

**“Diacilglicerol cinase residente na membrana basolateral
de células de túbulo proximal: Envolvimento nas redes
regulatórias do epitélio renal?”**



**Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
2003**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Esta tese foi desenvolvida entre janeiro de 2002 e janeiro de 2003 sob a orientação do Prof. Adalberto Vieyra 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 Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq / PRONEX).

Ficha Catalográfica

NOGAROLI, Luciana Cavalcante

“Diacilglicerol cinase residente na membrana basolateral de células de túbulo proximal: Envolvimento nas redes regulatórias de epitélio renal?”

Rio de Janeiro, UFRJ, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, 2003.

80p

Tese: **Mestre em Ciências Biológicas (Biofísica)**

- | | | |
|--------------------------|------------------------|----------------------|
| 1. Diacilglicerol cinase | 4. Diacilglicerol | 7. Ácido fosfatídico |
| 2. Membrana basolateral | 5. Sinalização celular | |
| 3. Túbulo proximal renal | 6. Lipídeo cinases | |

I. Rio de Janeiro. Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), IBCCF.

II. Título

Meu coração diz: “Quero saber!

Tenho um desejo ardente de ciência!

Instrui-me, Kháyyám, tu que tanto estudaste!”

Pronunciei a primeira letra do alfabeto, e o meu coração retrucou: “Agora, sei.

Um é o primeiro algarismo do número que não acaba nunca...”

Esquece que ontem não lograste a recompensa que merecias.

Sê feliz

Não lamentes nada.

Não espere nada.

Tudo que deve acontecer está escrito no Livro

Que o vento da Eternidade folheia ao acaso.

Omar Kháyyám

Agradecimentos

Muitos participaram deste trabalho comigo.

Citar nomes poderia ocasionar algumas injustiças.

*Assim, a todos que de alguma forma, direta ou indireta,
contribuíram para a sua realização, o meu mais sincero
agradecimento.*

Abreviaturas

$[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$	: Adenosina trifosfato marcada com ^{32}P na fosforila γ -terminal
Bis-Tris Propano	: 1,3-bis[tris(hidroximetil)-metilamono]propano
Ca^{2+} /calmodulina	: Calmodulina associada a Ca^{2+}
CaM-cinase	: Proteína cinase dependente de Ca^{2+} /calmodulina
cDNA	: DNA complementar
CDP	: Citosina difosfato
CDP-DAG	: CTP:1,2-diacilglicerolfosfato citidilil transferase
CMP	: Citosina monofosfato
CTP	: Citosina trifosfato
DAG	: Diacilglicerol
DGK	: Diacilglicerol cinase
DMSO	: Dimetil sulfóxido
EGTA	: Ácido etilenoglicol-bis(amino etil éter)-N, N'tetraacético
GDP	: Guanosina difosfato
GTP	: Guanosina trifosfato
Hepes	: Ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'(2-etano sulfônico)
IP_3	: Inositol (1,4,5) trifosfato
LPA	: Ácido liso-fosfatídico
MA	: Membrana apical
MBL	: Membrana basolateral
Mes	: Ácido [2-(N-morfolino)]etano sulfônico
$\text{Mg}.\text{ATP}^{2-}$	: Complexo do Mg^{2+} com o ATP^{4-}
mRNA	: RNA mensageiro

PA	: Ácido fosfatídico
PC	: Fosfatidilcolina
PC-PLC	: Fosfolipase C específica para PC
Pi	: Fosfato inorgânico
PI4-K	: Fosfatidilinositol-4 cinase
PI(4)P5-K	: Fosfatidilinositol(4)fosfato-5 cinase
PI-PLC	: Fosfolipase C específica para fosfatidilinositol
PKC	: Proteína cinase C
PLC β	: Fosfolipase C, isoforma β
PLC γ	: Fosfolipase C, isoforma γ
PLC/DGK	: Complexo da PLC com a DGK
PLD	: Fosfolipase D
PMSF	: Fluoreto de fenil-metil-sulfonila
POPOP	: 1,4-bis(5-fenil-2oxazolil)benzeno 2,2'-p-fenileno-bis(5-feniloxazole)
PS	: Fosfatidilserina
PtdIns	: Fosfatidilinositol
PtdIns(4)P	: Fosfatidilinositol(4)fosfato
PtdIns(4,5)P ₂	: Fosfatidilinositol(4,5)bifosfato
R59022	: 6-{2-(4-[bis-(4-fluorofenil)metileno]-1-piperidinil)etil}-7metil-5H-tiazolo-(3,2-a)pirimidina-5-ona
R59949	: 3-{2-(4-[bis-(4-fluorofenil)metileno]-1-piperidinil)etil}-2,3-diidro-2-tioxo-4(1H)quinazolinona
R _f	: Taxa de migração
S1P	: Esfingosina(1)fosfato
SDS	: Dodecil sulfato de sódio

Sph	: Esfingosina
SPK	: Esfingosina cinase
TLC	: Cromatografia em camada fina
Tris	: Tris(hidroximetil)aminometano
U73122	: 1-(6-[(17 β)-3-metoxiestra-1,3,5[10]-tien-17-il)amino]hexil)-1H-pirrole-2,5-dione

RESUMO

A diacilglicerol cinase (DGK) cataliza a fosforilação do diacilglicerol (DAG) produzindo o ácido fosfatídico (PA). Assim, a enzima pode modular diversos eventos celulares regulados por estes dois lipídeos. Entre as funções da DGK estão: (1) atenuar os efeitos de PKC (dependente de DAG), (2) produzir uma nova molécula sinalizadora (PA) e (3) iniciar a ressíntese de fosfoinosítídeos após a ativação da fosfolipase C (PI-PLC) em resposta ao estímulo de receptor.

O presente trabalho teve como objetivo iniciar a caracterização da atividade da DGK presente na membrana basolateral (MBL) de túbulos proximais de rins de porco, numa preparação nativa que preservou o meio ambiente lipídico da membrana. A DGK de MBL foi capaz de catalizar a fosforilação do DAG endógeno de forma dependente da concentração de proteína ($9,9 \pm 0,6 \text{ pmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$), sendo linear nos primeiros 10 min de reação. Sua maior atividade foi observada em uma faixa de pH muito restrita (pH 7,0) e na faixa de temperatura entre 32 e 40 °C. Quando o efeito do incremento da temperatura na atividade da DGK foi analisado utilizando a equação de Arrhenius, observou-se uma dependência não linear de $\log A$ vs $1/T$, indicando uma complexa influência do meio ambiente lipídico da membrana nativa na catálise. Os resultados mostraram que o Mg^{2+} é cofator obrigatório da DGK e que o complexo $\text{Mg}.\text{ATP}^{2-}$ é o verdadeiro substrato que interage com o centro ativo da enzima. As constantes cinéticas de K_m e $V_{\max}$ foram, para o ATP, de 0,32 mM e $19,8 \text{ pmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ e, para o MgCl_2 , de 0,26 mM e $12,9 \text{ pmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$.

A atividade DGK foi inibida por esfingosina 100 μM , mas não por esfingosina(1)fosfato ou por fosfatidilinositol(4)fosfato, sugerindo um específico *cross-talk* entre mensageiros lipídicos no controle da DGK de MBL. O inibidor comercial de DGK,

R59949, não teve efeito, bem como aumentos fisiológicos de Ca^{2+} livre. Estes resultados sugerem que a DGK de MBL possa ser a DGK η , uma vez que esta última está presente no rim, é inibida por esfingosina, não responde ao R59949 e pertence a uma classe II, independente de Ca^{2+} . A formação do PA fortemente diminuída quando a atividade da PI-PLC foi inibida por U73122, indica uma possível interação destas duas enzimas em um complexo sinalizador.

Summary

The diacylglycerol kinase (DGK) catalyzes the phosphorylation of diacylglycerol (DAG) yielding phosphatidic acid (PA). Thus, this enzyme can modulate many different intracellular events, which are mediated by these two lipids. The DGK functions can be divided in three: (1) attenuate the PKC effects elicited by DAG, (2) produce another signaling molecule, PA, and (3) initiate phosphoinositide *de novo* synthesis after the agonist stimulation of PI-PLC.

The aim of this work was to characterize the DGK activity associated to the basolateral membrane (MBL) from pig kidney proximal tubules; in a native preparation that preserve the membrane microenvironment. The DGK from MBL was able to phosphorylate the endogenous DAG in a protein concentration-dependent way ($9.9 \text{ pmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$), being linear in the initial 10 min of reaction. It's maximal activation was obtained at pH 7.0 and in a temperature interval from 32°C to 40°C. Analyzing the temperature effect on the DGK activity by the Arrhenius' equation, we observed a non-linear dependence of the $\log A$ vs $1/T$, thus indicating a complex influence exerted by the lipid environment of the native membrane in the catalysis process. The results shown that the Mg^{2+} is an obligative co-factor for the enzyme, and that the $\text{Mg}.\text{ATP}^{2-}$ complex is it's preferential substrate, which interacts with the active center of the enzyme. The K_m and V_m constants for ATP were 0.32 mM and $19.8 \text{ pmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$; and for MgCl_2 0.26 mM and $12.9 \text{ pmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$, respectively. In the mechanism of phosphoryl binding and transfer to DAG, the hystidine residues play a fundamental role in the coordination of the Mg^{2+} atoms.

The inhibition caused in the DGK activity by sphingosine suggests an eventual cross-talk involving different lipid mediator in the control of the DGK from the MBL. The

R59949 as well as increasing physiological free- Ca^{2+} levels had no effect on the DGK activity. These results strongly suggest that the DGK from the MBL might be the DGK η , because this isoform is present in kidney, is sphingosine-sensitive, Ca^{2+} -independent and not inhibited by the R59949. The PA formation was strongly inhibited by the PLC inhibition, suggesting a possible interaction between these two enzymes in a signaling complex.

Índice

1 – INTRODUÇÃO	1
1.1 – Papel dos túbulos contornados proximais e dos eventos de sinalização celular na homeostasia dos compartimentos líquidos corporais	1
1.2 – Sinalização celular: o papel do diacilglicerol	4
1.3 – A diacilglicerol cinase	10
2 – OBJETIVO	20
3 – MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1 - Preparação da fração purificada de membrana basolateral de túbulos proximais renais	21
3.2 - Preparação de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$	23
3.3 - Ensaio da atividade de lipídeos cinase presentes na membrana basolateral	24
3.4 - Extração de lipídeos e análise de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ácido fosfatídico}$ da membrana basolateral	25
3.5 – Formação, extração e reconstituição do $\text{PtdIns}(4)\text{P}$ ao meio de dosagem da DGK	26
3.6 - Determinação da atividade da $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})\text{ATPase}$ da MBL	27
3.7 - Cálculo das concentrações do complexo $\text{Mg}.\text{ATP}^{2-}$ e das espécies livres de Mg^{2+} , Ca^{2+} e ATP	27
3.8 - Análise estatística	28
3.9 – Reagentes e soluções	28
4 – RESULTADOS	30
5 – DISCUSSÃO	50
6 – CONCLUSÕES E FUTURAS DIREÇÕES	64
7 – BIBLIOGRAFIA	67

1- INTRODUÇÃO

1.1 - Papel dos túbulos contornados proximais e dos eventos de sinalização celular na homeostasia dos compartimentos líquidos corporais

A manutenção de concentrações iônicas definidas nos diferentes compartimentos líquidos corporais constitui uma das características mais importantes dos seres vivos. Devido à permeabilidade seletiva da membrana plasmática, as células são capazes de manter um ambiente intracelular com composição iônica bastante distinta daquela observada no espaço extracelular. Esta é uma condição fundamental para as células manterem-se vivas.

Para que a célula desempenhe normalmente suas funções é necessário que, além de distintas, as concentrações iônicas no ambiente intra e extracelular sejam mantidas numa faixa ótima. As células eucarióticas dispõem de sistemas transportadores que são responsáveis pelo controle qualitativo e quantitativo de íons no citosol. Por outro lado, o controle sistêmico da concentração de diferentes íons no líquido extracelular, nos organismos superiores, é realizado pelos rins, cujo trabalho intenso e especializado contribui de maneira decisiva para a homeostasia do meio interno (de Mello-Aires, 1999).

Cerca de 180 litros de plasma sangüíneo – em humanos – são filtrados diariamente pelos rins. Deste volume total, menos de 2 % são eliminados na forma de urina. Este trabalho de recuperação quase total do volume e da composição do plasma sangüíneo, filtrado nos glomérulos, só é possível devido ao processo de reabsorção tubular que ocorre nas células epiteliais dos túbulos renais. Portanto, a concentração ótima dos componentes iônicos do plasma é mantida pelo trabalho de reabsorção destas

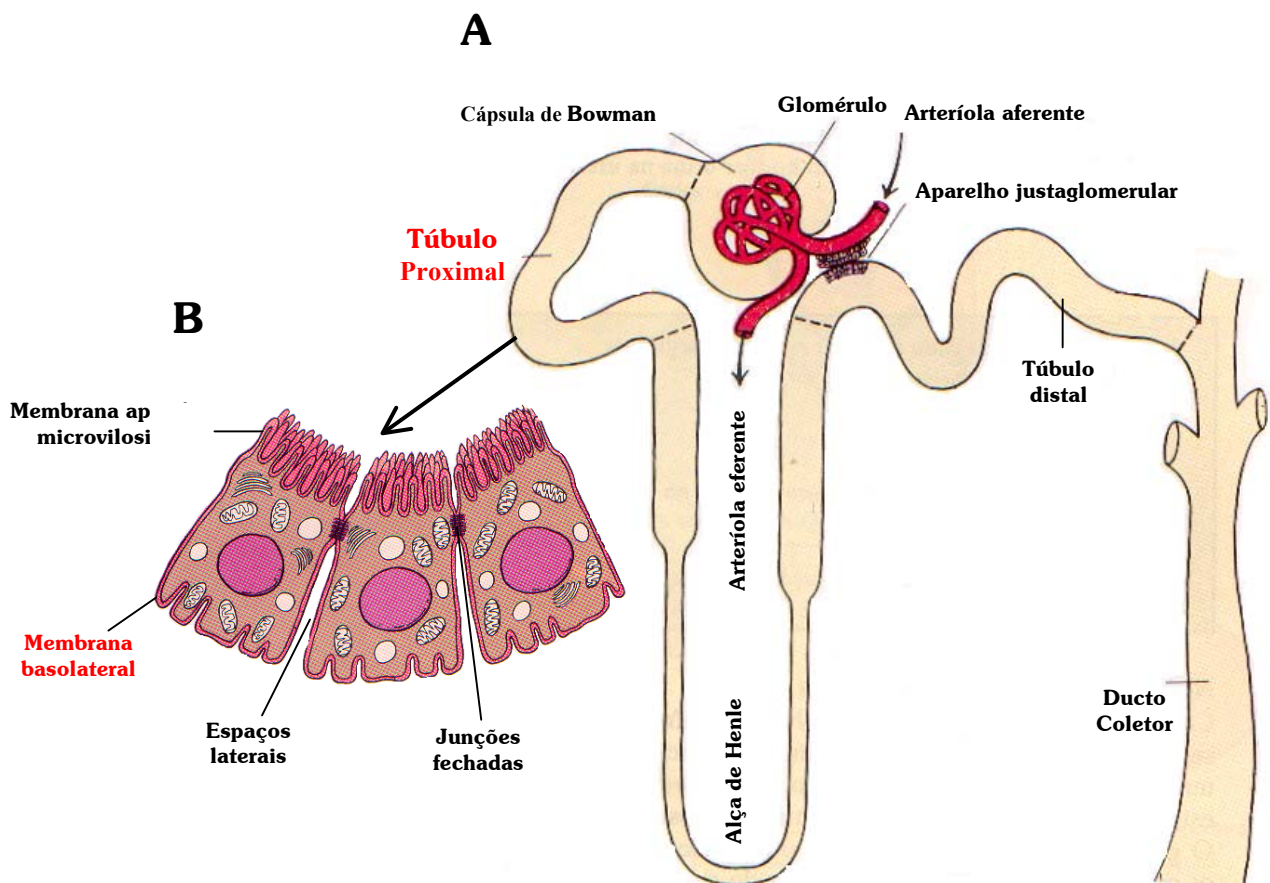


Figura 1: Esquema de um néfron cortical e de células do túbulo proximal renal. **A:** anatomia funcional de um néfron. O glomérulo é o local de filtração do plasma. A porção oca do néfron que circunda o glomérulo é a cápsula de Bowman. A partir da cápsula de Bowman, o líquido tubular passa pelo túbulo proximal, pela alça de Henle, pelo túbulo distal e pelo ducto coletor. A arteríola aferente entra em contato com um ponto da parte inicial do túbulo distal; o aparelho justaglomerular está localizado nessa junção. **B:** morfologia das células do túbulo proximal. Adaptado de Schaaf *et al.* (1993).

