase de membrana plasmática em resíduo não relacionado com a ativação da Ca^{2+} -ATPase, sendo esta fosforilação silenciosa na isoforma de Ca^{2+} -ATPase presente na MBL, dado que concentrações crescentes de C1P não modulam a Ca^{2+} -ATPase (ver Figuras 12 e 17).

5- A C1P exógena inibe a PKC (PKC1 e PKC2), havendo provavelmente outra proteína que é modulada pela C1P (além da PKC, já que na presença de calfofina C houve a diminuição da fosforilação da Ca^{2+} -ATPase) (Figuras 13 e 18), que fosforila a Ca^{2+} -ATPase de membrana plasmática.


Os resultados caracterizam Cer e C1P como esfingolipídeos bioativos da MBL de túbulos proximais renais, e evidenciam sua importância na regulação de diferentes cascatas de sinalização celular da MBL (Figuras 19 e 20).

Meio extracelular

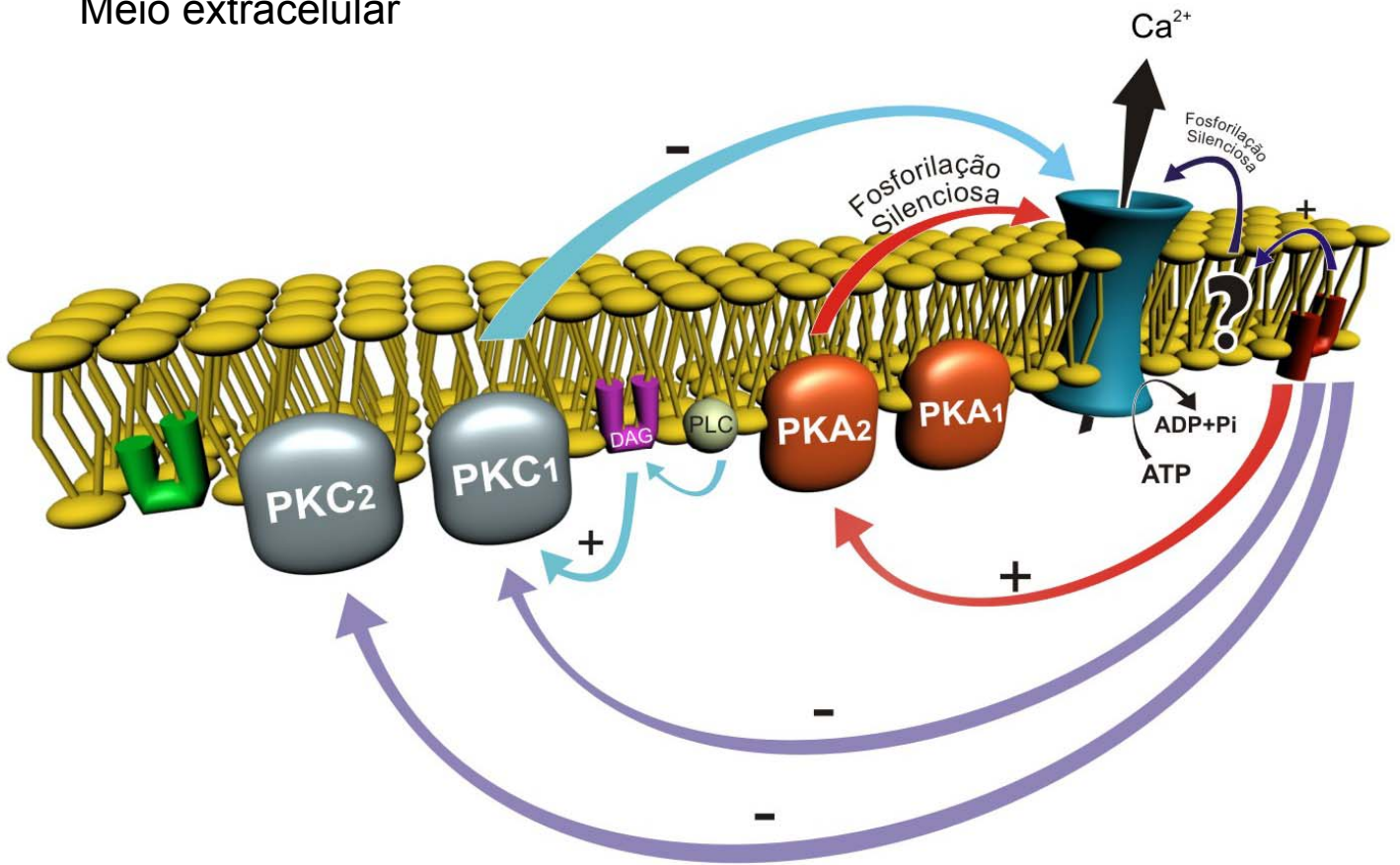


Meio intracelular

Figura 19. Modelo proposto para a modulação da atividade da Ca^{2+} -ATPase de membrana basolateral por Cer.

Ceramida  modula PKA e PKC. PKA ativada por Ceramida ativa a Ca^{2+} -ATPase de membrana basolateral.

Meio extracelular



Meio intracelular

Figura 20. Modelo proposto para a ação da Ceramida-1-fosfato na atividade da PKA e PKC de membrana basolateral.

Ceramida-1-fosfato **P** modula PKA e PKC. Cinases ativadas por Ceramida-1-fosfato fosforilam silenciosamente a Ca^{2+} -ATPase.

6 PERSPECTIVAS FUTURAS E RESULTADOS PRÉVIOS

A reabsorção tubular de Na^+ depende diretamente da atividade da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$, havendo uma correlação direta entre a distribuição e abundância desta enzima e a capacidade de reabsorção de Na^+ nos diferentes segmentos do néfron, sendo o túbulo proximal o segmento onde ocorre a maior parte deste processo (60 a 70% da reabsorção total de Na^+) (FÉRAILLE & DOUCET, 2001).

Identificada por SKOU em 1957 como uma ATPase dependente de Na^+ e de K^+ , a $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ utiliza a energia livre liberada pela hidrólise de ATP para transportar Na^+ e K^+ contra seus gradientes de concentração (LUTZENKO & KAPLAN, 1995). Esta enzima pertence à classe das ATPases do tipo P (P-ATPases), capazes de formar intermediário fosforilado durante seu ciclo catalítico (JORGENSEN *et al.*, 1998; FÉRAILLE & DOUCET, 2001). A $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ é composta de duas cadeias polipeptídicas principais, as subunidades α e β , associadas em uma razão molar de 1:1 (BLANCO *et al.*, 1998).

Nas células tubulares renais, a $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ está localizada na membrana basolateral (SCHWARTZ *et al.*, 1974), gerando um gradiente eletroquímico de Na^+ favorável à sua entrada pela membrana luminal. Esse gradiente é utilizado para o transporte de outros solutos tais como glicose, aminoácidos, H^+ e solutos orgânicos, através de diferentes transportadores ativos secundários (SELDIN & GEIBISCH, 1992).

Além da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$, foi demonstrada a presença de uma segunda bomba de Na^+ , insensível à ouabaína e sensível a furosemida, chamada de $\text{Na}^+ \text{-ATPase}$ (PROVERBIO *et al.*, 1989). Esta enzima apresenta distribuição paralela à $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ e tem atividade cerca de 10 vezes menor que esta enzima. Um grande conjunto de dados indica que a $\text{Na}^+ \text{-ATPase}$ possa ser responsável pelo ajuste

fino da reabsorção de Na^+ no túbulo proximal (CARUSO-NEVES *et al.*, 1997, 1999, 2000 a, 2000 b; RANGEL *et al.*, 1999, 2002).

Sendo a Na^+ -ATPase (responsável pelo ajuste fino das concentrações intracelulares de Na^+) e a $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{ATPase}$ (responsável pelo transporte em massa de Na^+ para fora da célula) transportadores ativos secundários, portanto bombas fundamentais na extrusão de Na^+ da célula e responsáveis por desencadear respostas celulares importantes para manter a homeostasia celular, torna-se de nosso interesse investigar um possível envolvimento dos esfingolipídios bioativos estudados neste trabalho (Cer e C1P) na modulação dessas bombas de Na^+ , acarretando assim em uma possível mudança na geração do gradiente eletroquímico da célula.

Dados prévios obtidos por mim durante o mestrado, mostram que Cer tem um efeito inibitório sobre a Na^+ -ATPase (~ 45%) (Fig. 21), mas não modula a $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{ATPase}$ (Fig 22), já que esta última necessita para sua modulação, do envolvimento de cascatas intracelulares (APERIA *et al.*, 1994), sendo então necessário o estudo em células íntegras para a verificação de uma possível mudança na atividade da $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{ATPase}$ por Cer e C1P, o que não será alvo de estudo em minha Tese de Doutorado. É importante lembrar, que o modelo de nosso estudo são frações de membranas basolaterais isoladas.

Os resultados obtidos neste trabalho, mostram a modulação das proteínas cinases A e C por Cer e C1P, além do envolvimento da PKA na ativação da Ca^{2+} -ATPase de MBL. Com base nesses dados, nosso próximo passo é investigar um possível envolvimento tanto da PKC quanto da PKA, na via de sinalização envolvida na inibição da Na^+ -ATPase por Cer, além do envolvimento dessas cinases na possível modulação da Na^+ -ATPase por C1P.

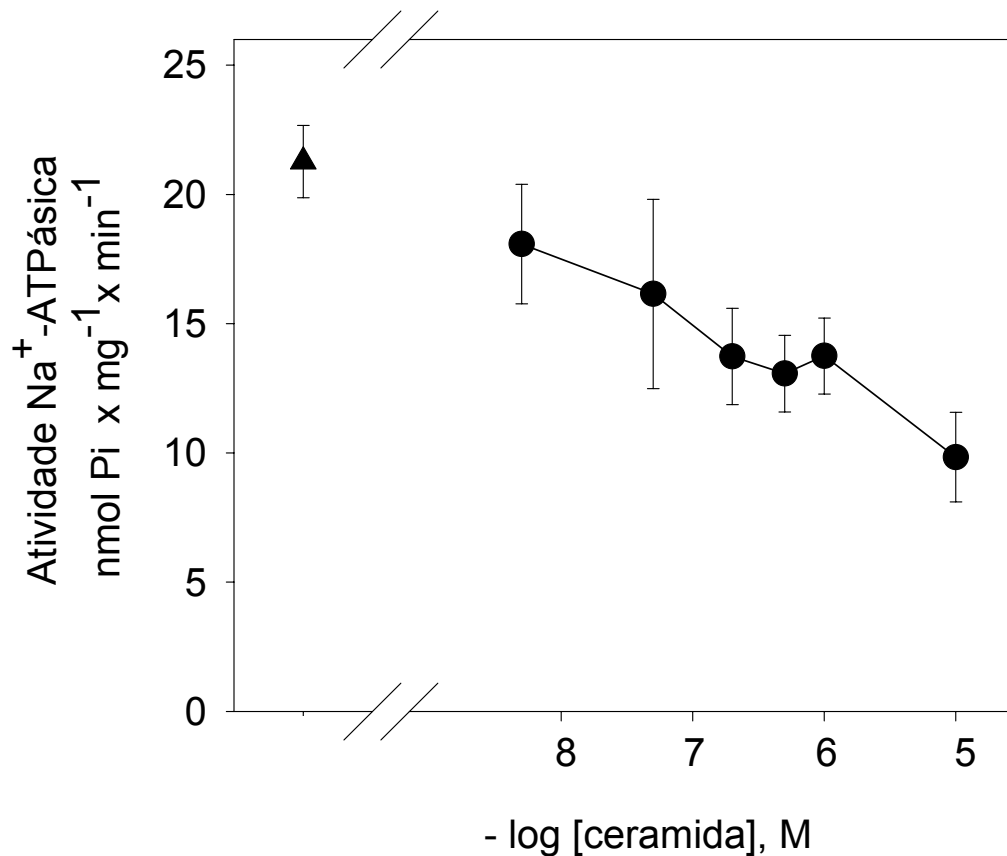


Figura 21. Inibição da Na⁺-ATPase por Cer.