células. A este processo soma-se o de secreção de algumas outras espécies, como por exemplo K^+ e H^+ (Wang, 1994; de Mello-Aires & Malnic, 2002). Ao desempenharem estas funções, as células que compõem o epitélio tubular renal devem, portanto, transportar uma grande quantidade de eletrólitos e, a despeito deste fato, manter constante o seu meio intracelular, assegurando a sua própria homeostasia.

O túbulo proximal é a porção do néfron onde ocorre a maior parte da reabsorção de íons do filtrado glomerular (Figura 1A). Para realizar este trabalho, as células que compõem o epitélio deste segmento tubular apresentam algumas adaptações muito específicas, quando comparadas com as de outros órgãos e tecidos. Morfológica e funcionalmente, estas células caracterizam-se por possuírem polaridade (Figura 1B). A porção da membrana plasmática voltada para a luz do túbulo, chamada membrana apical (MA), luminal ou borda em escova, apresenta um grande número de vilosidades capazes de aumentar a superfície de absorção. Nesta face da célula residem receptores (como por exemplo o receptor de paratormônio), 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), que é a região da célula em contato com o interstício, apresenta também canais e outros sistemas transportadores (como por exemplo, a $(Na^+ + K^+)ATPase$ e a $(Ca^{2+} + Mg^{2+})ATPase$), além de uma grande variedade de receptores de hormônios e autacóides. A ativação destes receptores leva à produção de mensageiros secundários capazes de desencadear modificações funcionais específicas no metabolismo celular, regulando o fluxo iônico através das duas membranas – MA e MBL – e do epitélio como um todo (Aperia *et al.*, 1994; Vieyra, 1996; Féraillé & Doucet, 2001).

O controle da homeostasia destas células envolve vários mecanismos de regulação que permitem que certas características básicas sejam mantidas dentro de

limites muito estreitos, como ocorre com o pH, com a atividade citossólica de Ca^{2+} e com o volume celular. Entre estes mecanismos de controle, encontram-se aqueles mediados por fatores humorais (hormônios e autacóides), que permitem que o organismo module a concentração de eletrólitos no plasma em função das variações detectadas no meio extracelular. Estes fatores humorais, de um modo geral, ativam ou desativam proteínas cinases que, via fosforilação/defosforilação de substratos específicos, controlam o funcionamento da célula (Férraille & Doucet, 2001).

Devido à presença de grande variedade de receptores capazes de regular a função renal (Hammerman & Gavin, 1984; Aperia *et al.*, 1994; Férraille & 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 (diacilglicerol, ácido liso-fosfatídico, ácido fosfatídico, esfingosina-1-fosfato, etc) (Guilherme *et al.*, 1998; Coka-Guevara *et al.*, 1999; Rangel *et al.*, 1999; Caruso-Neves *et al.*, 2000; Rangel *et al.*, 2002; Einicker-Lamas *et al.*, 2003).

1.2 – Sinalização celular: o papel do diacilglicerol

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. Um dos primeiros trabalhos que apontava para este papel sinalizador dos lipídeos foi publicado em 1953 por Hokin & Hokin. Na ocasião os autores demonstraram que, quando estimuladas com acetilcolina, as células

do pâncreas e de córtex do cérebro de pombo aumentavam a incorporação de ^{32}P (a partir de ^{32}Pi) em fosfoinosítídeos e ácido fosfatídico, mas não em outros fosfolipídeos, iniciando assim a era do “efeito fosfatidilinositol”. Mais tarde foi demonstrado que essa incorporação resulta da degradação e subsequente síntese dos fosfolipídeos de inositol. Posteriormente, em 1975, Michell publicou um artigo chave que apontava para a importância dos fosfoinosítídeos nos processos que envolviam a mobilização do íon Ca^{2+} . No início da década de 80 a via de hidrólise do fosfatidilinositol-4,5-bifosfato ($\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$) ficou estabelecida como uma das principais vias de sinalização para a mobilização de Ca^{2+} ativada por agonistas (Nishizuka, 1984). Dentre os fosfolipídeos de inositol mais estudados na transdução de sinal, estão dois derivados fosforilados do PtdIns , o $\text{PtdIns}(4)\text{P}$ e o $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$. Embora o $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ seja menos abundante nas membranas das células de animais do que o $\text{PtdIns}(4)\text{P}$, ele desempenha um papel fisiológico central na condição de substrato da PI-PLC (Figura 2).

Atualmente está bem estabelecida a via de sinalização que leva à hidrólise de $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ (Figura 2). Quando um agonista (hormônios, autacóides, etc) liga-se ao seu respectivo receptor na membrana plasmática, o complexo ligante-receptor ativa uma proteína G trimérica, que troca o GDP associado a ela por um GTP. De fato, a proteína G é a responsável pela transdução do sinal a partir da membrana. A subunidade α desta proteína estimula a fosfolipase C_β específica para $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ (PI-PLC $_\beta$). Em menos de um segundo a enzima cataliza a hidrólise do $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$, liberando dois segundos mensageiros: o inositol(1,4,5) P_3 (IP_3) e o *sn*-1,2-diacilglicerol (DAG). Para ilustrar a variabilidade de ações desta cascata de sinalização, sabe-se que mais de 25 tipos de receptores diferentes utilizam esta via de transdução na superfície celular (Alberts *et al.*, 2002).

O IP_3 , produto hidrofílico da hidrólise do $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$, difunde-se rapidamente pelo citossol até o retículo endoplasmático, onde liga-se a receptores específicos, provocando a abertura de canais de Ca^{2+} . O nível de Ca^{2+} citossólico, normalmente menor que 10^{-8} M, eleva-se para 10^{-6} M, disparando a ativação de uma variedade de enzimas dependentes deste íon, como por exemplo a proteína cinase dependente de Ca^{2+} -calmodulina (CaM-cinase) e a proteína cinase C (PKC) (Berridge & Irvine, 1984; Berridge, 1993).

O DAG é um glicerolípido neutro, produto hidrofóbico da hidrólise do $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$, que permanece na membrana difundindo-se rapidamente (Goñi & Alonso, 1999). Ele executa pelo menos dois papéis como segundo mensageiro, o primeiro é servir de substrato para a clivagem pela DAG lipase, com a conseqüente produção de ácido araquidônico, que pode atuar diretamente como mensageiro (Gu & Wang, 2002) ou ser utilizado na síntese de eicosanóides (Gurr & Harwood, 1991). O segundo é a ativação de proteínas cinases PKCs (Nishizuka, 1984). Estas cinases após ligaram-se ao íon Ca^{2+} no citossol, são translocadas para a membrana, onde se ligam também ao DAG e a fosfatidilserina (PS). Até o momento foram descritas 10 isoformas de PKC que divergem em sua estrutura primária e na sensibilidade ao Ca^{2+} e ao DAG. As PKCs convencionais ($\text{cPKC}\alpha$, βI , βII e γ) são dependentes de Ca^{2+} e ativadas por DAG e PS. As PKCs novas ($\text{nPKC}\delta$, ϵ , η e θ), independentes de Ca^{2+} , são ativadas por DAG e PS. As PKCs atípicas ($\text{aPKC}\zeta$, e ι/λ) são independentes de Ca^{2+} e não respondem a DAG, mas são ativadas por PS (Way *et al.*, 2000). Estas cinases fosforilam resíduos de serina ou treonina de diversas proteínas alterando sua atividade catalítica. Entre as proteínas alvo da PKC estão: a fosfolipase D (PLD), a fosfolipase A_2 , a proteína cinase dependente de mitógeno e o fator de necrose- κB (Nishizuka, 1988; Alberts *et al.*, 2002). Dependendo do tipo celular e da proteína alvo, a PKC pode controlar

importantes processos, tais como permeabilidade da membrana a íons, contração, migração, proliferação, apoptose, secreção e diferenciação celular (Dempsey *et al.*, 2000).

Apesar desta via “clássica” ser a principal via de sinalização que leva ao aumento da formação de DAG na membrana plasmática, existem outras vias de sinalização que também resultam na produção deste segundo mensageiro. As subunidades $\beta\gamma$ da proteína trimérica G_i ou G_o também estimulam PI-PLC $_{\beta}$ (Figura 3A), levando à ativação da cascata descrita anteriormente (Alberts *et al.*, 2002). Receptores com atividade de tirosina cinase, ativados por fatores de crescimento (Figura 3B), podem estimular uma fosfolipase C_{γ} , resultando na hidrólise de PtdIns(4,5)P $_2$ e consequente formação de DAG. Alguns estudos recentes mostram ainda a geração direta de DAG, via PC, pela ação de uma PC-PLC (PLC específica para fosfatidilcolina). Esta enzima parece ter uma atividade mais prolongada que a PI-PLC, mantendo relativamente alto o nível de DAG durante o crescimento e a diferenciação celular (Exton, 1994). No entanto, esta via em células de mamíferos não está bem caracterizada e o papel desta PC-PLC na transdução de sinal não é conhecido.

Muitos agonistas, tais como hormônios, neurotransmissores e fatores de crescimento, podem provocar aumentos transitórios nos níveis de DAG (Hodgkin, 1998) desencadeando respostas diversas. Dessa forma, para manter a homeostasia celular, os níveis de DAG devem ser rigorosamente mantidos sob controle. A metabolização do DAG pode ser realizada por duas enzimas: uma DAG lipase ou uma diacilglicerol cinase (DGK).

As DAG lipases, como já foi mencionado, catalisam a clivagem de DAG em glicerol e ácidos graxos, contribuindo para diminuir os níveis locais do mensageiro. Os produtos gerados são incorporados ao *pool* metabólico de lipídeos nas membranas e

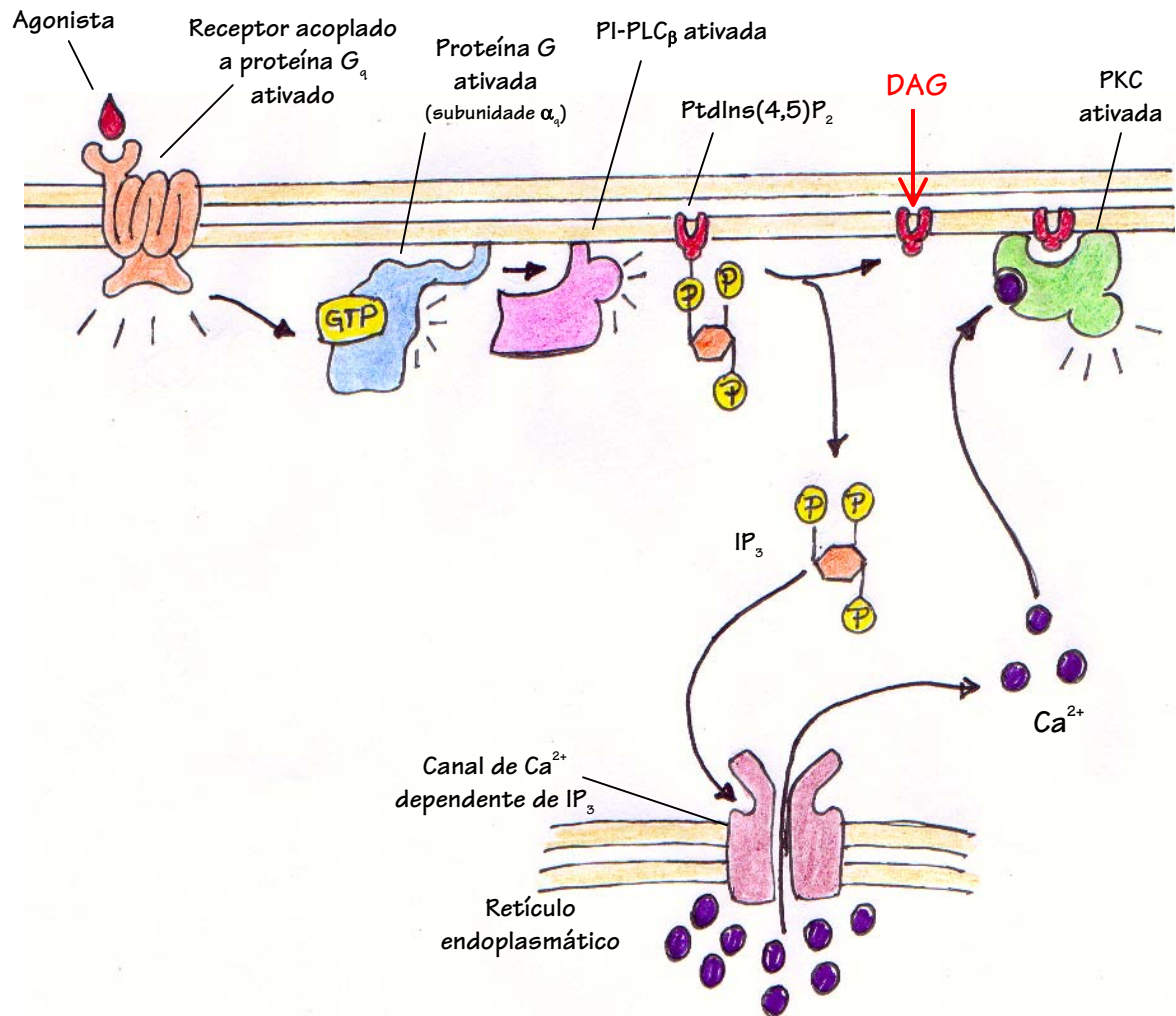


Figura 2: Formação de DAG por meio do estímulo de receptor acoplado à proteína G. O receptor ativado, após ligação de seu ligante/agonista, estimula uma proteína G trimérica (G_q) fazendo com que esta ative a PI-PLC $_{\beta}$. A hidrólise de PtdIns(4,5) P_2 pela PI-PLC $_{\beta}$ ativada gera IP $_3$ e DAG. O DAG juntamente com o Ca^{2+} e a fosfatidilserina - não mostrada - ativa a PKC. Adaptado de Alberts *et al.*, 2002.