A atividade ATPásica foi medida de acordo com o método previamente descrito (GRUBMEYER E PENEFSKY, 1981). A reação foi iniciada com a adição de MBL isoladas, na presença de concentrações crescentes de Cer, num meio próprio para o total funcionamento da Na⁺-ATPase. O cálculo da atividade Na⁺-ATPásica foi obtido pela diferença de [³²P]P_i liberado na ausência e na presença de furosemida 2 mM (inibidor específico da Na⁺-ATPase), sempre na presença de 0,1 mM de ouabaína (inibidor específico da (Na⁺+K⁺)ATPase (OSSWALD *et al.*, 1977; VALLON, 2003; PROVÉRPIO *et al.*, 1986). A radioatividade do [³²P]P_i liberado foi determinado por cintilação líquida. Os resultados foram expressos como média de 6 experimentos diferentes feitos em triplicata ± erro padrão.

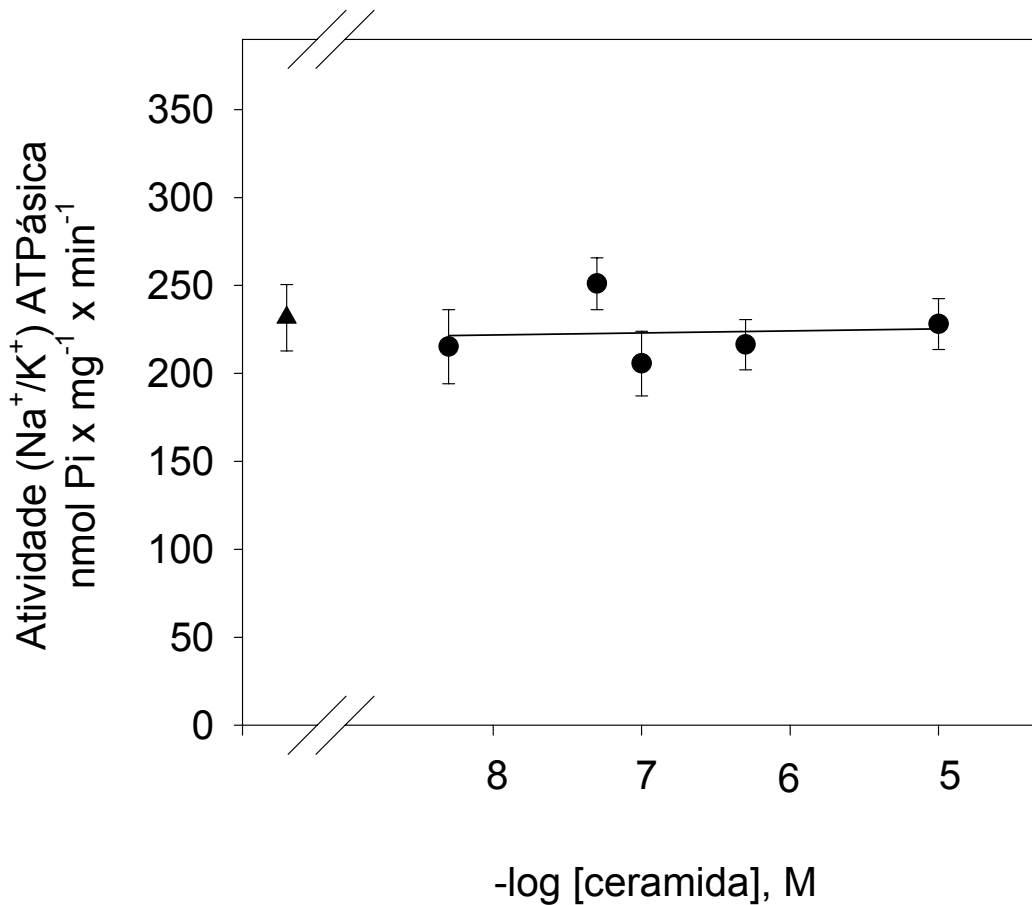


Figura 22. Cer não modula a atividade da (Na⁺+K⁺)ATPase.

A atividade (Na⁺/K⁺)ATPásica foi medida de acordo com o método de dosagem da atividade da Ca²⁺-ATPase (vide Materiais e Métodos). A reação foi iniciada com a adição de ATP 5 mM, na presença de concentrações crescentes de Cer, num meio próprio para o total funcionamento da (Na⁺/K⁺)ATPase, com concentração final de proteína de 0,1 mg x ml⁻¹. O Pi retirado do sobrenadante foi determinado colorimetricamente pelo método de Fiske-Subbarow modificado (TAUSSKY & SHORR, 1952). A atividade da (Na⁺+K⁺)ATPase foi calculada pela diferença da atividade mensurada sem e com ouabaína 0,1 mM (inibidor específico da (Na⁺+K⁺)ATPase). Os resultados foram expressos como média de 5 experimentos diferentes feitos em triplicata ± erro padrão.

Ainda como perspectivas futuras, está a de pesquisar a possível existência de uma CerK na MBL de túbulos proximais renais, já que estudos em localização subcelular da enzima indicam sua predominância na membrana plasmática (HINKOVSKA-GALCHEVA *et al.*, 1998).

A primeira publicação da existência de uma ceramida cinase, foi feita em 1990. A partir daí a enzima foi co-purificada com vesículas sinápticas de cérebro de rato e para sua ativação foram utilizados Ca^{2+} e ATP, sendo também identificada em células HL-60 (KOLESNICK & HEMER, 1990). A caracterização bioquímica da ceramida cinase em lisados de leucócitos, revela seu efeito inibitório por Mg^{2+} e fosfatidilserina, mas a enzima só clonada recentemente (SUGIURA *et al.*, 2002). Essas recentes descobertas levantam ainda muitos questionamentos sobre a enzima CerK, deixando uma gama de perguntas acerca da sua localização, das proteínas envolvidas na sua ativação e das respostas celulares desencadeadas pela C1P.

A predominante localização de SM em rafts lipídicos, assim como a ação organizadora de Cer para a formação destes microdomínios (BOLLINGER *et al.*, 2005), nos levam a pesquisar a possível presença de uma SMase tanto na MBL quanto em cavéolas, acarretando assim na formação local de Cer.

7 REFERÊNCIAS

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. (2002) *Biologia Molecular da Célula*. 3 ed. Rev. e atual. Porto Alegre: Artes Médicas 1294p.
- Anderson, R.G. (1998) The caveolae membrane system. *Annu. Rev. Biochem.* **67**: 199-225.
- Aperia, A., Holtback, U., Syren, M.L., Svensson, L.B., Fryckstedt, J., Greengard, P. (1994) Activation/deactivation of renal Na⁺+K⁺-ATPase: a final common pathway for regulation of natriuresis. *FASEB J.* **8**: 436-439.
- Assunção-Miranda, I., Guilherme, A.L., Reis-Silva, C., Costa-Sarmiento, G., Oliveira, M.M., Vieyra, A. (2005) 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.
- Baijalieh, S.M., Martin, T.E., Floor, E. (1989) Synaptic vesicle ceramide kinase. A calcium-stimulated lipid kinase that co-purifies with brain synaptic vesicles. *J. Biol. Chem.* **264**: 14354-14360.
- Baumruker, T., Bornancin, F., Billich, A. (2005) The role of sphingosine and ceramide kinases in inflammatory responses. *Immunol. Lett.* **96**: 175-185.
- Beltowski, J., Jamroz-Wisniewska, A., Nazar, J., Wójcicka, G. (2004) Spectrophotometric assay of renal ouabain-resistant Na⁺-ATPase and its regulation by leptin and dietary-induced obesity. *Acta Biochim. Polonica* **4**: 1003:1014.
- Berridge, M. J. & Irvine, R.F. (1984) Inositol triphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* **312**: 315-321.
- Bian, X., Hughes, F.M., Huang, Y., Cidlowski, J.A., Putney, J.W. (1997) Roles of cytoplasmic calcium and intracellular calcium stores in induction and suppression of apoptosis in S49 cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **272**: 1241-1249.
- Blanco, G.; Mercer, R.W. (1998) Isozymes of the Na,K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *Am. J. Physiol.* **275**: 633-650.
- Bollinger, C.R., Teichgräber, V., Gulbins, E. (2005) Ceramide-enriched membrane domains. *Biochim. Biophys. Acta* in press.
- Bose, R., Verheij, M., Haimowitz-Friedman, A., Scotto, K., Fuks, Z., Kolesnick, R. (1995) Ceramide synthase mediates daunorubicin-induced apoptosis: an alternative mechanism for generating death signals. *Cell* **82**: 405-414.

- Boumendil-Podevin, E. F. & Podevin, R. A. (1983) 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**: 86–94.
- Bourbon, N.A., Yun, J., Kester, M. (2000) Ceramide directly activates protein kinase C ζ to regulate a stress-activated protein kinase signaling complex. *J. Biol. Chem.* **275**: 35617-35623.
- Cabral, L.M.P., Wengert, M., Da Ressurreição, A., Elias, P.H.P.F., Vieyra, A., Caruso-Neves, C., Einicker-Lamas, M. (2006) Ceramide is a potent activator of plasma membrane Ca^{2+} -ATPase from kidney proximal tubule cells with a cAMP-dependent protein kinase as an intermediate. *J. Biol. Chem.* (submitted).
- Carafoli, E. (1987) Intracellular calcium homeostasis. *Annu. Rev. Biochem.* **56**: 395-433.
- Carafoli, E. (1991) Calcium pump of the plasma membrane. *Physiol. Rev.* **71**: 129-53.
- Carafoli, E. Kessler, F., Falchetto, R., Heim, R., Quadroni, M., Krebs, J., Strehler, E.E., Vorherr, T. (1992) The molecular basis of the modulation of the plasma membrane calcium pump by calmodulin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **671**: 58-69.
- Carafoli, E., Santella, L., Branca, D., Brini, M. (2001) Generation, control, and processing of cellular calcium signals. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **36**: 107-260.
- Carafoli, E. (2002) Calcium signaling: A tale for all seasons. *PNAS.* **99**: 1115-1122.
- Caruso-Neves, C., Francisco-Pedro, L.G., Pantozzi, L.P., Chagas, C., Lopes, A.G. (1997) Effect of adenosine on the ouabain-insensitive Na^{+} -ATPase activity from basolateral membrane of the proximal tubule. *Biochim. Biophys. Acta.* **1329**: 336-344.
- Caruso-Neves, C., Siqueira, A.S.E., Iso-Cohen; G., Lopes, A.G. (1999) Bradykinin modulates the ouabain-insensitive Na^{+} -ATPase activity from membrane of the proximal tubule. *Biochim. Biophys. Acta.* **1431**: 483-491.
- Caruso-Neves, C., Lara, L.S., Rangel, L.B.A., Grossi, A.L., Lopes, A.G. (2000a) Angiotensin-(1-7) modulates the ouabain Na^{+} -ATPase activity from basolateral membrane of proximal tubule. *Biochim. Biophys. Acta.* **1467**: 189-97.
- Caruso-Neves, C., Rangel, L.B.A., Vives, D., Vieyra, A., Coka-Guevara, S., Lopes, A.G. (2000b) Ouabain-insensitive Na^{+} -ATPase activity is an effector protein for cAMP regulation in basolateral membranes of the proximal tubule. *Biochim. Biophys. Acta* **1468**: 107-114.

- Caruso-Neves, C., Coelho-Souza, S.A., Vives, D., Goes, G., Lara, L.S., Lopes, A.G. (2002) Modulation of ouabain-insensitive Na^+ -ATPase activity in the renal proximal tubule by Mg^{2+} , Mg.ATP and furosemide. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **34**: 1586-1593.
- Caruso-Neves, C., Malaquias, A.T., Loss, F.F., Correa da Costa, V.M., Gomes, V.O., Lopes, A.G. (2003) Bradykinin B1 receptor stimulates proximal tubule Na^+ -ATPase activity through protein kinase C pathway. *Reg. Pept.* **115**: 195-201.
- Coelho-Sampaio, T., Teixeira-Ferreira, A., Vieyra, A. (1991) Novel effects of calmodulin and calmodulin antagonists on the plasma membrane ($\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$)ATPase from rabbit kidney proximal tubules. *J. Biol. Chem.* **266**: 10249-10253.
- Colina, C., Cervino, V., Benaim, G. (2002) Ceramide and sphingosine have an antagonistic effect on the plasma-membrane Ca^{2+} ATPase from human erythrocytes. *Biochem. J.* **362**: 247-251.
- Coka-Guevara, S., Markus, R., Caruso-Neves, C., Lopes, A.G., Vieyra, A. (1999) 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**: 71-78.
- Colombaioni, L. & Garcia-Gil, M. (2004) Sphingolipid metabolites in neural signaling and function. *Brain Res. Rev.* **46**: 328-355.
- Cuvillier, O., Pirianov, G., Kleuser, B., Vcanek, P.G., Coso, O.A., Gutkind, S., Spiegel, S. (1996) Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1 phosphate. *Nature (London)* **381**: 800-803.
- Dempsey, E.C., Newton, A.C., Mochly-Rosen, D., Fields, A.P., Reyland, M.E., Insel, P.A., Messing, R.O. (2000) Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses. *Am. J. Physiol.* **279**: 429-438.
- Einicker-Lamas, M., Wenceslau, L.D., Bernardo, R.R., Nogaroli, L., Guilherme, A., Oliveira, M.M., Vieyra, A. (2003) 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.
- Einicker-Lamas, M., Silva, O.F., Nogaroli, L., Bonilha, T.A., Moreno, P.A.M., Tortelote, G.G., Vieyra, A. (2005) Coupling between phosphatidylinositol-4 kinase, diacylglycerol kinase and sphingosine kinase activities in kidney basolateral plasma membranes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* in press.

- Fabiato, A. & Fabiato, F. (1979) Calculator programs for computing the composition of the solutions containing multiple metals and ligands used for experiments in skinner muscle cells. *J. Physiol. (Paris)* **75**: 463-505.
- Férraille, E. & Doucet, A. (2001) Sodium-potassium-adenosinetriphosphatase-depedent. sodium transport in the kidney: hormonal control. *Physiol. Rev.* **81**: 345-417.
- Fukasawa, M., Hanada, K. (1999) Biosynthesis and intracellular trafficking of ceramide. *Seikagaku.* **71**: 1239-43.
- Fukushima, N., Ishii, I., Contos, J.J.A., Weiner, J.A., Chun, J. (2001) Lisophospholipd receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **41**: 507-534.
- Futerman, A. & Hannun, Y.A. (2004) The complex life of simple sphingolipids. *EMBO Rep.* **5**: 777-782.
- Gomez-Muñoz, A. (2004) Ceramide-1-phosphate: a novel regulator of cell activation. *FEBS Lett.* **562**: 5-10.
- Grubmeyer, C., Penefsky, H.S. (1981) The presence of two hydrolytic sites on beef heart mitochondrial adenosine triphosphatic. *J. Biol. Chem.* **256**: 3718.
- Guilherme, A., Reis-Silva, C., Moraes-Albuquerque, J.H., Oliveira, M.M., Vieyra, A. (1998) A novel phosphorylated lipid counteracts activation of the renal plasma membrane (Ca²⁺ + Mg²⁺)ATPase by endogenous phosphatidylinositol-4-phosphate. *Biosci. Rep.* **18**: 79-89.
- Gulbins, E., Dreschers, S., Wilker, B., Grassme, H. (2004) Ceramide, membrane rafts and infections. *J. Mol. Med.* **82**: 357-63.
- Gurr, M.I. & Harwood, J.L. (1991) *Lipid Biochemistry an introduction*. 4. ed. rev. e atual. New York: Chapman & Hall. 406p.
- Hanada K, Kumagai K, Yasuda S, Miura Y, Kawano M, Fukasawa M, Nishijima M. (2003) Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide. *Nature.* **426**: 803-9.
- Hannun, Y.A. & Obeid, L.M. (1995) Ceramide: an intracellular signal for apoptosis. *Trends Biochem. Sci.* **20**: 73-77.
- Hannun, Y.A. (1996) Functions of ceramide in coordinating cellular responses in stress. *Science.* **274**: 1855-1859.

- Hannun, Y.A. & Luberto, C. (2000) Ceramide in the eukaryotic stress response. *Trends Cell Biol.* **10**: 73-80.
- Hinkovska-Galcheva, V.T., Boxer, L.A., Mansfield, P.J., Harsh, D., Blackwood, A., Shayman, J.A. (1998) The formation of ceramide-1-phosphate during neutrophil phagocytosis and its role in liposome fusion. *J Biol Chem.* **273**: 33203-9.
- Hoekstra, D., Maier, O., Van der Wouden, J.M., Slimane, T.A., Van Ljzendoorn, S.C.D. (2003) Membrane dynamics and cell polarity: the role of sphingolipids. *J. Lip. Res.* **44**: 869-877.
- Hokin, M.R., Hokin, L.E. (1953) Enzyme secretion and the incorporation of P32 into phospholipides of pancreas slices. *J. Biol. Chem.* **203**: 967-77.
- Holopainen, J.M., Subramanian, M., Kimmunen, P.K. (1998) Sphingomyelinase induces lipid microdomains formation in a fluid phosphatidylcholine-sphingomyelin membrane. *Biochemistry.* **37**: 17562-17570.
- Holthuis, J.G.M., Pomorski, T., Raggars, J.R., Sprong, H., Meer, G.V. (2001) The organizing potential of sphingolipids in intracellular membrane transport. *Physiol. Rev.* **81**: 1689-1723.
- Huwiler, A., Fabbro, J., Pfeilshifter, J. (1998) Selective ceramide binding to protein kinase C-alpha and -delta isoenzymes in renal mesangial cells. *Biochemistry* **37**: 14556-14562.
- Huwiler, A., Kolter, T., Pfeilshifter, J. and Sandhoff, K. (2000) Physiology and pathophysiology of sphingolipid metabolism and signaling. *Biochim. Biophys. Acta* **1485**: 63-99.
- Inesi, G., Kurzmack, M., Coan, C., Lewis, D.E. (1980) Cooperative calcium binding and ATPase activation in sarcoplasmic reticulum vesicles. *J. Biol. Chem.* **255**: 3025-3031.
- Jayadev, S., Barret, C., Murphy, E. (2000) Elevated ceramide is downstream of altered calcium homeostasis in low serum-induced apoptosis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **279**: 1640-1647.
- Jones, M.J. & Murray, A.W. (1995) Evidence that ceramide selectively inhibits protein kinase C-alpha translocation and modulates bradykinin activation of phospholipase D. *J. Biol. Chem.* **270**: 5007-5013.
- Jorgensen, P.L.; Nielsen, J.M.; Rasmussen, J.H.; Pedersen, P.A. (1998) Structure-function relationships based on ATP binding and cation occlusion at equilibrium in Na,K-ATPase. *Acta Physiol. Scand.*, **643**: 79-87.

- Kolesnick, R.N. & Hemer, M.R. (1990) Characterization of a ceramide kinase activity from human leukemia (HL-60) cells. Separation from diacylglycerol kinase activity. *J Biol Chem.* **265**: 18803-8.
- Kolesnick, R. & Golde, D.W. (1994) The sphingomyelin pathway in tumor necrosis factor and interleukin-1 signaling. *Cell* **77**: 325-328.
- Kolesnick, R.N. & Kronke, M. (1998) Regulation of ceramide production and apoptosis. *Ann. Rev. Physiol.* **60**:643-665.
- Kolesnick, R.N., Goni, F.M, Alonso, A. (2000) Compartmentalization of ceramide signaling: physical foundations and biological effects. *J. Cell Physiol.* **184**: 285-300.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lara, L.S., De Carvalho, T., Leão-Ferreira, L. R., Lopes, A.G, Caruso-Neves, C. (2005) Modulation of the (Na⁺)+K⁺)ATPase activity by Angiotensin-(1-7) in MDCK cells. *Regul. Pept.* **129**: 221-6.
- Liu, P. & Anderson, R.G. (1995) Compartmentalized production of ceramide at the cell surface. *J. Biol. Chem.* **270**: 27179-27185.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Far, A.L., Randall, R.J. (1951) Protein measurements with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Lutzenko, S., Kaplan, J.H. (1995) Organization of P-type ATPases: significance of structural diversity. *Biochemistry.* **34**: 15607-13.
- Maia, J. C. C., Gomes, S. L., Juliani, M. H. (1983) Preparation of (gamma-³²P) and (alpha-³²P) nucleoside triphosphates with high specific activity. In C. M. Morel (Ed.), *Genes of parasites: a laboratory manual* (p. 146–167). Rio de Janeiro, Brazil: Editora Fundação Oswaldo Cruz.
- Means, A.R. (2000) Regulatory cascades involving calmodulin-dependent protein kinases. *Mol. Endocrinol.* **14**: 4-13.
- Meyer zu Heringdorf, D., Van Koppen, C.J., Jakobs, K.H. (1997) Molecular diversity of sphingolipid signalling. *FEBS Lett.* **410**: 34-38.
- Moolenaar, W.H., Kranenburg, O., Postma, F.R. Zondag (1997) Lysophosphatidic acid, G-protein signaling and cellular responses. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**: 168-173.

- Muller, G., Ayoub, M., Storz, P., Rennecke, J., Fabbro, D., Pfizenmaier, K. (1995) PKC zeta is a molecular switch in signal transduction of TNF-alpha bifunctionally regulated by ceramide and arachidonic acid. *EMBO J.* **14**: 1961-1969.
- Nishizuka, Y. (1992) Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* **258**: 607-14.
- Nogaroli, L., Silva, O. F., Bonilha, T. A., Moreno, P. A. M., Bernando, R. R., Vieyra, A., Einicker-Lamas, M. (2005) Diacylglycerol kinase activity in purified basolateral membranes of kidney tubules I. Evidence for coupling with phospholipase C. *J. Biochem. Cell Biol.* **37**: 79-90.
- Nurminen, T.A., Holopainen, J.M., Zhao, H., Kimmunen, P.K. (2002) Observation of topical catalysis by sphingomyelinase coupled to microspheres. *J. Am. Chem. Soc.* **124**: 12129-12134.
- Nowycky, M.C. & Thomas, A.P. (2002) Intracellular calcium signaling. *J. Cell Sci.* **115**: 3715-3716.
- Osswald, H., Hawlina, A., Clasen, U., Heidenreich, O. (1977) Tissue levels of cyclic nucleotides in the rat kidney after administration of furosemide. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **299**: 273-275.
- Parker, P.J. & Murray-Rust, J. (2004) PKC at a glance. *J. Cell Sci.* **117**: 131-2.
- Perry, D.K. & Hannun, Y.A. (1998) The role of ceramide in cell signaling. *Biochim. Biophys. Acta.* **1436**: 233-243.
- Pettus, B.J., Bielawska, A., Subramanian, P., Wijesinghe, D.S., Maceyka, M., Leslie, C.C., Evans, J.H., Freiberg, J., Roddy, P., Hannun, Y.A., Chalfant, C.E. (2004) Ceramide-1-phosphate is a direct activator of cytosolic phospholipase A2. *J. Biol. Chem.* **279**: 11320-11326.
- Preston, G.A., Barret, J.C., Biermann, J.A., Murphy, E. (1997) Effects of alteration in calcium homeostasis on apoptosis during neoplastic progression. *Cancer Res.* **57**: 537-542.
- Proverbio, F., Proverbio, T., Marin, R. (1986) Na⁺-ATPase is a different entity from the (Na⁺ + K⁺)ATPase in rat kidney basolateral plasma membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* **858**: 202-205.
- Proverbio, F., Marín, R., Proverbio, T. (1989) The "second" sodium pump and cell volume. *Curr. Topics Membr. Transp.* **34**: 105-120.

- Rangel, L.B.A., Caruso-Neves, C., Lara, L.S., Brasil, F.L., Lopes, A.G. (1999) Angiotensin II activates the ouabain-insensitive Na⁺-ATPase from renal proximal tubules through a G-protein. *Biochim. Biophys. Acta* **1416**: 309-319.
- Rangel, L.B.A., Malaquias, A.T., Lara, L.S., Silva, I.V., De Souza, A.M., Lopes, A.G., Caruso-Neves, C. (2001) Protein kinase C-induced phosphorylation modulates the Na⁺-ATPase activity from proximal tubules. *Biochim. Biophys. Acta* **1512**: 90-97.
- Rangel, L.B.A., Caruso-Neves, C., Lara, L.S., Lopes, A.G. (2002) Angiotensin II stimulates renal proximal tubule Na⁺-ATPase activity through the activation of protein kinase C. *Biochim. Biophys. Acta* **1564**: 310-316.
- Razani, B., Woodman, S.E., Lisanti, M.P. (2002) Caveolae: From cell biology to animal physiology. *Pharmacol. Rev.* **54**: 431-467.
- Rothberg, K.G., Heuser, J.E., Donzell, W.C., Ying, Y.S., Glenney, J.R., Anderson, R.G. (1992) Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell*. **68**: 673-682.
- Ruvolo, P.P. (2001) Ceramide regulates cellular homeostasis via diverse stress signaling pathways. *Leukemia* **15**: 1153-1160.
- Ruvolo, P.P. (2002) Intracellular signal transduction pathways activated by ceramide and its metabolites. *Pharmacolog. Res.* **47**: 383-392.
- Schauf, C., Moffet, D., Moffet, S. (1993) Fisiologia Humana, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil.
- Schwartz, I.L., Schlatz, L.J., Kinne-Saffran, E., Kinne, R. (1974) Target cell polarity and membrane phosphorylation in relation to the mechanism of action of antidiuretic hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **71**: 2595-2599.
- Seldin, D.W. & Geibisch, G. (1992) The Kidney: Physiology and Pathophysiology. *New York: Raven Press*.
- Shayman, J.A. (2000) Sphingolipids. *Kidney Int.* **58**: 11-26.
- Shono, M., Wada, M., Fijii, T. (1995) Partial purification of a Na⁺-ATPase from the plasma membrane of the marine alga heterosigma akashiwo. *Plant Physiol.* **108**: 1615-1621.
- Simons, K. & Ikonen, E. (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**: 569-572.