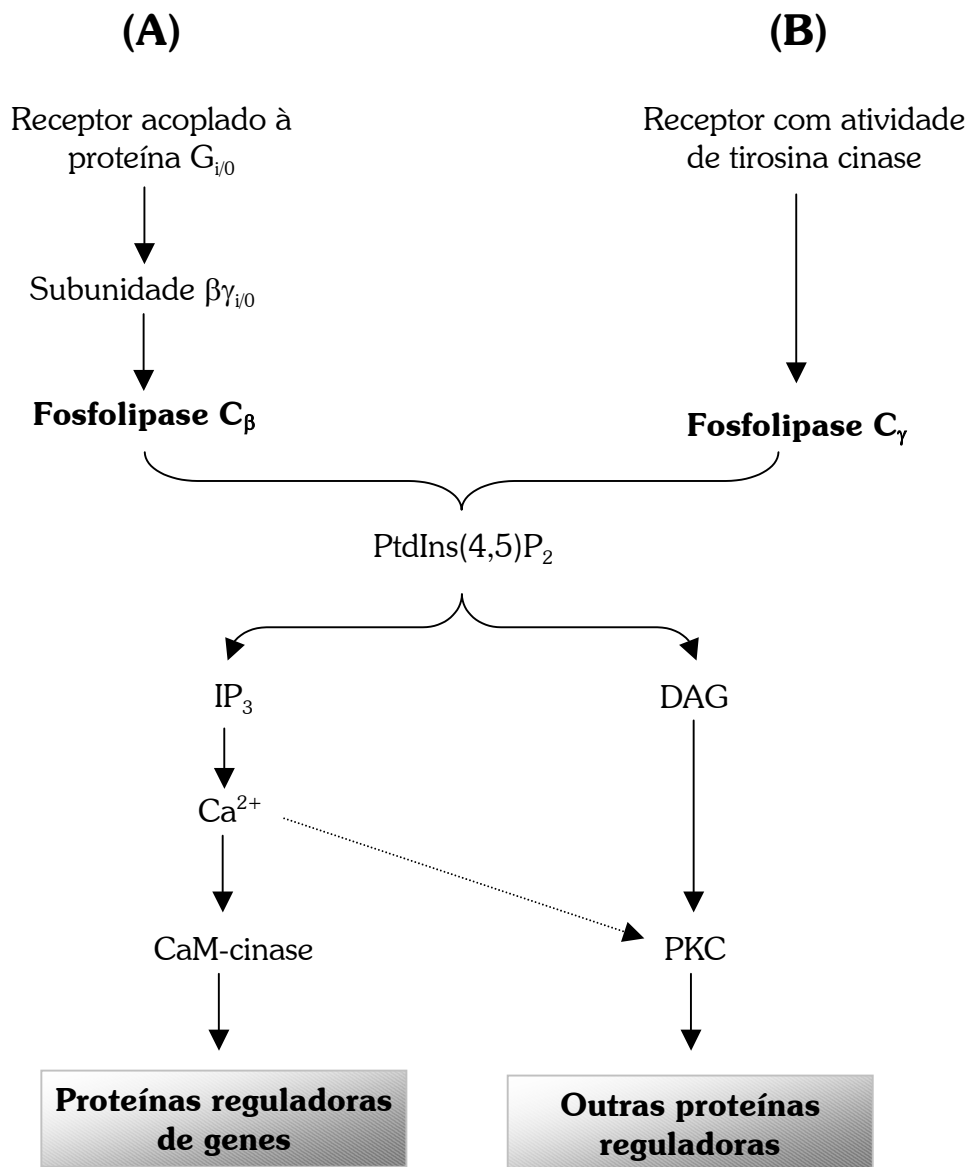


Figura 3: Outras vias de formação de DAG na célula que levam à ativação de proteínas cinases. A: ativação de proteína G_i ou G_o leva a estimulação da PI-PLC $_{\beta}$ por meio de suas subunidades $\beta\gamma$. **B:** ativação de receptores tirosina cinase leva à ativação direta da PI-PLC $_{\gamma}$. A elevação dos níveis de DAG é acompanhada pelo aumento da concentração de proteínas cinases (CaM-cinase e PKC). Adaptado de Alberts *et al.*, 2002.

podem ser reutilizados posteriormente. Por outro lado, as DGKs fosforilam o DAG gerando outro lipídeo, o ácido fosfatídico (PA) (Kano *et al.*, 2002). A descoberta de que a PKC era alostericamente ativada por DAG (Nishizuka, 1992) acelerou os estudos sobre a DGK, pois a esta última tem sido atribuída a função de atenuar os efeitos da PKC por reduzir os níveis de DAG. Esta seria uma das formas de finalizar o sinal associado à ativação de PKCs pela ligação de hormônios e autacóides a seus receptores (Topham & Prescott, 1999).

1.3 – A diacilglicerol cinase

A DGK (EC 2.7.1.107), junto com outras lipídeo cinases, fosfolipases, lipídeo fosfatases, além de receptores para lipídeos, forma um grande grupo de proteínas que sinalizam de forma intra e/ou extracelular por meio dos lipídeos (Nozawa, 2002). Quando ativada, a DGK cataliza a fosforilação da molécula de DAG na posição *sn*-3 do glicerol, produzindo PA (Kano *et al.*, 1990). Reduzindo os níveis de DAG e aumentando os níveis de PA, esta enzima pode modular diversos eventos celulares regulados por estes dois lipídeos (Topham & Prescott, 1999).

Desde que foi primeiramente descrita por Hokin & Hokin (1959) em microsossomos de cérebro de rato, a atividade da DGK tem sido detectada em inúmeros tipos celulares e em diferentes tecidos. Os estudos bioquímicos, as purificações e a clonagem das isoformas desta enzima têm mostrado que a DGK pertence a uma grande família com isoformas que diferem entre si por suas estruturas primárias, especificidade para o substrato e distribuição nos tecidos. As nove isoformas de DGK presentes em mamíferos são codificadas por genes distintos, podendo também ocorrer processamento alternativo do mRNA. Foram classificadas de acordo com a ordem de clonagem do cDNA e

subdivididas em cinco grupos com base em suas características estruturais. Todas as DGKs apresentam conservados um domínio catalítico, para ligação do ATP, e dois domínios ricos em cisteínas (CRDs), que parecem estar envolvidos com a ligação do DAG. Além destes domínios, existe uma variedade de domínios regulatórios com funções já conhecidas e/ou propostas (Topham *et al.*, 1999; van Blitterswijk *et al.*, 2000).

As isoformas de DGK classe I: α (Sakane *et al.*, 1990), β (Goto & Kondo, 1993) e γ (Kai *et al.*, 1994) foram as mais estudadas. Os tecidos onde são encontradas incluem rim, cérebro e células sanguíneas. Estas enzimas são caracterizadas pela presença de um domínio para ligação de Ca^{2+} (domínio *EF-hands*), também presente em outras proteínas que se ligam a este íon. Já foi demonstrado que o Ca^{2+} liberado via IP_3 faz translocar a DGK do citossol para a membrana plasmática (Sakane *et al.*, 1991).

As isoformas da classe II, DGK δ (Sakane *et al.*, 1996) e η (Kauck *et al.*, 1996), tiveram seu cDNA recentemente identificadas. Estão presentes em músculo, rim, cérebro, testículo, pulmão e fígado. São caracterizadas pela presença de um domínio (domínio PH) responsável por interações proteína-proteína e lipídeo-proteína, especificamente com fosfoinosítídeos. Recentemente, foi observada a oligomerização da isoforma DGK δ em células COS-7 e HEK transfectadas, o que tem profundas implicações em sua regulação (Imai *et al.*, 2002).

A terceira classe (III) apresenta apenas uma isoforma, a DGK ϵ (Tang *et al.*, 1996). É conhecida como a única isoforma que possui seletividade para o substrato, fosforilando preferencialmente as espécies de DAG que contenham o ácido araquidônico na posição *sn*-2 do glicerol. Por este motivo a esta isoforma tem sido atribuída a função de ressíntese de fosfoinosítídeos na membrana plasmática após o estímulo de receptores acoplados à PI-PLC. As bases para tal seletividade não estão claras em sua estrutura primária, pois esta isoforma apresenta apenas os domínios básicos de todas as DGKs,

um domínio catalítico e dois CDRs, com nenhuma outra região conservada. Esta isoforma é enriquecida em testículo, estando presente também em músculo, pâncreas e cérebro.

A quarta classe (IV) contém duas isoformas de DGK, ζ e ι , que são caracterizadas pela presença de um domínio (domínio MARCKS) que sinaliza para sua localização nuclear e é sítio de fosforilação de PKC. Possuem ainda quatro domínios repetidos (domínio *ankyrin*) que estão envolvidos com interações proteína-proteína (Bunting *et al.*, 1996). Estas isoformas foram descritas em timo, intestino, músculo e cérebro.

A DGK θ é a única representante da classe V (Houssa *et al.*, 1997). Esta isoforma se distingue das outras por possuir três domínios CDRs ao invés de dois, um domínio PH, no meio da proteína, que se sobrepõe com outro domínio, chamado RA (domínio associado à ligação de proteína G monomérica Ras) e uma região rica em prolina no N-terminal que tem função desconhecida. Houssa *et al.* (1999) mostraram que RhoA – uma proteína G da família Ras – ativada era capaz de se ligar a esta isoforma inibindo-a.

A complexidade estrutural da família de DGKs sugere que estas diferentes isoformas estejam envolvidas em múltiplas vias de sinalização e funções celulares. A presença de regiões evolutivamente conservadas na estrutura das DGKs – não apenas regiões catalíticas, mas também regiões regulatórias – sugere um papel fundamental das DGKs na regulação das funções básicas da célula.

Três funções são atribuídas à DGK: (1) atenuar os efeitos de PKC (dependente de DAG), (2) gerar uma nova molécula sinalizadora (PA) e (3) iniciar a ressíntese de fosfoinosítídeos após a ativação da PI-PLC. Como foi mencionado, a manutenção de baixos níveis de DAG é de fundamental importância para a homeostasia celular. Kato *et al.* (1988) observaram que células transformadas possuíam elevados níveis de DAG e atividade de DGK diminuída, demonstrando a desregulação deste sistema de

sinalização. A maior parte dos efeitos patológicos provocados por elevados níveis de DAG deve-se à excessiva e/ou prolongada atividade da PKC. Além de células transformadas, tanto em tumores como em cultura, outras patologias apresentam atividade e/ou expressão anormal da PKC, como por exemplo diabetes, doenças cardíacas e hipertensão (Way *et al.*, 2000; Ohanian & Ohanian, 2001). Os estudos para o entendimento dos mecanismos moleculares que caracterizam estas doenças reservam à DGK uma atenção especial. Diversos trabalhos mostram que a ativação da DGK, após estímulo de receptor, atenua os efeitos da PKC localizada tanto na membrana plasmática (Nobe *et al.*, 1995; Pettitt & Wakelam, 1999) quanto na membrana nuclear (Topham *et al.*, 1998; D'Santos *et al.*, 1998).

Catalizando a reação que remove o DAG, a DGK finaliza a ativação da PKC mediada por receptor e gera um produto (PA) que tem outras funções, tanto na sinalização quanto na síntese de fosfoinosítídeos. Embora o PA constitua uma diminuta parcela do total dos fosfolípidos presentes nas membranas – inclusive nas de epitélio – as características de seu metabolismo, especialmente sua curta meia-vida e sua fina regulação por hormônios, o tornam uma ubíqua molécula mensageira, da mesma forma que seu precursor DAG.

Algumas observações exemplificam o papel de mensageiro secundário destas moléculas. Estudos que se tornaram clássicos mostraram que o PA estimula a síntese de DNA e a expressão de certos proto-oncogênes em processos acoplados a flutuações transitórias de Ca^{2+} (Gerrard *et al.*, 1978; Moolenaar *et al.*, 1986). Assim como o DAG, o PA participa na regulação de uma enorme diversidade de processos celulares (Nishizuka, 1984; de Chaffoy de Courcelles *et al.*, 1989; Dempsey *et al.*, 2000). A maior parte destes eventos está vinculada à atividade e a regulação de uma outra enzima que também produz o PA, a PLD. À PLD (Figura 4B) tem sido atribuído o papel de principal

responsável pela geração de PA sinalizador (Frohman & Morris, 1999), envolvido em importantes processos celulares, como o tráfico de vesículas (Liscovitch, 2000) e a polimerização da actina (Ha & Exton, 1993). É possível diferenciar o PA produzido pela atividade da DGK do PA produto de catálise da PLD (Figura 4). Uma vez que os fosfoinosítídeos são enriquecidos de ácidos graxos polinsaturados, o DAG gerado pela PI-PLC e o PA gerado pela DGK, consequentemente, mantém essa característica na sua composição lipídica (Figura 4A). O PA, produto da atividade fosfolipásica, caracteriza-se pela presença de ácidos graxos saturados e monoinsaturados, uma vez que o substrato desta reação, a fosfatidilcolina apresenta estas características na sua composição lipídica (Figura 4B).

Devido às diferenças moleculares entre o PA produzido pela PLD e pela DGK, é possível que a atividade da PLD ocorra em compartimentos subcelulares distintos daqueles em que a DGK opera (Hodgkin, 1998; van Blitterswijk *et al.*, 1999). Além de espacialmente separadas, estas duas enzimas podem estar temporalmente separadas. Acredita-se que a DGK atue numa fase inicialmente rápida da sinalização da via dos fosfoinosítídeos e que sua contribuição no processo metabólico de formação de PA seja quantitativamente menor quando comparado ao da PLD (formação de quantidades maiores e tardias de PA).