- Skou, J.C. (1957) The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochim Biophys Acta*. **23**: 394-401.
- Sorenson, M.M., Coelho, H.S.L., Reuben, J.P.(1986) Caffeine inhibition of calcium accumulation by the sarcoplasmic reticulum in mammalian skinned fibers. *J. Membr. Biol.* **90**: 219-230.
- Spiegel, S. & Merrill Jr., A.H. (1996) Sphingolipid metabolism and cell growth regulation. *FASEB J.* **10**: 1388-1397.
- Spiegel, S & Milstien, S. (2003) Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signaling lipid. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **4**: 397-407.
- Strehler, E.E. & Zacharias, D.A. (2001) Role of alternative splicing in generating isoform diversity among plasma membrane calcium pumps. *Physiol. Rev.* **81**: 21-50.
- Sugiura, M., Kono, K., Lui, H., Shimizugawa, T., Minekura, H., Spiegel, S., Kohama, T. (2002) Ceramide kinase, a novel lipid kinase. *Biochem. J.* **277**: 23294-23300.
- Suzuki, Y., Ueno, S., Ohnuma, R., Koyama, N. (2005) Cloning, sequencing and functional expression in *Escherichia coli* of the gene for a P-type Na⁺-ATPase of a facultatively anaerobic alkaliphile, *exiguobacterium aurantiacum*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1727**: 162-168.
- Szabò, I., Adam, C., Gulbins, E. (2004) Ion channels and membrane rafts in apoptosis. *Pflug. Arch.* **448**: 304-312.
- Taussky, H.H. & Shorr, E. (1952) A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. *J. Biol. Chem.* **202**: 675 –682.
- Thomas, L.E., Burguillos, L., Del Castillo, J.R. (2003) Backdoor phosphorylation of basolateral plasma membranes of small intestinal epithelial cells: characterization of a furosemide-induced phosphoprotein related to the second sodium pump. *ABB.* **419**:190-197.
- Tornquist, K., Blom, T., Shariatmadari, R., Pasternack, M. (2004) Ceramide 1-phosphate enhances calcium entry through voltage-operated calcium channels by a protein kinase C-dependent mechanism in GH4C1 rat pituitary cells. *Biochem. J.* **380**:661-668.
- Tortelote, G.G., Valverde, R.H., Lemos, T., Guilherme, A., Einicker-Lamas, M., Vieyra, A. (2004) The plasma membrane Ca²⁺ pump from proximal kidney tubules is exclusively localized and active in caveolae. *FEBS Lett.* **576**: 31-5.

- Ueda, N., Kaushal, G.P., Hong, X., Shah, S.V. (1998) Role of enhanced ceramide generation in DNA-damage and cell death in chemical hypoxic injury to LLC PK1 cells. *Kidney Int.* **54**: 399-406.
- Ueda, N., Kaushal, G.P., Shah, S.V. (2000) Apoptotic mechanisms in acute renal failure. *Am. J. Med.* **108**: 403-415.
- Ueno, S., Kaieda, N., Koyama, N. (2000) Characterization of a P-type Na⁺-ATPase of a facultatively anaerobic alkaliphile, *exiguobacterium aurantiacum*. *J. Biol. Chem.* **19**: 14537-14540.
- Vallon, V., Blantz R.C., Thomson S. (2003) Glomerular hyperfiltration and the salt paradox in early (corrected) type 1 diabetes mellitus: a tubulo-centric view. *J. Am. Soc. Nephrol.* **14**: 530-537.
- Valverde, R.H., Tortelote, G.G., Lemos, T., Mintz, E., Vieyra, A. (2005) 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.* **34**:30611-8.
- Van Blitterswijk, W.J., van der Luit, A.H., Veldman, R.J., Verheij, M., Borst, J. (2003) Ceramide: second messenger or modulator of membrane structure and dynamics? *Biochem. J.* **369**: 199-211.
- Veiga, M.P., Arrondo, J.L., Goni, F.M., Alonso, A. (1999) Ceramides in phospholipid membranes: effects on bilayer stability and transition to nonlamellar phases. *Biophys. J.* **76**: 342-350.
- Venkataraman, K. & Fulerman, A.H. (2000) Ceramide as a second messenger: stick solutions to stick problems. *Trends Cell Biol.* **10**: 408-412.
- Vieyra, A., Nachbin, L., de Dios-Abad, E., Goldfeld, M., Meyer-Fernandes, J.R., de Moraes, L. (1986) Comparison between calcium transport and adenosine triphosphatase activity in membrane vesicles derived from rabbit kidney proximal tubules. *J. Biol. Chem.* **9**:4247-55.
- Vieyra, A. (1996) Catalytic and structural modifications of sarcoplasmic reticulum and plasma membrane (Ca²⁺ + Mg²⁺) ATPases induced by organic solutes that accumulate in living systems. *Biosci Rep.* **16**: 115-27
- Wengert, M., Jr., C.B., Kaufman, J., Leão-Ferreira, L.R., Paes-de-Carvalho, R., Lopes, A.G., Caruso-Neves, C. (2005) Stimulation of the proximal tubule Na⁺-ATPase activity by adenosine A_{2A} receptor. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **37**: 155-165.

- Westwick, J.K., Bielawska, A.E., Dbaiho, G., Hannun, Y.A., Brenner, D.A. (1995) Ceramide activates the stress-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.* **270**: 22689-22692.
- White, K.E., Gesek, F.A., Nesbitt, T., Drezner, M.K. (1997) Friedman P.A. Molecular dissection of Ca²⁺ efflux in immortalized proximal tubule cells. *J. Gen. Physiol.* **109**: 217-228.
- Zager, R.A., Iwata, M., Conrad, D.S. (1997) Altered ceramide and sphingosine expression during the induction phase of ischemic acute renal failure. *Kidney Int.* **52**: 60-70.
- Zager, R.A., Conrad, D.S., Lockhead, K. (1998) Altered sphingomyelinase and ceramide expression in the setting of ischemic and nephrotoxic acute renal failure. *Kidney Int.* **53**: 573-582.
- Zhang, H., Desai, N.N., Olivera, A., Seki, T., Brooker, G., Spiegel, S. (1991) Sphingosine-1 phosphate, a novel lipid, involved in cellular proliferation. *J. Cell Biol.* **114**: 155-167.

8 ARTIGO SUBMETIDO NO *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*

----- Mensagem encaminhada de dsumner@asbmb.org -----

Data: Sat, 8 Jul 2006 01:01:58 -0700

De: dsumner@asbmb.org

Endereço para Resposta (Reply-To): dsumner@asbmb.org

Assunto: From the JBC re: Manuscript M6:06481

Para: einicker@biof.ufrj.br

M6:06481

Dear Dr. Einicker-Lamas:

We have received your manuscript entitled:

"Ceramide is a potent activator of plasma membrane Ca²⁺-ATPase from kidney proximal tubule cells with a cAMP-dependent protein kinase as an intermediate".

It has been given the number M6:06481 and has been assigned to:

Dr. Thomas C. Vanaman

Dept of Molecular & Cellular Biochemistry

University of Kentucky Medical Center

B145 Biomedical/Biological Sciences Research Building

741 S. Limestone Street

Lexington, KY 40536-0509

Tel: 859-323-8182

Fax: 859-257-9670

E-mail: dsumner@asbmb.org

CERAMIDE IS A POTENT ACTIVATOR OF PLASMA MEMBRANE Ca^{2+} -ATPase FROM KIDNEY PROXIMAL TUBULE CELLS WITH A cAMP-DEPENDENT PROTEIN KINASE AS AN INTERMEDIATE

Lindsey M. P. Cabral¹, Mira Wengert², Alexandre A.A. da Ressurreição¹,
Pedro H.P.F. Elias¹, Fernando G. Almeida¹, Adalberto Vieyra¹, Celso Caruso-Neves² and
Marcelo Einicker-Lamas¹

From the ¹Laboratório de Físico-Química Biológica Aída Hassón-Voloch and ²Laboratório de Bioquímica Renal, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21949-900, Rio de Janeiro, Brazil

Address correspondence to: Marcelo Einicker Lamas, Laboratório de Físico-Química Biológica Aída Hassón-Voloch, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21949-900, Rio de Janeiro, Brazil. Tel. +55 21 2562 6520; Fax. +55 21 2280 8193; E-Mail: einicker@biof.ufrj.br

The kidney proximal tubules are involved in the reabsorption of two-thirds of the glomerular ultrafiltrate, a key Ca^{2+} -modulated process that is essential for the homeostasis of body fluid compartments. The basolateral membranes of these cells have a Ca^{2+} -ATPase which is thought to be responsible for the fine regulation of intracellular Ca^{2+} levels. In this paper we show that nanomolar concentrations ($\text{pA} \approx 8.5$) of ceramide, a natural product derived from sphingomyelinase activity in biological membranes, double Ca^{2+} -ATPase activity in purified basolateral membranes. The stimulatory effect of ceramide occurs through specific activation of a cAMP-dependent protein kinase pathway (blocked by 10^{-8} M of the specific inhibitor of PKA, the 5–22 peptide). The activation of PKA by ceramide results in phosphorylation of the Ca^{2+} -ATPase, as detected by an anti-Ser/Thr specific PKA substrate antibody. The potent effect of ceramide reveals a new physiological activator of the plasma membrane Ca^{2+} -ATPase, which integrates the regulatory network of glycerolipids and sphingolipids present in the basolateral membranes of kidney cells.

Important processes of molecular transport take place across the epithelium of kidney proximal tubules. The basolateral membranes (BLM) from kidney proximal tubules cells contain different active transporters, or ion pumps, such as the very

abundant $\text{Na}^{+}\text{K}^{+}$ -ATPase, which is considered the molecular machinery responsible for the reabsorption of Na^{+} (1). There are other ion pumps that are not so numerous, but they play important roles in the fine regulation of intracellular ion concentrations, such as the plasma membrane calcium pump. Our group has recently shown that Ca^{2+} -ATPase is exclusively localized and active in caveolin-cholesterol-rich membrane microdomains or lipid rafts in the kidney BLM (2). We have also detected in these membranes the presence of different cell signaling systems that can act through the activation of different lipid kinases, with further generation of bioactive molecules (3–5), or through the activation of different protein kinases that are associated with the BLM (6–9).

The localization of the BLM Ca^{2+} -ATPase in caveolin-cholesterol-rich domains brings ceramides to the emerging potential regulatory network present in these membranes, since those regulatory microdomains are also rich in sphingolipids (10). Rafts are thought to be present in the outer leaflet of the cell membrane, where sphingomyelin (SM), the precursor of ceramide (Cer) in a pathway catalyzed by sphingomyelinases (SMases), appears to be predominantly located. An important concept is that the assembly of the outer lipid rafts would alter the inner leaflet thus enabling coordination of the different steps required for signal transduction; for review, see (11).

Many studies in the last decade have shown that smaller lipid rafts are merged into large membrane domains upon hydrolysis of SM and generation of Cer (12–14); see also (11) for review. The

generation of Cer molecules and their self-association leads to dramatic changes in plasma membranes with further formation of small Cer-rich microdomains, which are able to spontaneously fuse to others resulting in large domains called plattforms (14–16). Therefore, Cer-enriched microdomains seem to play an important role in facilitating and amplifying signaling processes, via different types of cell surface receptors, resulting in clusters of receptors and other cell signaling machinery for an effective transduction of different signals (11).

Moreover, the importance of Cer in different cell processes is not only related to its physicochemical properties, but Cer can be also considered a cell signaling molecule with different roles in the different subcellular compartments; for review, see (17).

Classically, Cer generation occurs either by the activation of SM, or via *de novo* synthesis (18–20). Due to its analogy with diacylglycerol (DAG), Cer has been suggested to fulfill a second messenger function by direct binding to different intracellular targets (21, 22). Some of these targets have already been studied, such as different sets of protein kinases and protein phosphatases (19, 23, 24). Although different studies report atypical PKC, principally PKC ζ , as the primary ceramide-activated PKC (24–26), there are some reports of a direct association of Cer with PKC α and PKC δ in kidney cells (27, 28).

The termination of the second messenger action of Cer is considered to be mostly mediated by the activation of ceramidases that hydrolyze Cer to form sphingosine (Sph), another bioactive sphingolipid. More than 10 years ago it was suggested that Cer could also be phosphorylated by a ceramide kinase (CerK) resulting in another bioactive sphingolipid, ceramide-1-phosphate (C1P), with a broad spectrum of cellular targets (28–30) including PLA₂ (31) and ion channels (32, 33).

Due to the preferential formation of Cer in the lipid rafts, and being the Ca²⁺-ATPase exclusively placed in cholesterol-caveolin-rich lipid rafts in the BLM (2), we decided to investigate the effects of Cer and C1P on the kidney proximal tubule BLM Ca²⁺-ATPase, as well as the cell signaling cascade that could be involved.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials – Buffers, bovine serum albumin and protease inhibitors were obtained from Sigma Chemical Co. (Saint Louis, MO). Percoll was from Pharmacia (Uppsala, Sweden). Distilled water deionized with the Milli-Q system of resins (Millipore Corp., Marlborough, MA) was used to prepare all solutions. ³²P_i was obtained from IPEN (São Paulo, Brazil). [γ -³²P]ATP was prepared as described by Maia et al. (34). Ceramide (from bovine brain), ceramide-1-phosphate and histone H8 were purchased from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO). All other reagents were the highest purity available. Antibody against plasma membrane Ca²⁺-ATPase (clone 5f10) was from Affinity Bioreagents (Golden, CO). The phosphor-Ser/Thr PKA substrate polyclonal antibody was from Cell Signaling Technology (Beverly, MA). Nitrocellulose membrane (Hybond) and the ECLTM system were from Amersham Biosciences (Buckinghamshire, UK). X-OmatTM diagnostic film was from Eastman Kodak Co. (Resende, Brazil). 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.

Isolation of Basolateral Membranes (BLM) – The external portion of the cortex was carefully removed and purified basolateral membranes (BLM) derived from kidney proximal tubules were prepared using the Percoll gradient method (35). Controls for contamination with other membranes were carried out as previously described (6, 36). The specific activity of the basolateral membrane marker (Na⁺+K⁺)ATPase (260.8 ± 1.6 nmol/mg per min) was enriched five-fold when compared to that measured in the starting kidney cortex homogenate. The membranes were stored in 250 mM sucrose in liquid N₂, which preserved marker activity for at least 5 months.

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. (37) with

the addition of 5% SDS in the samples, and bovine serum albumin as standard.

Determination of Plasma Membrane Ca²⁺-ATPase Activity – The membranes were preincubated at 37°C for 10 min in a medium containing 50 mM Bis-tris-propane buffer (pH 7.4), 5 mM MgCl₂, 10 mM Na₂N₃, 0.5 mM ouabain, contaminant CaCl₂ (10 μM) and the concentrations of Cer or CIP indicated in the figures or figure legends. After 10 min sonication (Unique Sonifier Cleaner) the samples were supplied with 120 mM KCl and then with 5 mM ATP. When indicated, 10⁻¹² M calphostin C (the inhibitor of PKC) or 10⁻⁸ M PKA_i (the 5–22 inhibitor peptide of PKA) were added to the preincubation media. The reaction was stopped after 20 min by adding 1.5 ml of activated charcoal in 0.1 N HCl to each tube. After centrifugation in a clinical centrifuge (2000 rpm), aliquots of the supernatants (0.5 ml) were removed to new glass tubes to measure the amount of P_i released using the colorimetric method of Taussky and Shorr (38). The Ca²⁺-ATPase activity was calculated by the difference of the activity measured without and in the presence of 2 mM EGTA.

Determination of Protein Kinase C Activity – The PKC activity was determined using histone H8 as a substrate for potential kinases present in BLM. Briefly, the γ-³²P phosphoryl group from radiolabelled ATP obtained by the method mentioned above (34), was transferred to the histone in an incubation medium consisting of 4 mM MgCl₂, 20 mM HEPES–Tris (pH 7.0), histone H8 (1.5 mg/ml) and BLM preparation (0.5 mg/ml) in a final volume of 0.1 ml. The reaction was initiated by adding [γ-³²P]ATP (7 μCi/μmol). After 10 min at 37°C the reaction was stopped with the addition of 0.1 ml TCA 40% (w/v) and immediately placed on an ice bath. The content of each experimental tube was filtered using 0.45 μm Millipore filters and the filters were then washed with TCA 20% and phosphate buffer (2 mM, pH 7.0) to remove the non-utilized [γ-³²P]ATP. The radioactivity incorporated into the histone was determined by liquid scintillation (Packard Tri-Carb 2100 TR), and the PKC activity measured as the difference between calphostin C (PKC inhibitor)-free tubes and calphostin C-containing tubes. Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA, 10⁻¹² M), a phorbol

ester, was also used to show the presence of functional PKC in the BLM fractions.

Determination of Protein Kinase A Activity – We used the same method described for the determination of PKC activity, but the PKA activity was measured as the difference between tubes incubated in the absence and presence of 10⁻⁸ M PKA_i, the 5–22 PKA inhibitor peptide. A control with 10⁻⁷ M cAMP showed that there is a PKA activity associated with BLM.

SDS-PAGE and Immunoblotting – Electrophoresis of BLM proteins, followed by immunodetection of Ca²⁺-ATPase by 5f10 antibody and phospho-Ser/Thr residues (in the sequence recognized by PKA) was carried out as described recently (2, 39).

Regulatory Phosphorylation of Ca²⁺-ATPase – Phosphorylation of Ca²⁺-ATPase was also assayed as described recently (39), with slight modifications. The membranes were preincubated with the reaction medium employed to measure the Ca²⁺-ATPase activity (no ATP) in the presence of Cer (5 × 10⁻⁸ M), calphostin C (10⁻¹² M) and PKA_i (10⁻⁸ M) in the combinations shown in the corresponding figure legends. The phosphorylation reaction in the PKA assays was started by adding 5 mM cold ATP and phospho-Ser/Thr residues were recognized with the PKA substrate polyclonal antibody as described above. Phosphorylation of Ca²⁺-ATPase by PKC was assayed in the same medium employed for the PKA assay, except that [γ-³²P]ATP (5 × 10⁷ cpm/μmol) was used as follows. After 20 min the reaction (200 μl; 100 μg of BLM protein) was stopped with 50 μl of sample buffer (2.31 g DTT; 3 g SDS; 12 ml of 1.0 M Tris, pH 6.8; 15 ml of 10% glycerol in 50 ml final volume in water) and 100 μl of the solubilized samples were applied in each slot for SDS-PAGE (10% acrylamide) as described. The gel proteins were transferred to a nitrocellulose membrane which was exposed overnight to a phosphor screen and analyzed using a PhosphorImager Storm 860 (Molecular Dynamics, Amersham Pharmacia Biotech) to measure the intensity of the 140 kDa ³²P-phosphorylated bands recognized by 5f10 antibody. Phosphorylation of Ca²⁺-ATPase by the BLM-resident PKC was quantified by the difference in band intensity in the absence or presence of 10⁻¹² M calphostin C.

RESULTS

Fig. 1 (open circles) shows that increasing concentrations of Cer in the nanomolar range ($pA \approx 8.5$) stimulates Ca^{2+} -ATPase activity up to ~100% over control. We also tested C1P, the phosphorylated derivative of Cer, which was ineffective in modulating Ca^{2+} -ATPase activity (filled circles). The observed effect of Cer could be a consequence of structural changes in the membrane like those observed upon SMase activation and Cer release (14–16), or to a direct activation of protein kinases, which are targets for Cer in intracellular compartments. Since PKC and PKA appear to be involved in the modulation of Ca^{2+} -ATPase from different sources (39, 40) including renal tissue (6, 8), the following experiments investigated whether Cer modulates PKC and PKA, two of the renal BLM-resident kinases (7, 8).

Fig. 2 shows that incubation of BLM with a Cer concentration (2×10^{-7} M) that promotes maximal Ca^{2+} -ATPase turnover, also doubles PKC activity; this stimulation is equivalent to that promoted by 10^{-12} M phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA), a classic activator of PKCs (41). Although Cer strongly increases BLM PKC this process is not associated with stimulation of Ca^{2+} -ATPase by Cer, since calphostin C does not prevent its effect on Ca^{2+} -ATPase activity (Fig. 3). Indeed, activation of PKC in different ways by hormones and autacoids promotes inhibition rather than stimulation of Ca^{2+} -ATPase in BLMs (6, 8); see also inset to Fig. 3.

The ability of Cer to activate cAMP-dependent protein kinases (PKA) was also tested (Fig. 4). Cer (2×10^{-7} M) induces a three-fold increase in PKA that mimics that found with cAMP. In this case the effect of Cer on PKA is associated with the stimulation of Ca^{2+} -ATPase, since with simultaneous addition of PKA_i the influence of Cer is no longer seen (Fig. 5).

That activation of PKC and PKA by Cer is associated with subsequent phosphorylation of Ca^{2+} -ATPase, is demonstrated in Figs. 6 and 7. Fig. 6A,C shows that addition of 5×10^{-8} M Cer increases the basal hydroxylamine-resistant phosphorylation of a 140 kDa band (recognized by the monoclonal antibody 5f10 against Ca^{2+} -ATPase as in Fig. 6B). This phenomenon mimics

that observed with the PKC activator PMA (10^{-12} M) and both were inhibited by calphostin C.

Correlation between the addition of Cer and regulatory phosphorylation of Ca^{2+} -ATPase by PKA is revealed by the experiments shown in Fig. 7. When anti-phospho-Ser/Thr PKA substrate antibody was used, it was possible to demonstrate that Cer promotes a significant increase in the basal PKA_i-sensitive phosphorylation of Ca^{2+} -ATPase. These results imply that Cer is involved in an important regulatory network with different cell signaling cascades that are present in BLM.

DISCUSSION

Efficiently regulated fluid transport across the tubular epithelium is one of the principal functions of kidneys. Different cell signaling systems act in active transporters located at the BLM (1). The vectorial transport in polarized epithelial renal cells is the result of two coordinated main steps of transport across the luminal and basolateral faces of these cells. It has been demonstrated that sphingolipids are involved in both differential sorting of membrane components and in cell signaling processes, either by organizing regulatory membrane microdomains (rafts and caveolae) or by direct triggering of cellular effectors (17, 24, 42, 43).

The evidence that Ca^{2+} -ATPase is exclusively placed and active in caveolin-cholesterol-rich lipid rafts in the BLM (2), led to the hypothesis that raft lipids may be involved in the regulation of intracellular Ca^{2+} concentrations. In this paper we show that Cer stimulates both PKC and PKA (Figs. 2 and 4) and is also a modulator of Ca^{2+} -ATPase activity. It is important to reinforce that Cer is a natural candidate for Ca^{2+} -ATPase regulation due to its relevance as organizer of the so-called cell signaling platforms in plasma membranes (14–16). Cer is also implicated in the activation or inhibition of several effector proteins, which may have potential influence in Ca^{2+} signaling (11, 24, 44). From these results emerges the question of why phosphorylation of Ca^{2+} -ATPase after stimulation of PKA by Cer (Figs. 4 and 7) leads to its activation, whereas Cer-induced stimulation of PKC (Fig. 2) and subsequent phosphorylation of Ca^{2+} -ATPase (Fig. 6) has no influence in the Ca^{2+} pump? It is known that renal Ca^{2+} -ATPase is inhibited when PKC α is triggered

by hormones and autacoids (6, 8), or by direct activation of PKC by PMA (inset to Fig. 3). Therefore the lack of influence of Cer on Ca^{2+} -ATPase activity in spite of a clear calphostin C-sensitive phosphorylation of the pump may mean that a PKC different from the α -isoform may be responsible for phosphorylation of the pump in other domains, which may be silent in terms of regulation. The existence of PKC ζ has been immunodetected in purified BLM from kidney tubules (Caruso-Neves, personal communication) and Cer is considered a direct activator of PKC ζ in processes that involve MAPK cascades in several tissues, including kidney (25, 26). Besides PKC α , Cer can activate PKC δ in kidney mesangial cells (27), a demonstration that Cer generation plays a pivotal role in a myriad of PKC-mediated events in kidney, apart from those mediated by PKA.