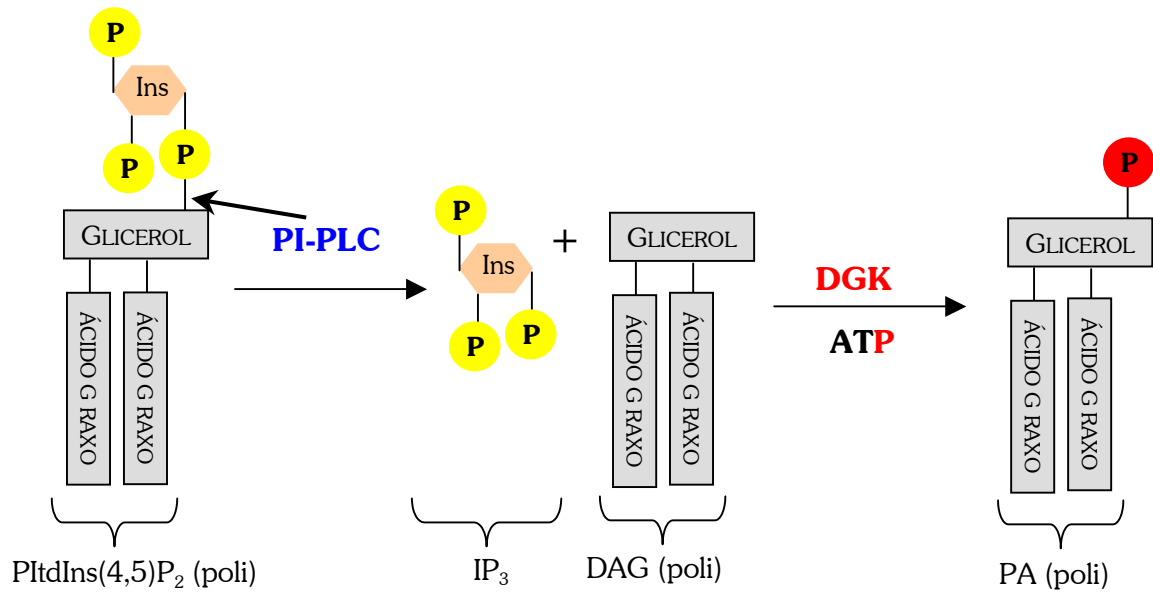
A DGK deve estar presente em vários sítios subcelulares, onde a PKC ou outras proteínas alvo do DAG precisem ser ativadas, ou onde o PA seja necessário para exercer determinada função. Assim, a DGK pode ser encontrada onde o seu substrato é gerado, podendo estar associada à membrana plasmática, ao núcleo e ao citoesqueleto da célula (forma citossólica). Pouco se sabe sobre os mecanismos de ativação das várias isoformas de DGKs. É provável que esses mecanismos sejam diferentes entre as isoformas, dada a diversidade de domínios regulatórios de suas estruturas primárias. A translocação entre

compartimentos subcelulares pode ocorrer a partir do estímulo de receptores associados à proteína G ou receptores tirosina cinases (Sanjuán *et al.*, 2001). No entanto, apenas a associação da DGK à membrana não parece ser o suficiente para ativá-la. Para ativação completa da DGK tem sido reportada a necessidade de fosforilação e/ou interação com outras proteínas na membrana (Schaap *et al.*, 1993; Walker, 2001). O tratamento de células com PI-PLC exógena elevou os níveis de DAG na membrana, no entanto, não estimulou a atividade da DGK (van der Bend *et al.*, 1994). Este e outros experimentos similares levaram a se especular de que a DGK inativa esteja complexada à PI-PLC. Quando a célula é estimulada por um agonista, o DAG produzido pela PI-PLC ativaria seus efetores (PKC, etc), mas quando a DGK é ativada (por algum mecanismo ainda desconhecido), o DAG produzido pela PI-PLC endógena seria diretamente “canalizado” para a DGK que o converteria em PA (Monaco *et al.*, 2002).

Finalmente, e como já foi mencionado acima, o PA constitui um intermediário chave na via de ressíntese de fosfoinosítídeos, fechando assim o ciclo que contribui para modular seus próprios níveis (Figura 5). Como substrato da enzima citossólica CTP:1,2-diacilglicerolfosfato citidilil transferase o PA entra numa via que leva sucessivamente à formação de PtdIns, PtdIns(4)P e o intermediário chave PtdIns(4,5)P₂ preservando assim a capacidade sinalizadora da membrana. Sendo o PtdIns(4,5)P₂ precursor imediato do DAG, é interessante mencionar que este composto é um ativador alostérico da síntese de PtdIns(s) como um todo, após estímulo de diferentes receptores. Assim, o DAG contribui para manter o balanço entre os diferentes intermediários regulatórios mostrados na seqüência de reações mostradas na Figura 5 (MacDonald *et al.*, 1988; Gurr & Harwood, 1991), especificamente requerido em diferentes circunstâncias fisiológicas.

Assim, as recentes observações sobre o papel regulatório da DGK, parecem de fato, indicar: a) que a população de DAG celular está espacialmente e funcionalmente

A) Via da Diacilglicerol cinase



B) Via da Fosfolipase D

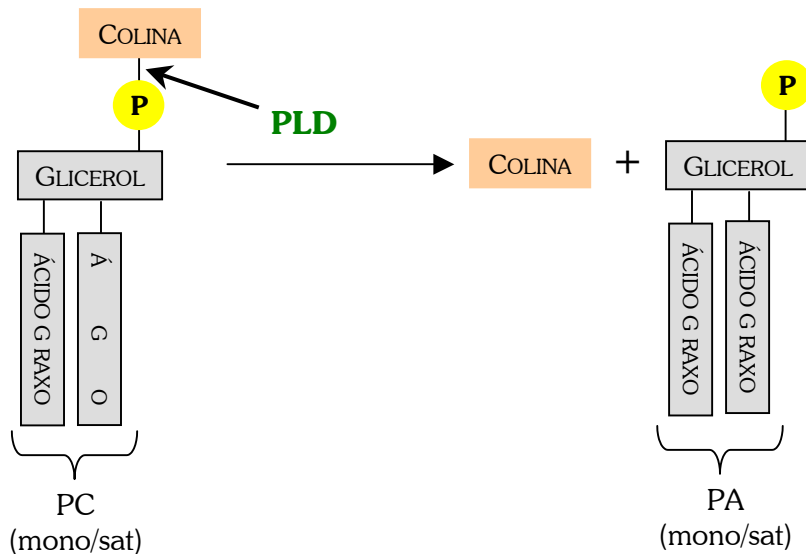


Figura 4: Formação de PA por duas vias distintas. A: via da DGK produzindo PA (poli) a partir de DAG (poli) proveniente da hidrólise de PI(4,5)P₂ (poli). **B:** via da PLD produzindo PA (mono/sat) diretamente a partir de PC (mono/sat); poli, mono e sat referem-se às características dos ácidos graxos com base no número de insaturações presentes.

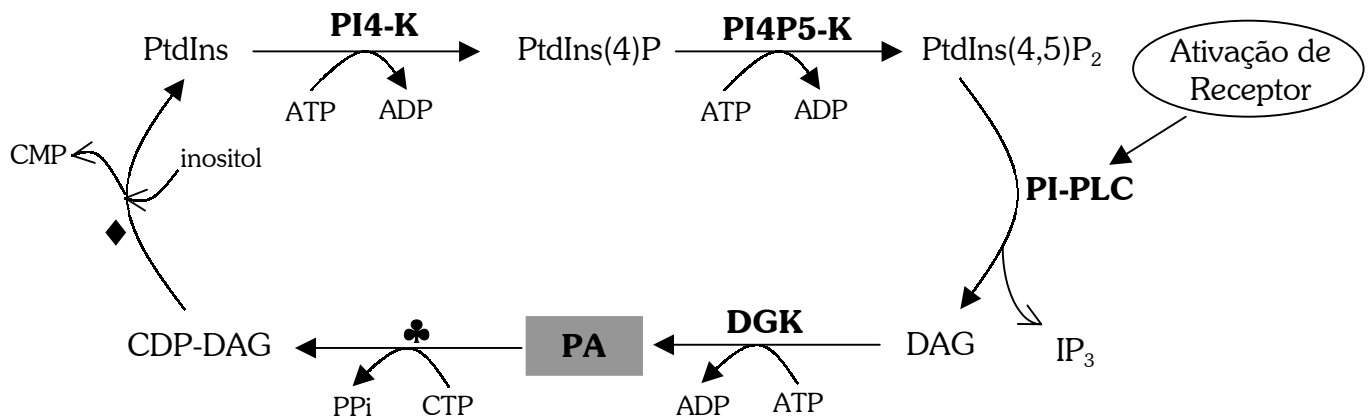


Figura 5: Ressíntese de fosfoinosítídeos na membrana plasmática a partir de PA. A hidrólise de PtdIns(4,5)P₂ pela PI-PLC ativada eleva os níveis de DAG que é convertido em PA pela DGK. O PA, intermediário chave na via de ressíntese de fosfoinosítídeos, é substrato da CTP:1,2-diacilglicerolfosfato citidilil transferase (♣) produzindo CDP-DAG. A CDP-DAG transferase (♦) troca o CMP associado ao diacilglicerol-fosfato pelo inositol, formando PtdIns. Após sucessivas reações de fosforilação pelas fosfatidilinositol cinases (PI4-K e PI4P5-K) o PtdIns(4,5)P₂ é novamente formado. CTP, CDP e CMP, citosina tri, di e monofosfato; ATP e ADP, adenosina tri e difosfato. Adaptado de Gurr & Harwood (1991).

segregada; b) que a DGK está intimamente envolvida na depleção do DAG gerado por um complexo sinalizador PI-PLC/DGK; c) que a enzima está restrita a sítios intracelulares na membrana plasmática ou nuclear (Kano *et al.*, 2002); d) que a enzima participa de uma sequência de reações acopladas que modulam os níveis de fosfoinosítídeos na membrana, contribuindo para a manutenção de níveis adequados de diferentes moléculas sinalizadoras.

Na última década, passou a ser reconhecido o papel regulatório de lipídeos que, em quantidades diminutas, participam na regulação de processos de transporte nos rins. Os eventos centrais do metabolismo celular, relacionados com estes lipídeos, envolvem geralmente reações de fosforilação/defosforilação, mediadas neste caso por lipídeos cinases e lipídeos fosfatases. Trabalhos de nosso laboratório mostraram que o PtdIns(4)P endógeno ativava a $(Ca^{2+} + Mg^{2+})ATPase$, modulando eventos de transporte iônico nas células renais (Guilherme *et al.*, 1998). Mais recentemente Einicker-Lamas *et al.* (2003) observaram interações entre os glicero e os esfingolipídeos e a presença de uma esfingosina cinase associada à MBL. Em ambos os trabalhos, também se observaram a formação de PA quando as membranas eram incubadas em meio fosforilante, sugerindo a presença de uma DGK associada à MBL. A fim de investigar se aumentos nos níveis de DAG na membrana poderiam modular a atividade da $(Ca^{2+} + Mg^{2+})ATPase$, concentrações crescentes de DAG exógeno (dipalmitoilglicerol) foram adicionadas ao meio de dosagem da ATPase (Figura 4). Observou-se que a $(Ca^{2+} + Mg^{2+})ATPase$ foi modulada de maneira bifásica pelo DAG, tendo sua atividade inibida em mais de 50 % por 50 nM do lipídeo. Estes resultados tornaram evidente a importância de um sistema enzimático residente na MBL, capaz de modular os níveis relativos de DAG na vizinhança de sistemas co-localizados nesta membrana.

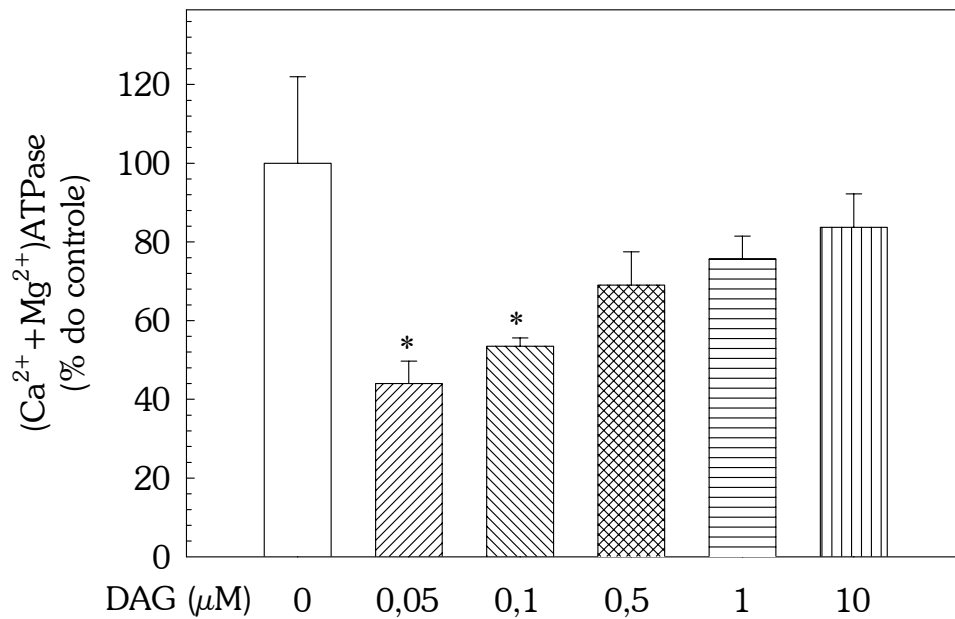


Figura 6: Efeito do DAG exógeno na atividade da $(Ca^{2+} + Mg^{2+})ATPase$.

Membranas foram pré-incubadas por 10 min em concentrações crescentes de DAG exógeno indicadas na abscissa. Outras condições do meio de reação foram mantidas constantes como descrito em Materiais e Métodos. Os valores de atividade apresentados correspondem à média de pelo menos 3 experimentos $\pm$ erro padrão. * $p \leq 0,01$ em relação ao controle sem DAG.

2 – OBJETIVO

Tendo em vista os resultados anteriormente mencionados, o objetivo desta tese foi iniciar a caracterização da atividade *in situ* da DGK presente na membrana basolateral de túbulos proximais de rins de porco, investigando parâmetros capazes de proporcionar informações a cerca de seu mecanismo de catálise nas condições impostas pela membrana nativa. Pretendeu-se assim investigar as propriedades e os requerimentos de uma enzima que possui claramente um significativo potencial regulatório nos processos de transporte transepitelial de fluidos.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Preparação da fração purificada de membrana basolateral de túbulos proximais renais

Os fragmentos e as vesículas derivadas de membrana basolateral foram purificados segundo o método original descrito por Scalera *et al.* (1980) com algumas modificações (Sacktor *et al.*, 1981; Boumendil-Podevin & Podevin, 1983). Rins frescos de porcos (4-6 pares em cada preparação) foram obtidos de matadouros regulamentados. Os rins foram transportados até o laboratório em solução I, contendo sacarose 0,25 M, Hepes-Tris 10 mM (pH 7,6), EDTA 2 mM, PMSF 1 mM e inibidor de tripsina II 0,15 mg $\times$ mL⁻¹. Foram dissecados sobre uma plataforma de vidro resfriada, retirando-se a porção externa do córtex (*córtex-corticis*), cuja população de células corresponde majoritariamente (95 %) a túbulos contornados proximais (Whittembury & Provérbio, 1970). As fatias de córtex foram pesadas, o volume de solução I foi calculado para o passo seguinte de homogeneização (1 mL solução/ 1g tecido) e em seguida as fatias foram picadas com uma tesoura. Esta suspensão foi homogeneizada 30 vezes a 2.000 rpm em homogeneizador de tecido tipo Potter com pistilo de teflon. Este homogenato foi centrifugado por 10 min a 1.500 $\times$ g em centrífuga refrigerada, modelo Sorvall (rotor GSA). O sobrenadante desta primeira centrifugação foi guardado e o precipitado submetido a uma segunda homogeneização para ser novamente centrifugado nas mesmas condições. O primeiro e segundo sobrenadante foram reunidos e centrifugados por 30 min a 48.000 $\times$ g em ultracentrífuga Hittachi (rotor 45Ti). A porção mais externa do precipitado (fração microssomal) foi delicadamente ressuspensa em 6 mL de solução II (igual à solução I sem EDTA) e acrescentada de Percoll (concentração

final 12 % v/v). A suspensão final foi homogeneizada no mesmo homogeneizador mecânico por 10 vezes a 2.000 rpm e centrifugada por 70 min a 40.000×g em ultracentrífuga Hittachi (rotor 70Ti). Dos 26 mL contidos em cada tubo, os primeiros 7,8 mL (do topo para a base do gradiente) foram retirados e descartados, sendo então coletados e reservados os 4,3 mL seguintes. Depois de reunidas, as frações do gradiente foram homogeneizadas, da mesma forma anteriormente citada, e submetidas a centrifugação por 60 min a 200.000×g em ultracentrífuga Hittachi (rotor 65Ti) para a retirada do Percoll da preparação. O Percoll que fica firmemente aderido no fundo do tubo permite que o sedimento de membranas, fracamente aderido, seja aspirado. Os fragmentos e as vesículas, formadas a partir dos fragmentos de membrana basolateral, foram ressuspensos em um volume de sacarose 0,25 M, suficiente para uma concentração final de proteínas em torno de 25 mg × mL⁻¹. Conservadas em nitrogênio líquido, as preparações são utilizadas por até três meses.

A atividade da (Na⁺+K⁺)ATPase da preparação foi sistematicamente dosada a cada nova preparação. Esta enzima, além de estar enriquecida em túbulos proximais, está presente apenas em membrana basolateral, sendo então considerada a enzima marcadora desta fração (Scalera *et al.*, 1980; Gmaj *et al.*, 1982; Tsukamoto *et al.*, 1988). Com este método, obtém-se um significativo enriquecimento da atividade (Na⁺+K⁺)ATPásica de 12–15 vezes em relação à do homogenato total. Esta preparação conta com 32 % de fragmentos de membrana não resselados e ≈ 10 % de vesículas *inside out* (fragmentos de membrana resselados ao contrário, isto é, com a face intracelular da membrana na plasmática voltada para o lado externo da vesícula), de modo que aproximadamente a metade das estruturas de membranas na preparação oferece livre acesso ao ATP e aos outros cofatores que participam na reação catalisada pela DGK (Kato & Kato, 1987). A contaminação residual desta fração com outros marcadores

de membranas intracelulares é mínima. Seis preparações aleatoriamente escolhidas para testar níveis de contaminação mostraram que a atividade da succinato desidrogenase (marcador de membrana mitocondrial), da fosfatase ácida (marcador de lisossoma) e da glicose-6-fosfatase (marcador de retículo endoplasmático) decrescem respectivamente para 17, 8 e 15 % em relação às atividades no homogenato total (Coka-Guevara *et al.*, 1999).

As proteínas totais dos fragmentos de membrana basolateral foram medidas segundo o método descrito por Lowry *et al.* (1951), com algumas modificações. As amostras foram previamente diluídas (100 vezes) em SDS 5 % para expor um maior número de aminoácidos aos reagentes da dosagem. A albumina bovina 0,1 % foi utilizada como padrão.

3.2 - 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}Pi (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}Pi 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 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$.

3.3 - Ensaio da atividade de lipídeos cinases presente na membrana basolateral

Para a dosagem da atividade da DGK, as membranas foram incubadas no meio utilizado para os ensaios de fosforilação de lipídeos descrito anteriormente por Guilherme *et al.* (1998), com algumas modificações. O meio de reação (1 mL) continha Mes-Tris 30 mM (pH 7,0), MgCl_2 1,1 mM (ou EDTA 5 mM para condições livres de Mg^{2+}), ouabaína 0,5 mM, azida sódica 10 mM, EGTA 0,5 mM e $0,1 \text{ mg} \times \text{mL}^{-1}$ de proteína de MBL. A reação foi iniciada com a adição de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 1 mM (atividade específica $\approx 10^5$ cpm/nmol) ao meio e a incubação ocorreu a 37 °C, exceto quando foi estudada a influência de variações de temperatura. As condições experimentais foram escolhidas para reproduzir o meio de reação empregado no estudo de reações de transporte iônico (objeto de interesse do laboratório), potencialmente moduladas por PA e/ou seus precursores e metabólicos. Após 10 min de incubação, a reação foi parada com a solução de extração, iniciando a etapa de extração dos lipídeos.

Todas as modificações do meio de reação estão descritas nas legendas das figuras. Quando U73122, DAG, esfingosina (Sph), $\text{PtdIns}(4)\text{P}$ ou S1P foram adicionados ao meio, realizou-se uma pré-incubação das membranas com o meio de reação sem ATP, por 10 min. O DAG e o $\text{PtdIns}(4)\text{P}$, quando utilizados, eram secos em N_2 , ressuspensos no meio de reação (sem proteína e ATP) e sonificados em sonificador de banho por 10 min a temperatura ambiente. Substâncias diluídas em DMSO foram usadas em volume inferior a 10 μL (concentração final de DMSO menor que 1 %), não apresentando diferenças significativas em relação ao controle (sem DMSO). Os valores de atividade apresentados correspondem à média de pelo menos 3 experimentos $\pm$ erro padrão.

3.4 - Extração de lipídeos e análise de [³²P]ácido fosfatídico da membrana basolateral

A extração de lipídeos foi realizada como descrito por Horwitz & Perlman (1987) a partir do momento da parada da reação. Aos tubos de reação foram adicionados 5 mL de uma solução de clorofórmio:metanol:ácido clorídrico (200:100:0,75; v/v) e após homogeneização, estes foram mantidos no gelo durante 10 min. Em seguida, adicionou-se à mistura 1 mL de HCl 0,6 M e, após nova homogeneização, os tubos foram centrifugados em centrífuga analítica por 10 min a 2.000 rpm, para a separação das fases orgânica e aquosa. Após a remoção e o descarte da fase superior (fase aquosa) e da interfase (rica em proteína), 1 mL de uma solução de clorofórmio:metanol: ácido clorídrico 0,6 M (3:48:47; v/v) foi adicionado à fase orgânica e homogeneizado. Após nova centrifugação e separação de fases, a fase orgânica inferior foi transferida para um novo tubo, cujo líquido foi evaporado em N₂. O extrato lipídico foi então ressuspensionado em 90 µL de uma solução de clorofórmio:metanol:água (75:25:2; v/v).

Os lipídeos extraídos foram separados e analisados por cromatografia em camada fina (TLC) com corrida unidimensional em cromatoplasmas de sílica gel (60 F254, Merck), usando um sistema de solvente contendo clorofórmio:acetona:metanol:ácido acético:água (80:30:26:24:16; v/v) (Horwitz & Perlman, 1987). As cromatoplasmas foram previamente ativadas a 110 °C por 10 min e, em seguida, todo o volume do extrato lipídico foi aplicado. Após a corrida e a evaporação completa dos solventes, um filme para raio-X (Kodak X-Omat) foi exposto à cromatoplasma e o cassete mantido em freezer durante 72 h. Após este período de tempo, o filme foi revelado e a cromatoplasma exposta a vapores de iodo para a visualização dos fosfolipídeos, indicando a mobilidade relativa de cada lipídeo da amostra e do padrão de PA (10 µg) aplicados. As áreas

correspondentes ao PA foram marcadas na cromatoplaca, sobrepondo-as com as do seu correspondente autorradiograma.

Para a quantificação da radiação presente na área de PA marcado, a sílica da região da cromatoplaca contendo o lipídeo radioativo foi cuidadosamente raspada com bisturi e colocada diretamente em *vials*, contendo solução cintiladora (POPOP:Tolueno; 0,1 g/L). A radioatividade foi medida em um contador de cintilação líquida.

3.5 – Formação, extração e reconstituição do PtdIns(4)[³²P]P ao meio de dosagem da DGK

Esta etapa foi realizada para verificar o efeito do PtdIns(4)P (produzido endogenamente pela MBL na presença de 0,1 mM de Sph) na atividade da DGK. O ensaio de fosforilação foi realizado como já descrito (item 3.3), na presença de 0,1 mM de esfingosina. O PtdIns(4)P formado, nesta condição, foi isolado por TLC com corrida unidimensional em cromatoplasas de sílica gel, usando o mesmo sistema de solvente anterior (item 3.4). Após a evaporação completa dos solventes, um filme para raio-X (Kodak X-Omat) foi exposto à cromatoplaca e o cassete mantido em freezer durante 72 h. Após este período de tempo, o filme foi revelado e a cromatoplaca exposta a vapores de iodo para a visualização dos fosfolipídeos da amostra. A área correspondentes ao PtdIns(4)P foi marcada na cromatoplaca, sobrepondo-a com a do seu correspondente autorradiograma. A sílica da área marcada foi raspada e colocada em um tubo cônico, Ao tubo foram adicionados 2 mL de clorofórmio e após agitação por 2 min em *vortex*, o tubo foi centrifugado por 30 min a 2.000 rpm (em centrífuga clínica). O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e reservado em gelo para que uma nova extração ocorresse com a sílica precipitada. Depois de reunidos os sobrenadantes, o tubo teve seu

conteúdo evaporado em N_2 para o início da etapa seguinte. O extrato de PtdIns(4) [^{32}P]P, resultante da etapa anterior, foi ressuspensão no meio de reação de dosagem da DGK (sem proteína e ATP) e sonificado por 10 min em sonificador de banho a temperatura ambiente. Uma etapa de pré-incubação de 10 min a 37 °C com a proteína ocorreu antes de iniciar a reação pela adição do ATP.

3.6 - Determinação da atividade da $(Ca^{2+}+Mg^{2+})ATPase$ da MBL

A atividade da $(Ca^{2+}+Mg^{2+})ATPase$ da MBL, foi determinada a 37 °C pela medida da diferença entre a hidrólise do ATP na presença de 20 μM de Ca^{2+} livre e a hidrólise na presença de 0,5 mM de EGTA. O ensaio foi realizado em um meio de incubação (1 mL), contendo tampão Bis-Tris Propano 50 mM (pH 7,4), azida sódica 10 mM, ouabaína 0,5 mM, KCl 120 mM, $MgCl_2$ 5 mM e 0,2 mg $\times mL^{-1}$ de proteína. A reação foi iniciada com a adição de 5 mM de ATP. A reação foi interrompida, após 20 min, pela adição de 1,5 mL de carvão ativado gelado (4 °C) para adsorção do ATP ainda presente na solução. As amostras foram imediatamente centrifugadas em centrífuga analítica a 1.000 rpm por 40 min. Alíquotas de 0,5 mL dos sobrenadantes foram retiradas e o P_i determinado colorimetricamente pelo método de Fiske-Subbarow modificado (Taussky & Shorr, 1953).

3.7 - Cálculo das concentrações do complexo $Mg.ATP^{2-}$ e das espécies livres de Mg^{2+} , Ca^{2+} e ATP

As concentrações de Mg^{2+} , Ca^{2+} , ATP livre (ATP^{4-} e $HATP^{3-}$) e do complexo $Mg.ATP^{2-}$ ($Mg.ATP^{2-}$ predomina e $Mg.HATP^-$ em concentrações várias ordens de

grandeza menores) foram calculadas utilizando um programa de computador (MCalc), que está baseado num método iterativo (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+} , ATP, Ca^{2+} , EGTA e H^+ . A partir das informações fornecidas ao programa sobre as concentrações dos componentes do meio de reação (notadamente ATP e $MgCl_2$), calculam-se as concentrações das diferentes espécies e, no caso dos experimentos de variações de Ca^{2+} livre, as concentrações necessárias de $CaCl_2$.

3.8 - 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 *Post-Hoc* de Tukey com $p \leq 0,05$.

3.9 – Reagentes e soluções

Sacarose, Hepes, Mes, Tris-base, Bis-Tris Propano, EDTA, EGTA, PMSF, inibidor de tripsina II, ouabaína, U73122, Sph, S1P e ATP de sódio foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (Saint Louis, MO). DAG e PA foram obtidos da Avanti (Alabaster, AL). Os solventes orgânicos e as cromatoplacas foram adquiridos da Merk. O revelador e o fixador foram obtidos da Kodak (Resende, Brasil). Todos os outros reagentes utilizados foram da mais alta pureza disponível no mercado. Todas as soluções foram preparadas utilizando-se água deionizada. O pH das soluções foi ajustado à temperatura do ensaio. O EDTA foi neutralizado com Tris base. O $[^{32}P]Pi$ foi obtido do Instituto Brasileiro de

Energia e Pesquisas Nucleares (IPEN). O ATP foi utilizado na forma de sal de Tris. Os tampões Hepes-Tris e Mes-Tris foram preparadas neutralizando as soluções ácidas de Hepes e Mes com Tris base até o pH desejado. Já a forma básica do tampão Bis-Tris Propano foi neutralizado com HCl até o pH desejado¹.

¹ As concentrações indicadas dos tampões Hepes-Tris e Mes-Tris referem-se às concentrações do ácido; no caso do Bis-Tris Propano a concentração do tampão refere-se à da base.

4 - RESULTADOS

Embora o homogenato total de rim de hamster revele a presença de uma DGK (Klauck *et al.*, 1996), o estudo realizado não definiu a compartimentalização da enzima. Nesta tese foi inicialmente mostrado que cinases presentes em frações purificadas de membrana basolateral de túbulos proximais incubadas com $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ são capazes de fosforilar apenas dois fosfolipídeos endógenos formando PA e PtdIns(4)P, em níveis detectáveis (Figura 7A), apesar da membrana apresentar inúmeros outros lipídeos (Figura 7B). No solvente utilizado, o produto radioativo de maior R_f ($\approx 0,75$) co-migra com o padrão de PA comercial (detectado com vapores de iodo) em cromatoplaça de sílica (Figuras 7A e 7B). A atividade da DGK foi dependente de Mg^{2+} , assim como a PI4-K, uma vez que a adição de 5 mM de EDTA, um quelante de Mg^{2+} , ao meio de reação, suprimiu a marcação radioativa em PA e PtdIns(4)P (Figura 7A), mas não alterou o padrão geral de lipídeos da membrana, detectado em vapores de iodo (Figura 7B).