The combined results of Figs. 4, 5 and 7 indicate that a signaling cascade starting with Cer is an efficient pathway for the activation of Ca^{2+} -ATPase in renal proximal tubules cells, with a resident PKA as intermediate. In these membranes, activators of PKA such as cholera toxin or forskolin also stimulate the ouabain-insensitive Na^{+} -ATPase (7, 45), another example of the participation of this kinase in the regulation of ion pumping activity. These observations reveal the importance of PKA in the fine control of Ca^{2+} and Na^{+} fluxes in a nephron segment where reabsorption of more than two-thirds of glomerular ultrafiltrate takes place. We recently demonstrated that PKA mediates activation of the Ca^{2+} -ATPase from electrocytes (39), in a signaling route which has calmodulin and calmodulin dependent kinase

II as early components of this special activating pathway. The data presented in this paper, where nanomolar concentrations of Cer doubles Ca^{2+} -ATPase activity, allow us to postulate that Cer can be considered a lipidic calmodulin-like activator of ATP-dependent Ca^{2+} transport across the plasma membrane.

It has been demonstrated that elevation of Cer levels in kidney occurs after disruption of cellular Ca^{2+} homeostasis and as a result of an increased Ca^{2+} -dependent sphingomyelinase activity (46–48). In whole cells, activation of active Ca^{2+} pumping could be hypothesized as a compensatory mechanism against sustained and harmful increases in cytosolic Ca^{2+} . Finally, two other mechanisms could be coupled to Cer-mediated regulation of the Ca^{2+} -ATPase: first, the well-known influence of Cer in merging small lipid rafts in which Ca^{2+} -ATPase is exclusively localized in kidney BLM (2) could favor Cer-guided oligomerization of ATPase units followed by their activation (49, 50). Second, Cer-stimulated and PKA-mediated phosphorylation of the pump may help calmodulin in its direct activation of Ca^{2+} -ATPase by reducing the binding of the autoinhibitory domain (40).

To our knowledge, the present work shows for the first time that Cer can modulate Ca^{2+} -ATPase, an ion pump placed in the plasma membrane, by triggering membrane-associated PKA. The above results include Cer in the regulatory network of bioactive sphingolipids and glycerolipids resident in the BLM from proximal kidney tubules.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Ms. Ivone Diniz Barbosa for technical support. This work was supported by grants from CNPq and FAPERJ.

REFERENCES

1. Assunção-Miranda, I., Guilherme, A. L., Reis-Silva, C., Costa-Sarmiento, G., Oliveira, M. M., and Vieyra, A. (2005) *Regul. Pept.* **127**, 151–157
2. Baumruker, T., Bornancin, F., and Billich, A. (2005) *Immunol. Lett.* **96**, 175–185
3. Bian, X., Hughes, F. M., Huang, Y., Cidlowski, J. A., and Putney, J. W. (1997) *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **272**, C1241–C1249
4. Bollinger, C. R., Teichgräber, V., and Gulbins, E. (2005) *Biochim. Biophys. Acta* **1746**, 284–294

5. Bose, R., Verheij, M., Haimowitz-Friedman, A., Scotto, K., Fuks, Z., and Kolesnick, R. (1995) *Cell* **82**, 405–414
6. Boumendil-Podevin, E. F., and Podevin, R. A. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* **735**, 86–94
7. Bourbon, N. A., Yun, J., Kester, M. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 35617–35623
8. Carafoli, E., Santella, L., Branca, D., and Brini, M. (2001) *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **36**, 107–260
9. Caruso-Neves, C., Rangel, L. B. A., Vives, D., Vieyra, A., Coka-Guevara, S., and Lopes, A. G. (2000) *Biochim. Biophys. Acta* **1468**, 107–114
10. Coelho-Sampaio, T., Teixeira-Ferreira, A., and Vieyra, A. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 10249–10253
11. Coka-Guevara, S., Markus, R. P., Caruso-Neves, C., Lopes, A. G., and Vieyra, A. (1999) *Eur. J. Biochem.* **263**, 71–78
12. Colombaioni, L., and Garcia-Gil, M. (2004) *Brain Res. Rev.* **46**, 328–355
13. Einicker-Lamas, M., Wenceslau, L. D., Bernardo, R. R., de Bittencourt-Navarrete, L. N. C., Guilherme, A., Oliveira, M. M., et al. (2003) *J. Biochem.* **134**, 529–536
14. Einicker-Lamas, M., Silva, O. F., Nogaroli, L., Bonilha, T. A., Moreno, P. A. M., Tortelote, G. G., Vieyra, A. (2006) unpublished
15. Féraille, E., and Doucet, A. (2001) *Physiol. Rev.* **81**, 345–417
16. Futerman, A., and Hannun, Y. A. (2004) *EMBO Rep.* **5**, 777–782
17. Gomez-Muñoz, A. (2004) *FEBS Lett.* **562**, 5–10
18. Gulbins, E., Dreschers, S., Wilker, B., and Grassme, H. (2004) *J. Mol. Med.* **82**, 357–363
19. Hannun, Y. A. (1996) *Science* **274**, 1855–1859
20. Hannun, Y. A., and Luberto, C. (2000) *Trends Cell Biol.* **10**, 73–80
21. Hoekstra, D., Maier, O., van der Wouden, J. M., Slimane, T. A., and van Ijzendoorn, S. C. D. (2003) *J. Lipid Res.* **44**, 869–877
22. Holopainen, J. M., Subramanian, M., and Kimmunen, P. K. (1998) *Biochemistry* **37**, 17562–17570
23. Huwiler, A., Fabbro, J., and Pfeilshifter, J. (1998) *Biochemistry* **37**, 14556–14562
24. Huwiler, A., Kolter, T., Pfeilshifter, J., and Sandhoff, K. (2000) *Biochim. Biophys. Acta* **1485**, 63–99
25. Jayadev, S., Barret, C., and Murphy, E. (2000) *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **279**, C1640–C1647.
26. Kolesnick, R. N., and Kronke, M. (1998) *Annu. Rev. Physiol.* **60**, 643–665
27. Kosk-Kosicka, D., and Bzdega, T. (1990) *Biochemistry* **29**, 3772–3777
28. Liu, P., and Anderson, R. G. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 27179–27185
29. Liu, W. S., and Heckman, C. A. (1998) *Cell Signal.* **10**, 529–542
30. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.* **193**, 265–275
31. Maia, J. C. C., Gomes, S. L., and Juliani, M. H. (1983) In C. M. Morel (Ed.), *Genes of Parasites: A Laboratory Manual* (pp. 146–167). Editora Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil
32. Muller, G., Ayoub, M., Storz, P., Rennecke, J., Fabbro, D., and Pfizenmaier, K. (1995) *EMBO J.* **14**, 1961–1969
33. Nogaroli, L., Silva, O. F., Bonilha, T. A., Moreno, P. A. M., Bernardo, R. R., Vieyra, A., and Einicker-Lamas, M. (2005) *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **37**, 79–90
34. Nurminen, T. A., Holopainen, J. M., Zhao, H., and Kimmunen, P. K. (2002) *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 12129–12134
35. Pettus, B. J., Bielawska, A., Subramanian, P., Wijesinghe, D. S., Maceyka, M., Leslie, C. C., Evans, J. H., Freiberg, J., Roddy, P., Hannun, Y. A., and Chalfant, C. E. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 11320–11326
36. Preston, G. A., Barret, J. C., Biermann, J. A., and Murphy, E. (1997) *Cancer Res.* **57**, 537–542
37. Rangel, L. B., Caruso-Neves, C., Lara, L. S., and Lopes, A. G. (2001) *Biochim. Biophys. Acta* **1564**, 310–316

38. Ruvolo, P. P. (2001) *Leukemia* **15**, 1153–1160
39. Ruvolo, P. P. (2003) *Pharmacol. Res.* **47**, 383–392
40. Simons, K., and Ikonen, E. (1997) *Nature* **387**, 569–572
41. Szabò, I., Adam, C., and Gulbins, E. (2004) *Pflugers Arch.* **448**, 304–312
42. Taussky, H. H., and Shorr, E. (1952) *J. Biol. Chem.* **202**, 675–682
43. Törnquist, K., Blom, T., Shariatmadari, R., and Pasternack, M. (2004) *Biochem. J.* **380**, 661–668
44. Tortelote, G.G., Valverde, R.H., Lemos, T., Guilherme, A., Einicker-Lamas, M., and Vieyra, A. (2004) *FEBS Lett.* **576**, 31–35
45. van Blitterswijk, W. J., van der Luit, A. H., Veldman, R. J., Verheij, M., and Borst, J. (2003) *Biochem. J.* **369**, 199–211
46. Valverde, R.H., Tortelote, G.G., Lemos, T., Mintz, E., Vieyra, A. (2005) Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II is an essential mediator in the coordinated regulation of electrocyte Ca²⁺-ATPase by calmodulin and protein kinase A.
47. Veiga, M. P., Arrondo, J. L., Goni, F. M., and Alonso, A. (1999) *Biophys. J.* **76**, 342–350
48. Venkataraman, K., and Futerman, A. H. (2000) *Trends Cell Biol.* **10**, 408–412
49. Vieyra, A., Nachbin, L., Dios-Abad, E., Goldfeld, M., Meyer-Fernandes, J. R., and de Moraes, L. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 4247–4255
50. Wengert, M., Berto, Jr., C., Kaufman, J., Leão-Ferreira, L.R., Paes-de-Carvalho, R., Lopes, A.G., and Caruso-Neves, C. (2005) *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **37**, 155–165

- Fig 1.** Ceramide but not ceramide-1-phosphate stimulates the plasma membrane Ca^{2+} -ATPase in renal cells. Ca^{2+} -ATPase assays were carried out in the presence of the Cer (open circles) or C1P (filled circles) concentrations shown on the abscissa. Data are means \pm SE of at least six experiments performed in triplicate with different membrane preparations. The curve was adjusted to open circles using the equation $v = v_o + V_{\max} \times [\text{Cer}] / (\text{Cer}_{50} + [\text{Cer}])$, where v_o is the activity in the absence of exogenous Cer, V_{\max} is the activity at saturating Cer and Cer_{50} (3.5 nM) is the Cer concentration that promotes maximal activation of Ca^{2+} -ATPase.
- Fig. 2.** Ceramide stimulates a basolateral plasma membrane PKC. Activation of PKC by Cer is compared to that found with PMA at the concentrations shown on the abscissa. Kinase activity was determined and calculated as the difference in the histone phosphorylation in the absence and presence of 10^{-12} M calphostin C. Results are expressed as mean \pm SE of at least six experiments performed in duplicate. *Statistical difference with respect to the control.
- Fig. 3.** Ceramide activation of PKC is different from that elicited by PMA in the final effect on Ca^{2+} -ATPase. Assays of Ca^{2+} -ATPase activity were carried out in the presence of Cer and calphostin C in the combinations shown on the abscissa. Data are mean \pm SE of at least six experiments performed in duplicate. *Statistical difference with respect to the control. Inset: Ca^{2+} -ATPase activity (%) measured in the absence (–) or presence (+) of 10^{-12} M PMA. Error bars correspond to SE values calculated from the absolute activity values and converted to percent values.
- Fig. 4.** Ceramide activates PKA in basolateral membranes. PKA_i-inhibited kinase activity was determined in the absence or presence of Cer and cAMP in the combinations shown on the abscissa. PKA activity results of the difference between total phosphorylation and that measured in the presence of 10^{-8} M 5–22 PKA inhibitor peptide (PKA_i). Data are mean \pm SE of at least six experiments performed in duplicate. *Statistical difference with respect to the control.
- Fig. 5.** The PKA inhibitor (5–22 peptide) abolishes stimulation of Ca^{2+} -ATPase by ceramide. Assays of Ca^{2+} -ATPase activity were carried out in the presence of Cer and PKA_i in the combinations shown on the abscissa. Data are means \pm SE of at least six experiments performed in duplicate. *Statistical difference with respect to the control.
- Fig. 6.** Hydroxylamine-resistant phosphorylation of Ca^{2+} -ATPase after activation of the PKC pathway by Cer. Phosphorylation of Ca^{2+} -ATPase in the presence of hydroxylamine was carried out with the combinations of Cer and calphostin C indicated on the abscissa. *A*, ^{32}P signals at the 140 kDa band using a phosphor screen. *B*, immunodetection of plasma membrane Ca^{2+} -ATPase (monoclonal antibody 5f10) in the representative phosphor screen images shown in *A*. *C*, Phosphor Imager densitometric analysis of the signals shown in *A*. The figure shows a representative experiment of a series of three, which agreed within 90%.
- Fig. 7.** Activation of PKA by Cer phosphorylates Ca^{2+} -ATPase. *A*, immunodetection of a specific phosphor-Ser/Thr PKA substrate. *B*, immunodetection of plasma membrane Ca^{2+} -ATPase (monoclonal antibody 5f10) in the representative blotting shown in *A*. *C*, densitometric representation of the phosphorylation shown in *A*. Assays were carried out in the presence of Cer and PKA_i in the combinations shown on the abscissa. The figure shows a representative experiment of a series of three, which agreed within 90%.