Confirmada a presença de uma atividade de DGK nas frações purificadas de MBL, passou-se a investigar os requisitos necessários para a máxima atividade desta enzima, iniciando pela primeira vez sua caracterização em um compartimento bem definido das células renais. A fosforilação de DAG endógeno, catalizada pela população de DGKs presentes em $0,1 \text{ mg de proteína} \times \text{mL}^{-1}$, manteve-se linear até os 10 min (Figura 8A). Foi também observada linearidade em relação à dependência da concentração de proteína entre $0,05$ e $0,2 \text{ mg} \times \text{mL}^{-1}$, bem como a supressão da síntese de PA marcado quando as membranas foram incubadas a 100°C por 5 min antes do ensaio ($\diamond$), confirmando o envolvimento de uma enzima na fosforilação (Figura 8B). A caracterização da DGK de MBL prosseguiu com o estudo da dependência do pH nestas membranas, através das quais ocorrem importantes fluxos de H^+ e HCO_3^- mediados por

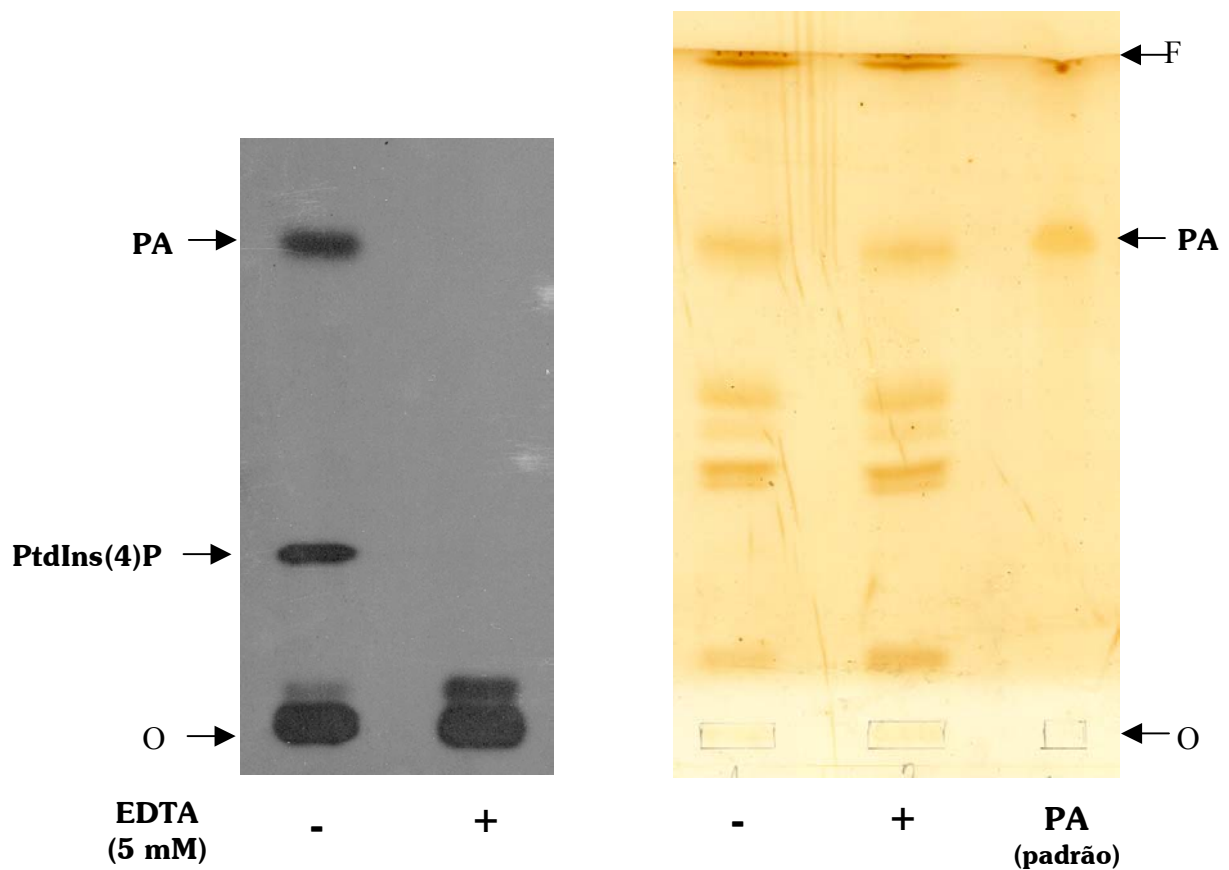
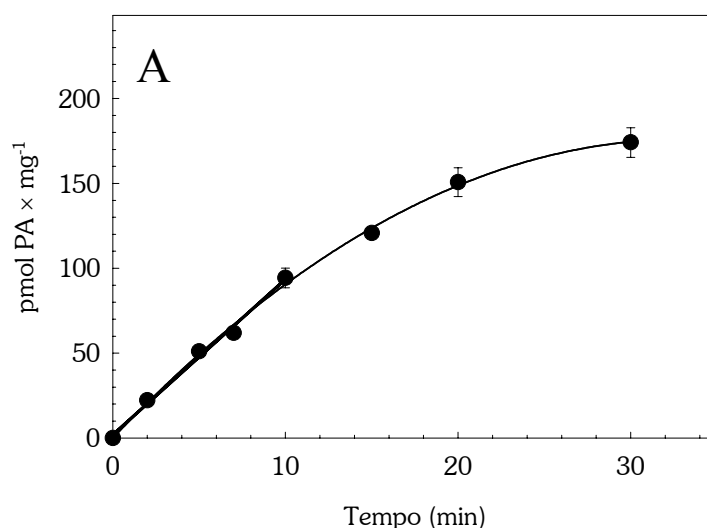


Figura 7: Identificação do ácido fosfatídico formado pelas MBLs incubadas na presença de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$. **A:** autorradiograma de uma cromatoplaca, após ensaio de fosforilação, na presença de 1,1 mM de MgCl_2 (controle) e na sua ausência (EDTA 5 mM), como descrito em Materiais e Métodos, evidenciando os fosfolípidos marcados com ^{32}P . **B:** cromatoplaca (mesma que deu origem à figura A) revelada em vapores de iodo indicando uma variedade de lípidos que são separados neste sistema de solvente e o padrão de PA (1,2-dipalmitoil glicerofosfato). PA, ácido fosfatídico; PtdIns(4)P, fosfatidilinositol(4)fosfato; O, origem de aplicação; F, *front* de corrida do solvente.



B

Figura 8: Curso temporal da formação de PA pelas MBLs durante ensaio de fosforilação e dependência da concentração de proteína. A: membranas foram incubadas como descrito em Materiais e Métodos. Nos tempos indicados na abscissa, alíquotas foram retiradas e a reação foi interrompida pela adição da solução de extração de lipídeos seguida do isolamento de PA, como descrito em Materiais e Métodos. **B:** membranas em concentrações crescentes de proteína foram incubadas como descrito em Materiais e Métodos. ◇: membranas fervidas por 5 min antes do ensaio de fosforilação. Os valores de atividade apresentados correspondem à média de pelo menos 5 experimentos $\pm$ erro padrão.

diferentes transportadores (de Mello-Aires & Malnic, 2002), visando caracterizar os grupamentos químicos da enzima e dos substratos potencialmente envolvidos na catálise. A atividade da DGK exibe um pH ótimo numa faixa muito estreita, com um máximo de atividade em pH 7,0 (Figura 9B). Valores de pH que se distanciam deste pH ideal, mesmo que a diferença seja de 0,1 ponto para mais ou para menos, provocam uma drástica redução da atividade da enzima em $\approx 50\%$. Esta diferença na formação de PA pode ser visualizada em um autorradiograma representativo (Figura 9A).

O estudo da dependência da temperatura² mostra uma atividade muito baixa até 17 °C seguida de um acentuado aumento à medida que a temperatura cresce até 37 °C (Figura 10). Temperaturas entre 32 e 40 °C resultam em atividades iguais entre si mas, diferentes para valores inferiores ou superiores a esta faixa. Uma rápida diminuição é observada com aumentos de temperatura até 45 °C. Quando os valores do log da atividade enzimática são plotados em função do inverso da temperatura absoluta, duas retas podem ajustar-se aos pontos experimentais, com uma inflexão a 22 °C (Figura 11). Os valores de energia de ativação (E_a) da reação podem ser calculados a partir da inclinação das retas, segundo a equação empírica de Arrhenius: $A = e^{-E_a/RT}$, onde A é a atividade a cada temperatura, e é a base de logaritmos neperianos, E_a é a energia de ativação, R é a constante geral dos gases e T a temperatura absoluta. Os valores de E_a encontrados foram 10,9 e 28,5 kcal $\times$ mol⁻¹ para as faixas de temperatura acima (a) e abaixo (b) da fase de transição, respectivamente. Todavia, apesar do excelente ajuste encontrado para as duas retas ($r_a^2 = 0,94$ e $r_b^2 = 0,99$), uma função curvilínea contínua (curva tracejada na Figura 11) também pode se ajustar aos valores experimentais no

² O efeito da temperatura na velocidade de reação pode ser devido a diferentes causas. Estas podem ser: efeitos na estabilidade da enzima, na velocidade de formação de produto(s) a partir do complexo ativado, mudanças da(s) afinidade(s) pelo(s) substrato(s), mudanças na dependência do pH, mudanças de passos limitantes etc.

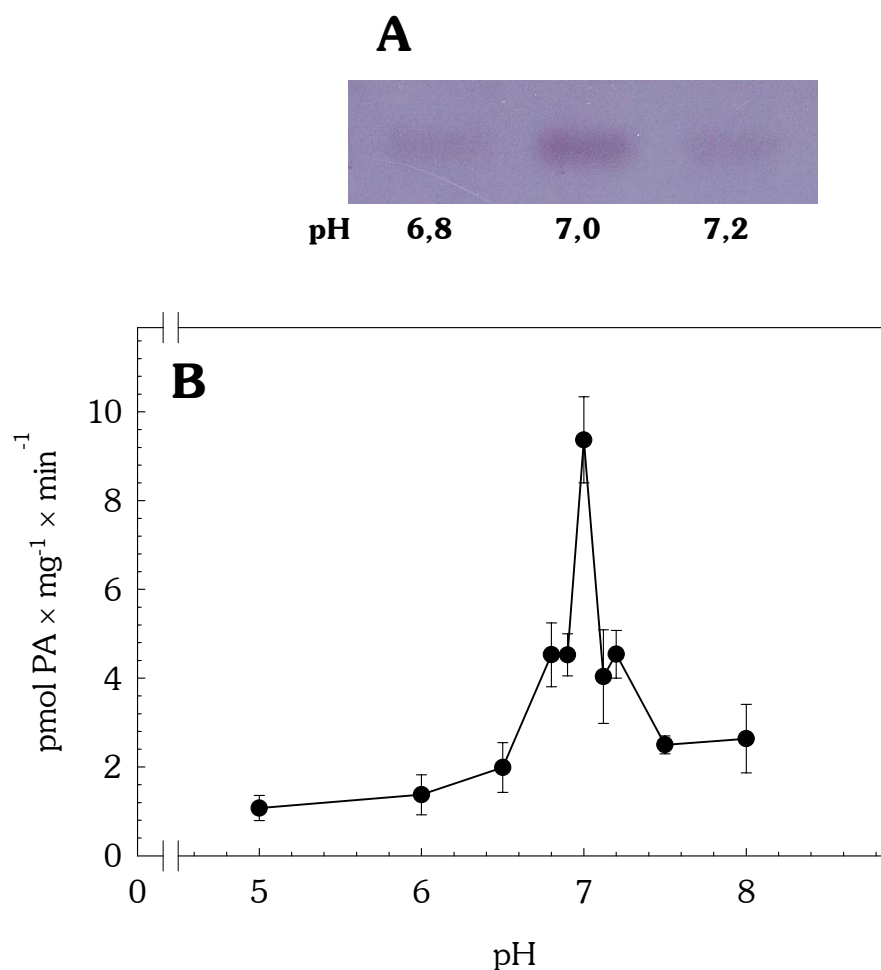


Figura 9: Efeito do pH na formação de PA pelas MBLs. **A:** autorradiograma de uma cromatoplaça mostrando a formação de PA nos valores de pH indicados. **B:** atividade da DGK determinada com descrita em Materiais e Métodos, exceto que o pH do meio variou entre pH 5,0 e pH 8,0, como indicado na abscissa. Os valores de atividade apresentados correspondem à média de pelo menos 4 experimentos $\pm$ erro padrão.

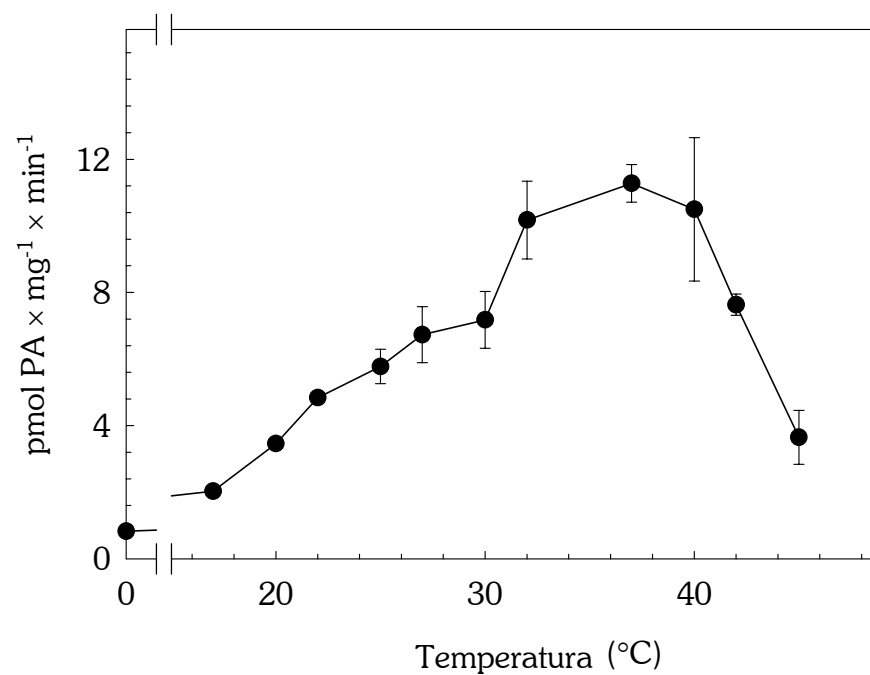


Figura 10: Efeito da temperatura na formação de PA pelas MBLs. A atividade da DGK foi medida a temperaturas variando entre 0 e 45 °C. Outras condições estão descritas em Materiais e Métodos. Os valores de atividade apresentados correspondem à média de pelo menos 2 experimentos $\pm$ erro padrão.

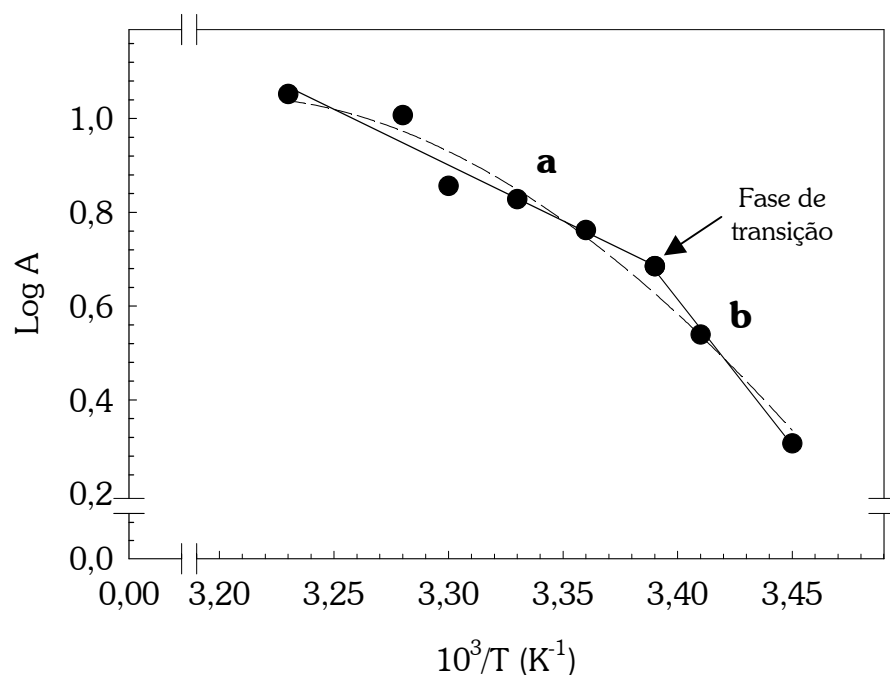


Figura 11: Gráfico de Arrhenius para a fase de ativação da DGK. A fase de ativação compreendeu o intervalo de temperatura entre 17 e 37 °C. As energias de ativação foram calculadas a partir da inclinação das retas do gráfico de Log A vs 1/T, onde A é a atividade da DGK e T é a temperatura absoluta. As retas representam o ajuste aos pontos experimentais da equação de Arrhenius (ver texto). Os valores de E_a , calculados a partir das inclinações das retas, foram 10,9 e 28,5 kcal $\times$ mol⁻¹ para as faixas de T acima (a) e abaixo (b) de 22 °C ($r_a^2 = 0,94$ e $r_b^2 = 0,99$). A linha tracejada representa o ajuste aos pontos experimentais da função polinomial contínua $\log A = a + b/T + c/T^2$ ($r^2 = 0,97$).

gráfico de $\log A$ vs $1/T$, o que permite propor mais uma alternativa para explicar a dependência térmica da DGK em MBLs nativas (ver Discussão).

Para investigar o comportamento da DGK em relação ao substrato doador de energia, o ATP, e ao cofator obrigatório, o Mg^{2+} (Figura 7A), foram realizadas duas séries de experimentos independentes. Na primeira, a atividade da enzima foi medida na presença de concentrações crescentes de ATP (até 5 mM), mantendo-se fixa (em 1,1 mM) a concentração de $MgCl_2$ (Figura 12). A seguir, variou-se a concentração de $MgCl_2$ (até 10 mM), mantendo-se fixa a de ATP (1 mM) (Figura 13). Observou-se uma dependência tipicamente Michaeliana em relação ao ATP total (ATP_t) com um K_m aparente de 0,32 mM e uma V_{max} de $19,8 \text{ pmol PA} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ (Figura 12). Quando a atividade da DGK se correlacionava com a concentração de $MgCl_2$, os pontos experimentais também foram ajustados por uma hipérbole equilátera, com um $K_{0,5(MgCl_2)}$ de 0,26 mM e uma V_{max} de $12,9 \text{ pmol PA} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ (Figura 13).

A observação de que, com concentrações saturantes de $MgCl_2$ (10 mM) e ATP total fixo (e subsaturante) a V_{max} é 35 % menor que a obtida com concentrações saturantes de ATP (5 mM) e $MgCl_2$ (1,1 mM) (compare a Figura 13 com a Figura 12) constituiu um forte indicativo de que o verdadeiro substrato da DGK de MBL seria o complexo $Mg.ATP^{2-}$, como sugerido para a DGK de outras fontes (Walsh *et al.*, 1995; Jiang *et al.*, 2000). A Figura 14, construída a partir dos dados da Figura 12, mostra que a atividade da DGK ($\blacktriangle$) aumentou de forma hiperbólica em função do aumento da concentração do complexo $Mg.ATP^{2-}$, tendendo à saturação quando no entanto a concentração de ATP livre ($\circ$) apresentava um rápido crescimento. Nestas condições, o K_m para $Mg.ATP^{2-}$ (0,44 mM) continua sendo essencialmente igual ao encontrado para o ATP total (0,32 mM; Figura 12). Quando os dados de atividade da DGK ($\blacktriangle$) da Figura 13 são apresentados em função da correspondente concentração de $Mg.ATP^{2-}$ (Figura

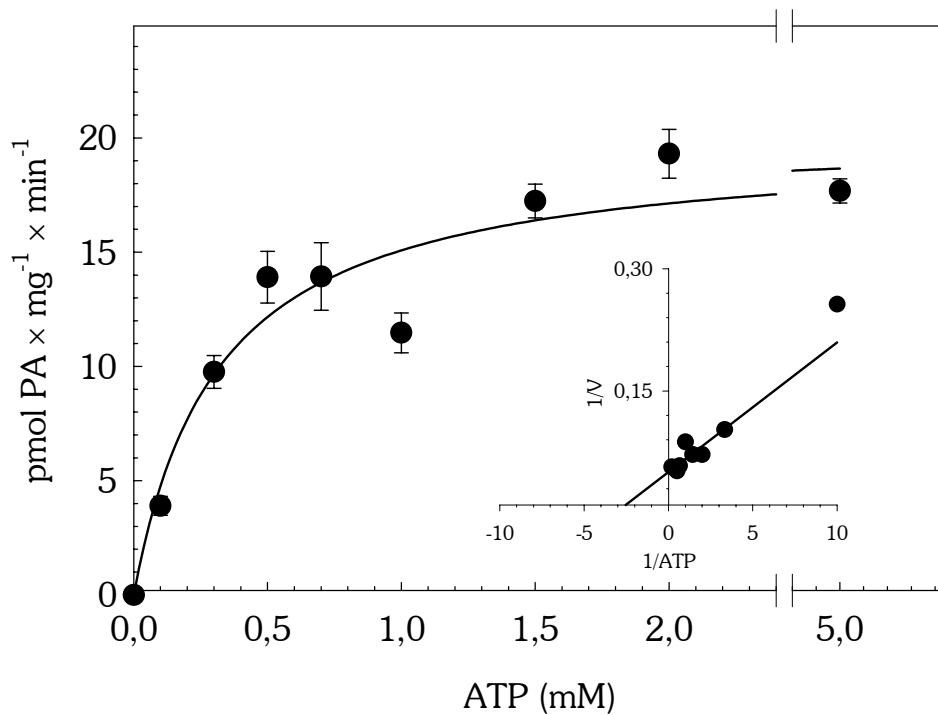


Figura 12: Dependência da atividade da DGK do substrato doador de fosforila (curva de ATP total). As membranas foram incubadas em concentrações crescentes de ATP, conforme indicado na abscissa e de uma concentração fixa de MgCl₂ (1,1 mM). Outras condições do meio de reação foram as descritas em Materiais e Métodos. A curva representa o ajuste aos pontos experimentais da função $V = V_{\max} \times [ATP_t] / (K_{m(ATP_t)} + [ATP_t])$. **Inset:** gráfico duplo-recíproco dos dados apresentados no painel principal ($r^2 = 0,96$). Os valores de atividade apresentados correspondem à média de 4 experimentos $\pm$ erro padrão.

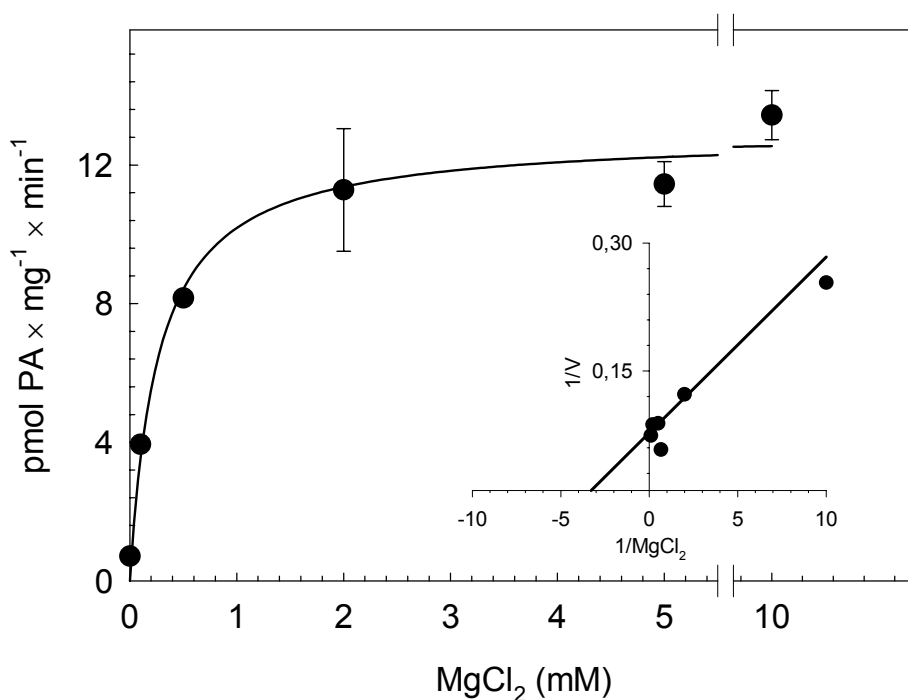


Figura 13: Dependência da concentração de MgCl₂ da atividade da DGK. As membranas foram incubadas na presença de concentrações crescentes de MgCl₂, como indicado na abscissa, e na presença de ATP total constante (1 mM). As outras condições experimentais foram as descritas em Materiais e Métodos. A curva representa o ajuste aos pontos experimentais da função $V = V_{\max} \times [\text{MgCl}_2] / (K_{0,5(\text{MgCl}_2)} + [\text{MgCl}_2])$, onde $K_{0,5}$ é a concentração de MgCl₂ necessária para obter a metade da $V_{\max}$. **Inset:** gráfico duplo-recíproco dos dados apresentados no painel principal ($r^2 = 0,98$). Os valores de atividade apresentados correspondem à média de 3 experimentos $\pm$ erro padrão.

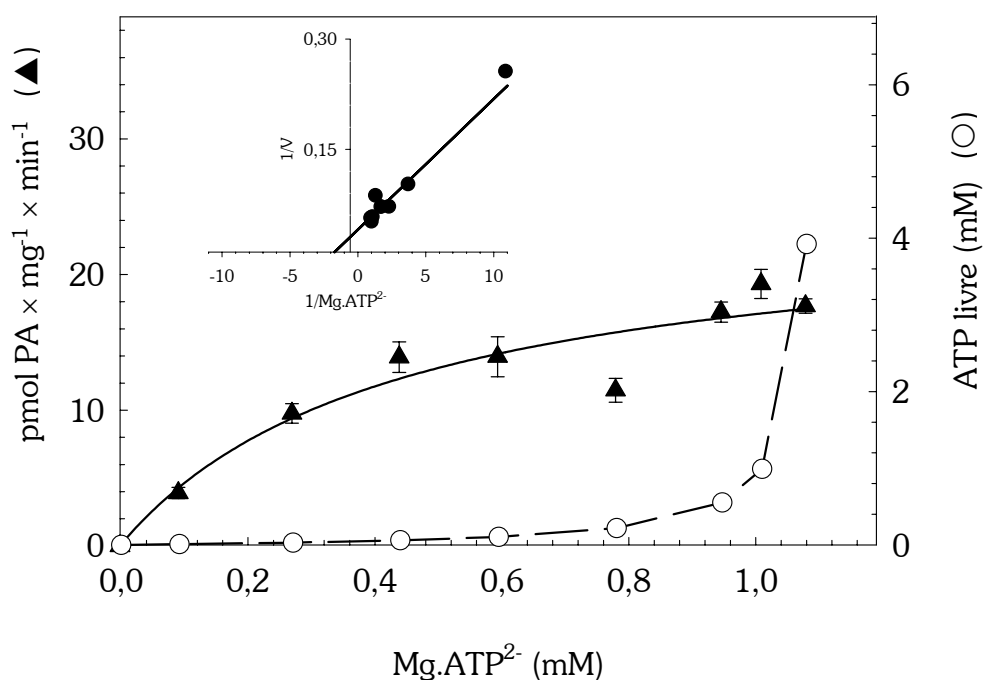


Figura 14: Curva do substrato (doador de fosforila) da DGK: dependência da concentração do complexo Mg.ATP^{2-} (ATP total variável). A atividade da DGK (▲) foi medida como descrito em Materiais e Métodos, exceto que as concentrações do complexo Mg.ATP^{2-} variaram como indicado na abscissa. As diferentes concentrações do complexo Mg.ATP^{2-} foram obtidas variando as concentrações de ATP total e mantendo fixa a concentração de MgCl_2 (1,1 mM). A curva de traço contínuo representa o ajuste aos pontos experimentais (▲) da função $V = V_{\max} \times [\text{Mg.ATP}^{2-}] / (K_{\text{m}(\text{Mg.ATP}^{2-})} + [\text{Mg.ATP}^{2-}])$. ○: concentrações de ATP livre co-existindo com as concentrações de Mg.ATP^{2-} indicadas na abscissa. **Inset:** gráfico duplo-recíproco dos dados apresentados no painel principal ($r^2 = 0,92$).