Activation of Plasma Membrane Ca Pump by Ceramide

Figure 1

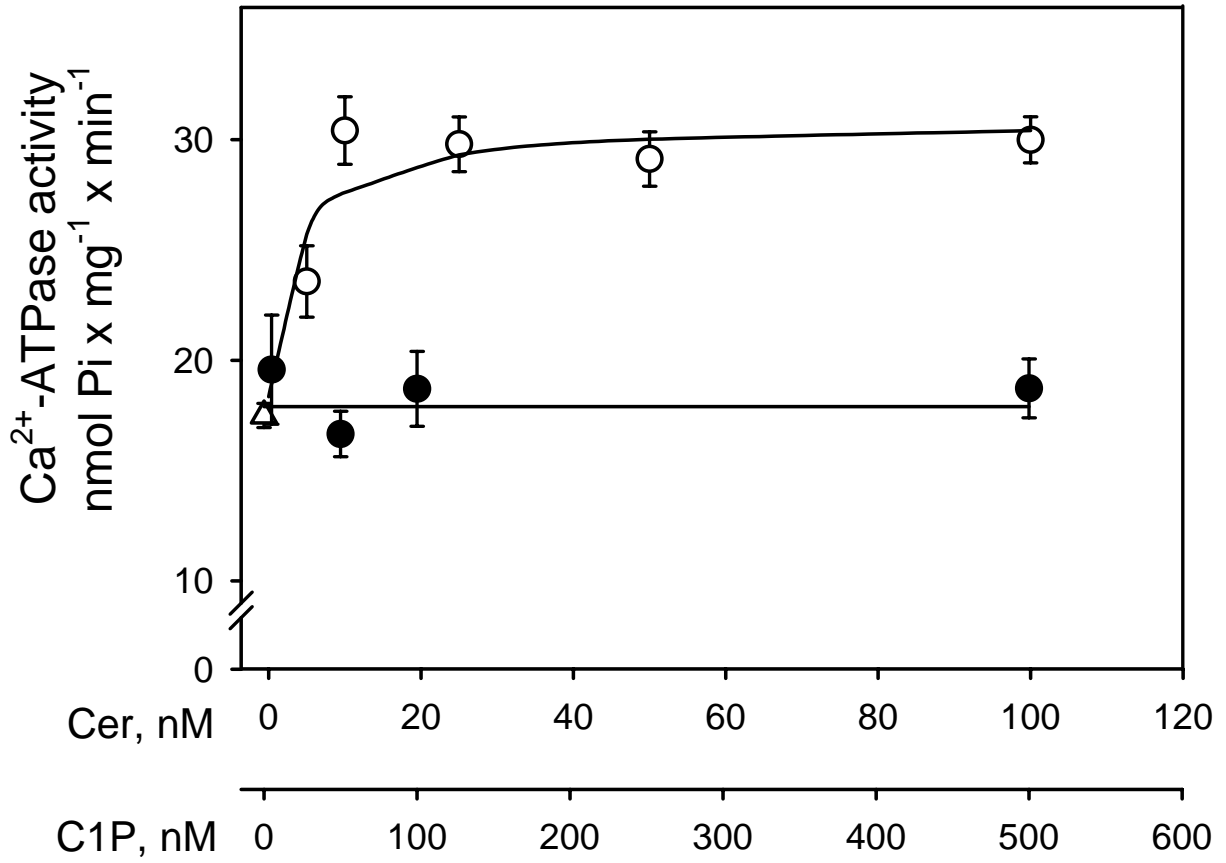


Figure 2

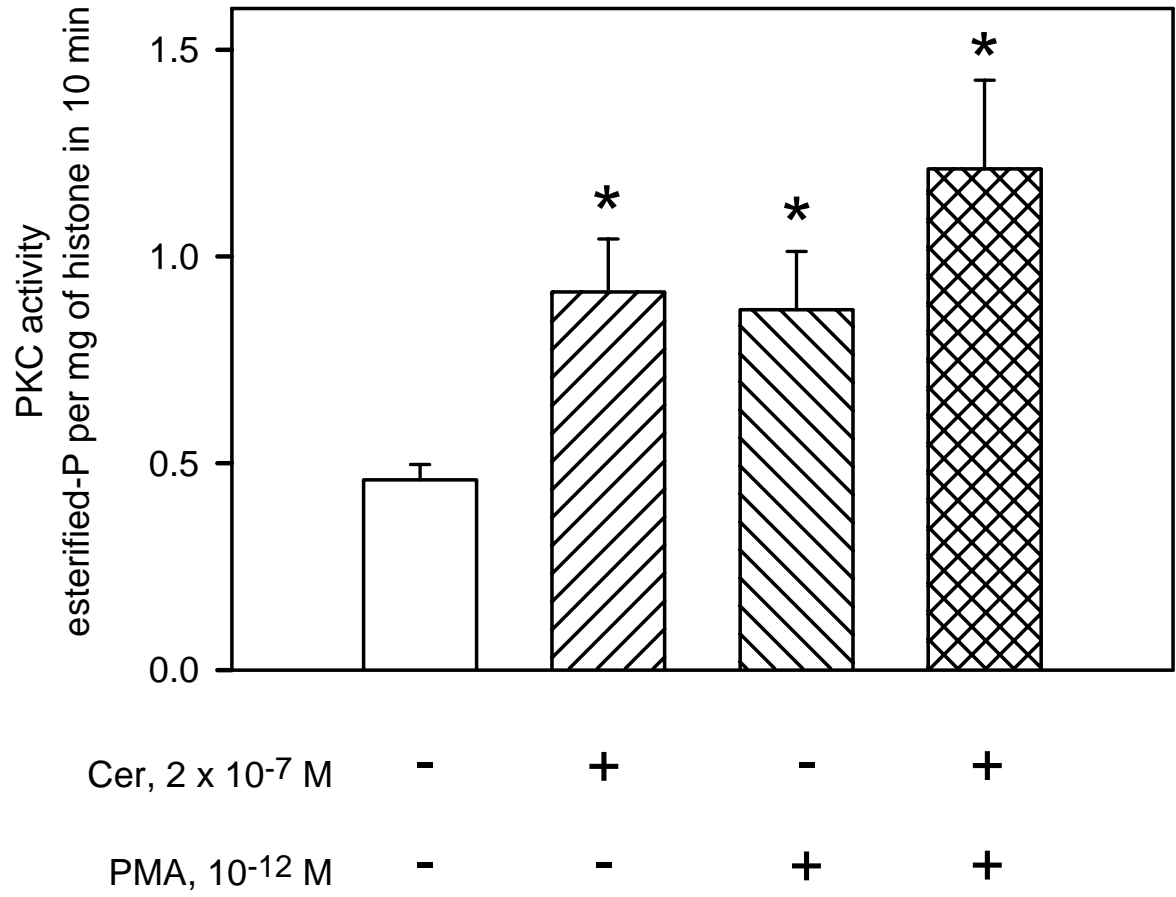


Figure 3

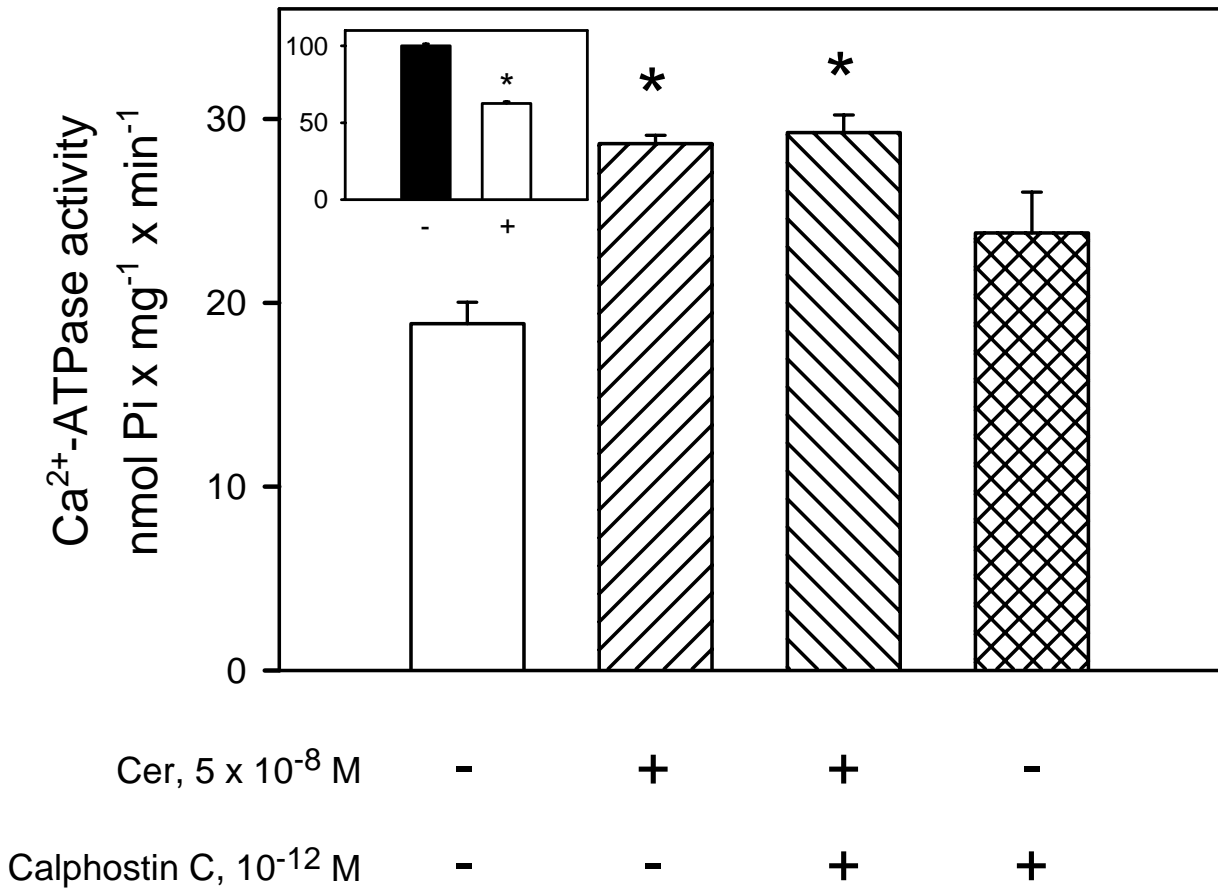


Figure 4

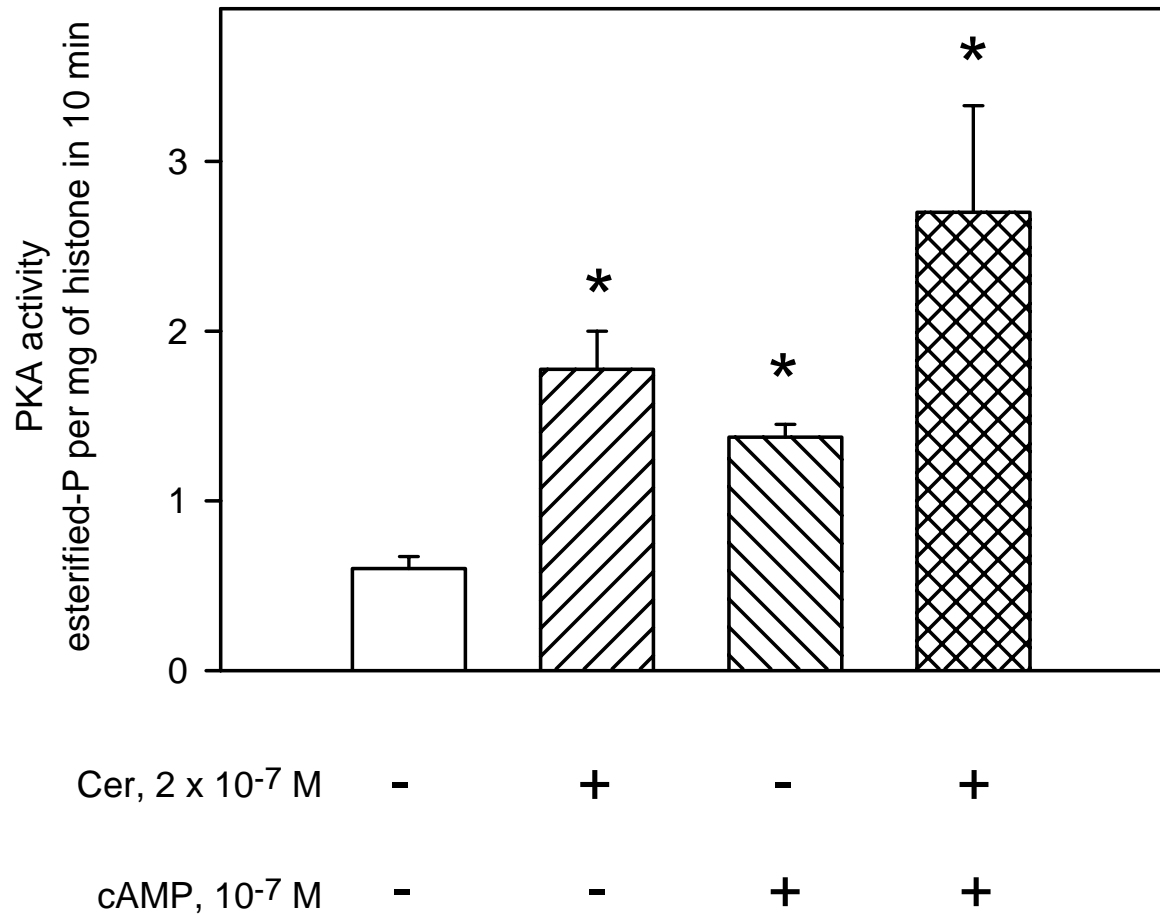


Figure 5

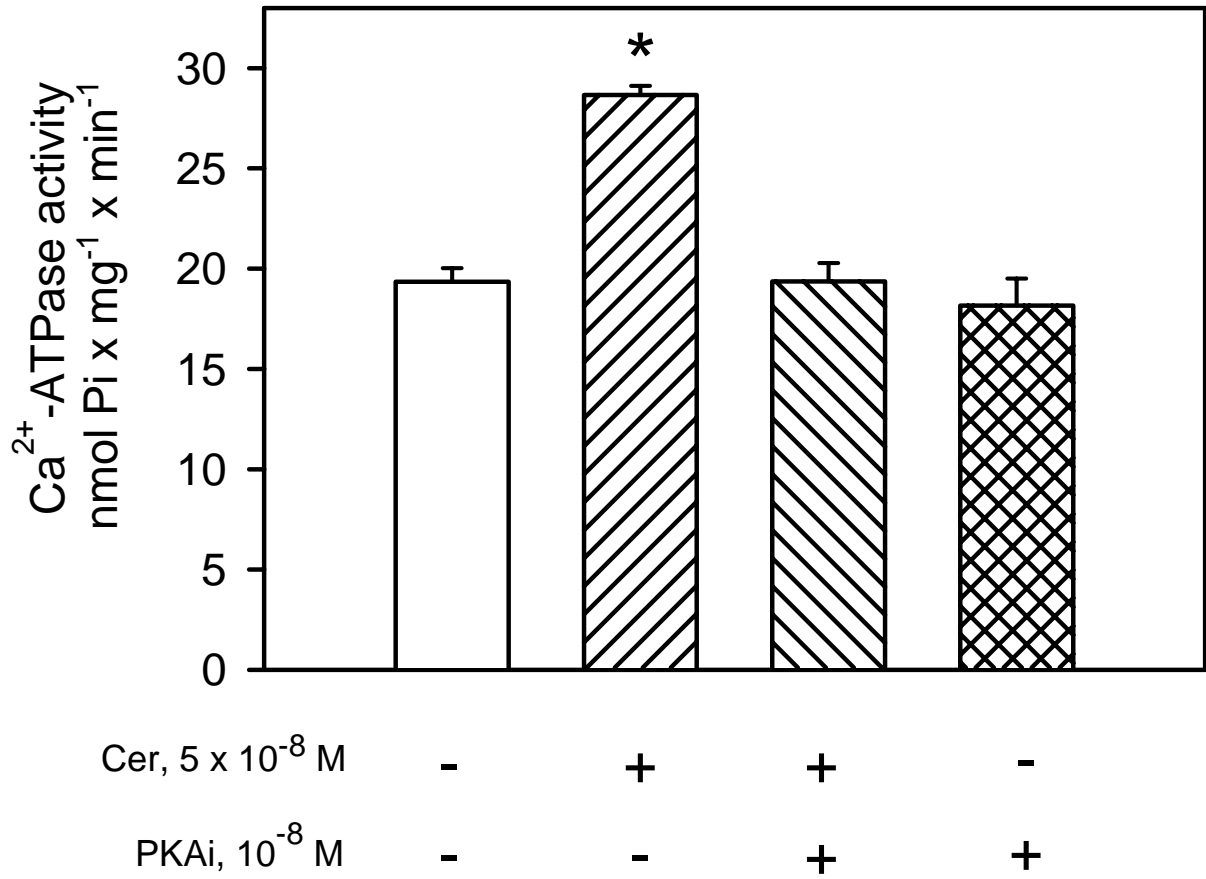
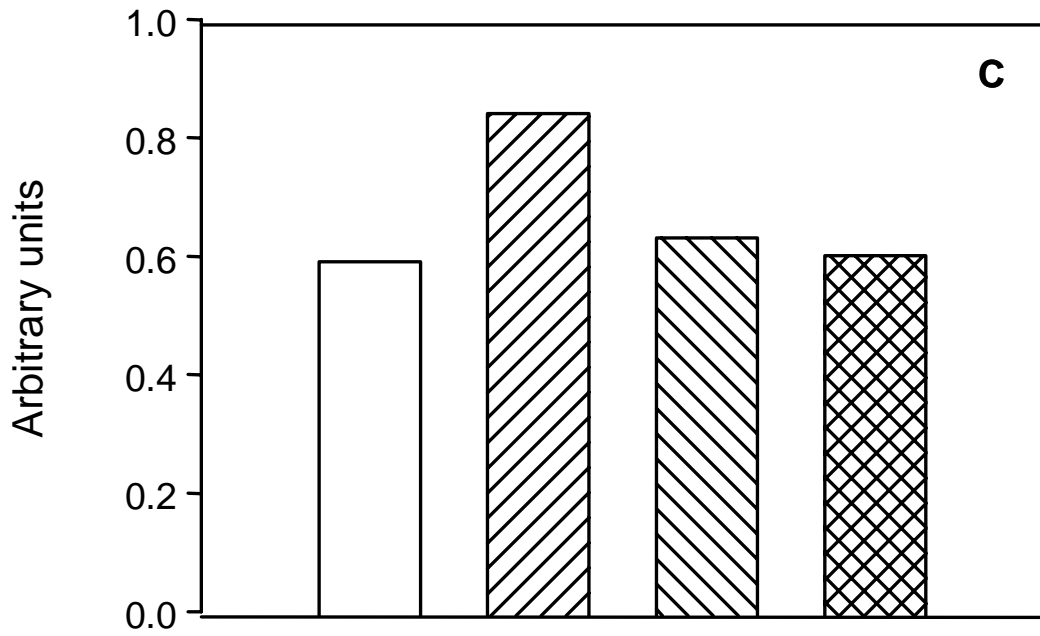
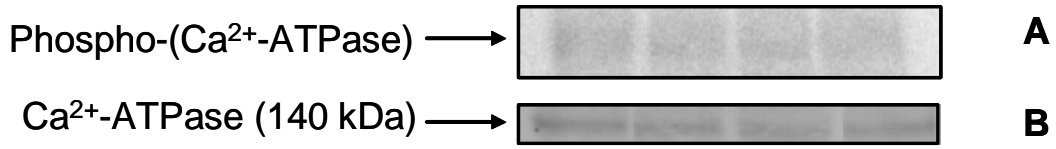
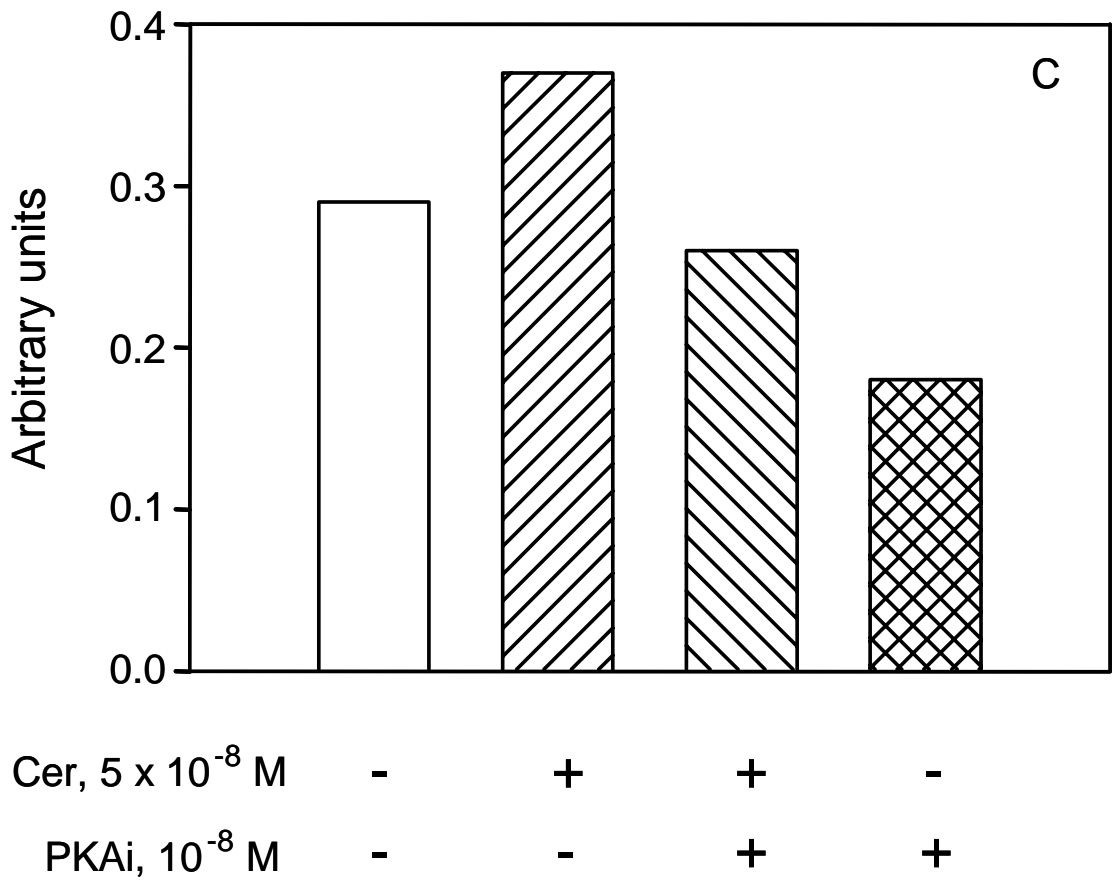
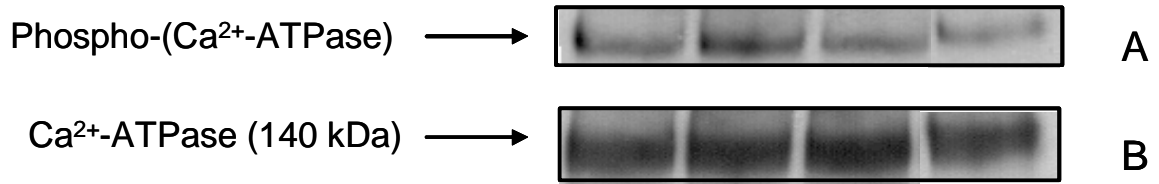


Figure 6



Cer, 5×10^{-8} M	-	+	+	-
Calphostin C, 10^{-8} M	-	-	+	+

Figure 7



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](#)