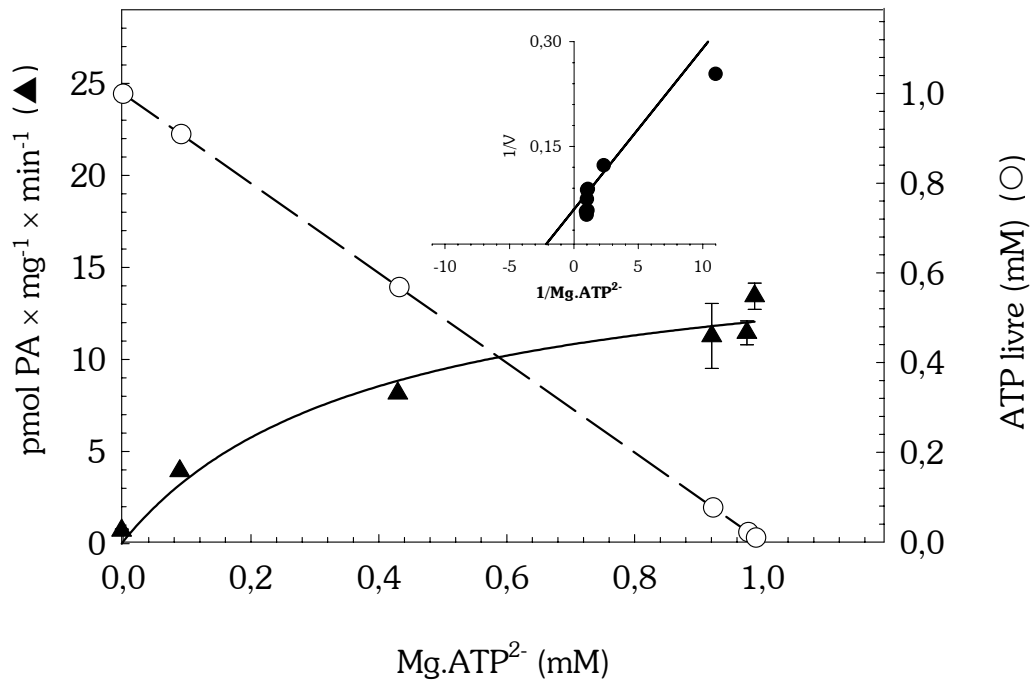


Figura 15: Dependência da atividade da DGK em função da concentração do complexo Mg.ATP^{2-} (ATP total fixo). A atividade da DGK (▲) foi medida como descrito em Materiais e Métodos, exceto que as concentrações do complexo Mg.ATP^{2-} variaram como indicado na abscissa. As diferentes concentrações do complexo Mg.ATP^{2-} foram obtidas variando as concentrações de MgCl_2 e mantendo fixa a concentração de ATP total (1 mM). A curva de traço contínuo representa o ajuste aos pontos experimentais (▲) da função $V = V_{\text{max}} \times [\text{Mg.ATP}^{2-}] / (K_{\text{m}(\text{Mg.ATP}^{2-})} + [\text{Mg.ATP}^{2-}])$. ○: concentrações de ATP livre co-existindo com as concentrações de Mg.ATP^{2-} indicadas na abscissa. **Inset:** gráfico duplo-recíproco dos dados apresentados no painel principal ($r^2 = 0,97$).

Tabela 1 – Valores de K_m (para ATP total e $Mg.ATP^{2-}$), $K_{0,5}$ (para $MgCl_2$) e V_{max} , calculados por meio dos ajustes mostrados nas Figura 12 a 15.

Curva^a	K_m ou $K_{0,5}$ (mM)	V_{max} (pmol PA $\times$ mg⁻¹ $\times$ min⁻¹)
ATP total	0,32	19,8
$MgCl_2$	0,26	12,9
$Mg.ATP^{2-b}$	0,44	24,5
$Mg.ATP^{2-c}$	0,39	16,8

^a Concentração de ATP e $MgCl_2$ descritas nas correspondentes legendas.

^b Concentração de ATP variável e $MgCl_2$ fixo (Figura 14).

^c Concentração de ATP fixa e $MgCl_2$ variável (Figura 15).

15), eles podem ser novamente ajustados com uma função Michaeliana, como na Figura 14. O mesmo valor de K_m (0,39 mM) é encontrado à medida que decresce linearmente a concentração de ATP livre ($\circ$). As observações das Figuras 14 e 15 indicam portanto, claramente que o verdadeiro substrato fosforilante da DGK é o ATP complexado ao Mg^{2+} ($Mg.ATP^{2-}$) e não o ATP livre. Todas as constantes cinéticas estão apresentadas na Tabela 1.

Para a obtenção de informações sobre a população de DAG – o segundo substrato – que seria fosforilada pela DGK de MBL de células proximais renais, utilizou-se o composto U73122, inibidor de PI-PLC (Figura 16). Concentrações que inibem a atividade de PI-PLC encontrada nestas membranas (Coka-Guevara *et al.*, 1999; Rangel *et al.*, 1999) reduzem em 60 % a formação de PA, evidência de que uma atividade de PI-PLC estaria acoplada à DGK fornecendo-lhe o substrato para a formação de PA. A adição de DAG ao meio de reação não alterou os níveis de PA marcado (dados não mostrados), embora este DAG exógeno seja capaz de interagir com outros sistemas enzimáticos de transporte presentes na membrana, como por exemplo a $(Ca^{2+}+Mg^{2+})ATPase$ (Figura 6).

Diversos processos dependentes de Ca^{2+} são modulados por PA (Gerrard *et al.*, 1978; Somermeyer *et al.*, 1983; Nishizuka, 1984; Moolenaar *et al.*, 1986; de Chaffoy de Courcelles *et al.*, 1989; Dempsey *et al.*, 2000) e diferentes isoformas de DGK são moduladas por Ca^{2+} de forma também diferente. Com o objetivo de identificar se a DGK da MBL era modulada por Ca^{2+} , concentrações crescentes de Ca^{2+} livre foram adicionadas ao meio (Figura 17). Aumentos da concentração de Ca^{2+} livre a partir daquelas encontradas no citoplasma e até 10 μM não provocaram variações na atividade da DGK de MBL, observando-se uma progressiva e acentuada inibição em concentrações mais altas.

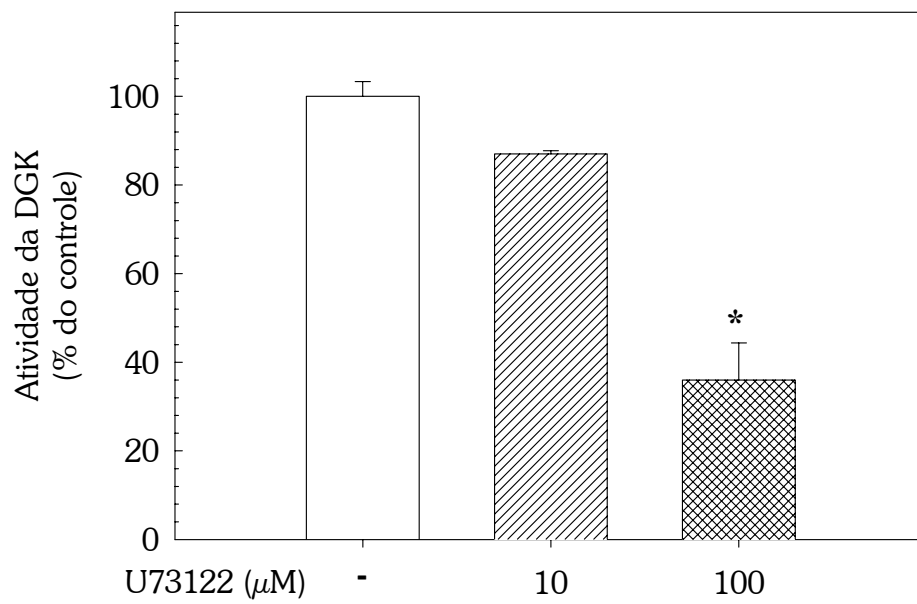


Figura 16: Atividade da DGK dependente de substrato gerado a partir da atividade basal da fosfolipase C. Membranas foram pré-incubadas por 10 min em concentrações crescentes do inibidor de fosfolipase C U73122. Outras condições do meio de reação foram mantidas constantes como descrito em Materiais e Métodos. Os valores de atividade apresentados correspondem à média de 4 experimentos $\pm$ erro padrão. * $p \leq 0,01$ em relação ao controle sem U73122.

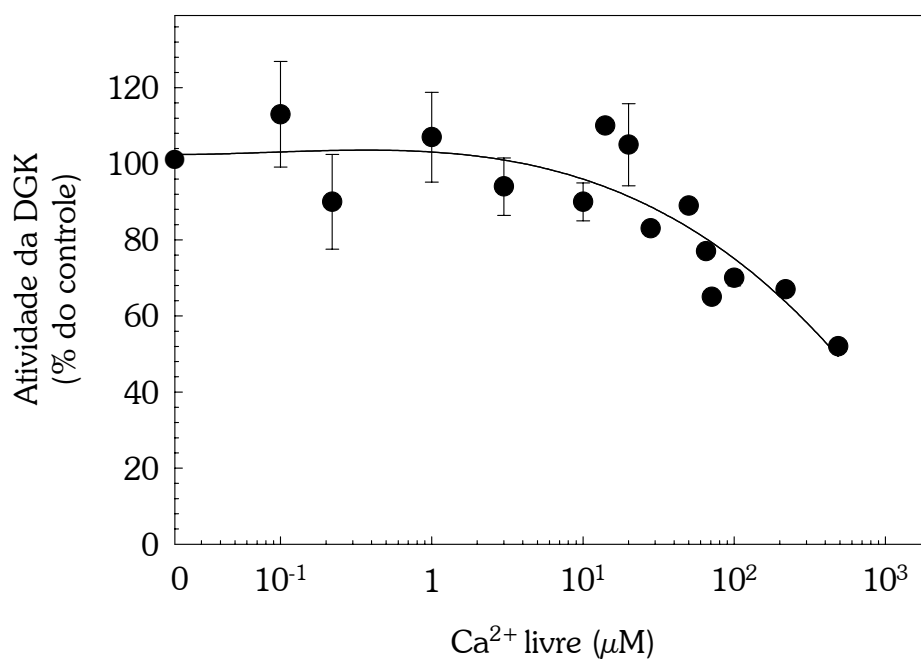


Figura 17: Efeito da concentração de Ca^{2+} livre na atividade da DGK de MBL.

A atividade da DGK foi medida como descrita em Materiais e Métodos exceto que as concentrações crescentes de Ca^{2+} livre, indicadas na abscissa, foram adicionadas ao meio de reação. O cálculo das concentrações de Ca^{2+} livre está indicado em Materiais e Métodos. A linha contínua foi desenhada “à mão”, apenas para facilitar a visualização da tendência do fenômeno. Os valores de atividade apresentados correspondem à média de pelo menos 2 experimentos $\pm$ erro padrão.

A utilização de inibidores comerciais derivados da quinazolinona, como o R59022 e o R59949, tem auxiliado o estudo do papel da DGK em muitos sistemas, sendo que estes inibidores se mostram relativamente específicos para as DGKs tipo I (dependentes de Ca^{2+}) (Jiang *et al.*, 2000). Para observar o efeito de um destes inibidores, o R59949 (o mais potente), na atividade da DGK da MBL, foram utilizadas duas concentrações de Mg.ATP^{2-} , considerado potencializador dos efeitos inibitórios destes compostos. Tanto na presença de 0,76 mM (Figura 18A) do complexo Mg.ATP^{2-} – concentração normalmente utilizada nos experimentos anteriores – quanto na presença de 4,9 mM do mesmo complexo (Figura 18B), o R59949 foi incapaz de inibir a atividade da DGK da MBL.

Resultados recentes do laboratório (Einicker-Lamas *et al.*, 2003) são indicativos da existência de interações modulatórias de atividade entre a PI4-K e a SPK de MBL. Os experimentos a seguir revelaram que esta interação, entre vias que envolvem glicero e esfingolípídeos, se estende também à via da DGK. A adição de 100 μM do isômero natural da esfingosina, a D(+)-eritro-esfingosina (Sph) provoca uma acentuada inibição da marcação em PA (Figura 19A), que alcança quase 70 % (Figura 19B). Esta inibição é acompanhada pelo aparecimento de S1P e pelo aumento da formação de $\text{PtdIns}(4)\text{P}$. Uma vez que a inibição da DGK poderia ser devido tanto à presença da Sph quanto à S1P formada e/ou ao aumento nos níveis de $\text{PtdIns}(4)\text{P}$ (Figura 19A), passou-se a investigar os efeitos destes dois últimos lipídeos na atividade da DGK. A adição de S1P exógena (comercial), na faixa de concentração que corresponde à produzida após a adição de 100 μM de Sph, não provocou alterações na atividade da DGK (Figura 20A). O mesmo resultado foi obtido quando se adicionou $\text{PtdIns}(4)\text{P}$ extraído da própria membrana após a exposição à mesma concentração de Sph (Figura 20B).

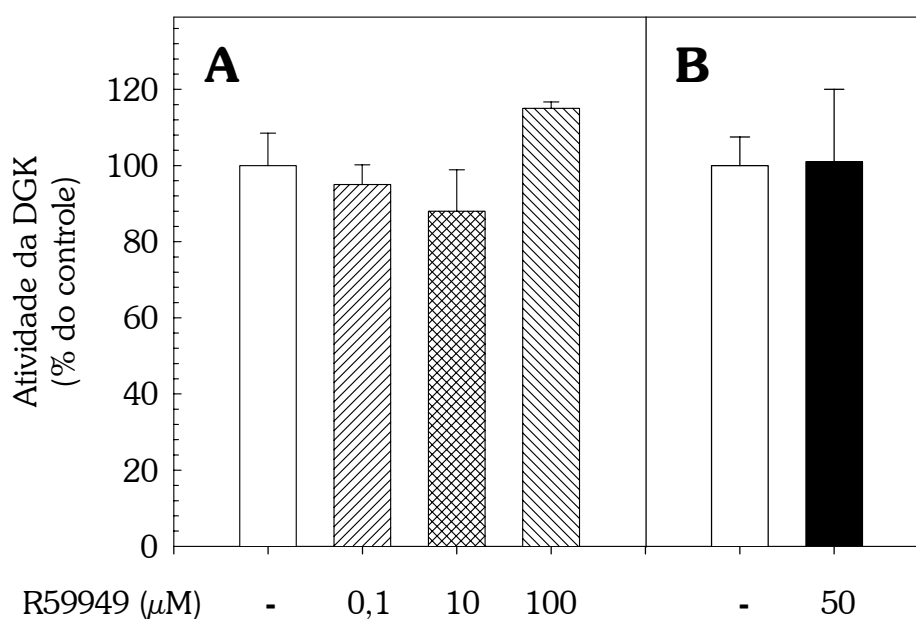


Figura 18: O inibidor R59949 não influencia a atividade da DGK de MBLs. As membranas ($0,2 \text{ mg} \times \text{mL}^{-1}$) foram pré-incubadas na presença de concentrações crescentes do inibidor indicadas na abscissa. **A:** complexo Mg.ATP^{2-} $0,76 \text{ mM}$; as concentrações de ATP e MgCl_2 adicionadas no meio foram 1 e $1,1 \text{ mM}$, respectivamente. **B:** complexo Mg.ATP^{2-} $4,90 \text{ mM}$; as concentrações de ATP e MgCl_2 utilizadas foram 5 e 10 mM , respectivamente. As outras condições do meio de reação foram as descritas em Materiais e Métodos. Os valores de atividade apresentados correspondem à média de pelo menos 2 experimentos $\pm$ erro padrão.

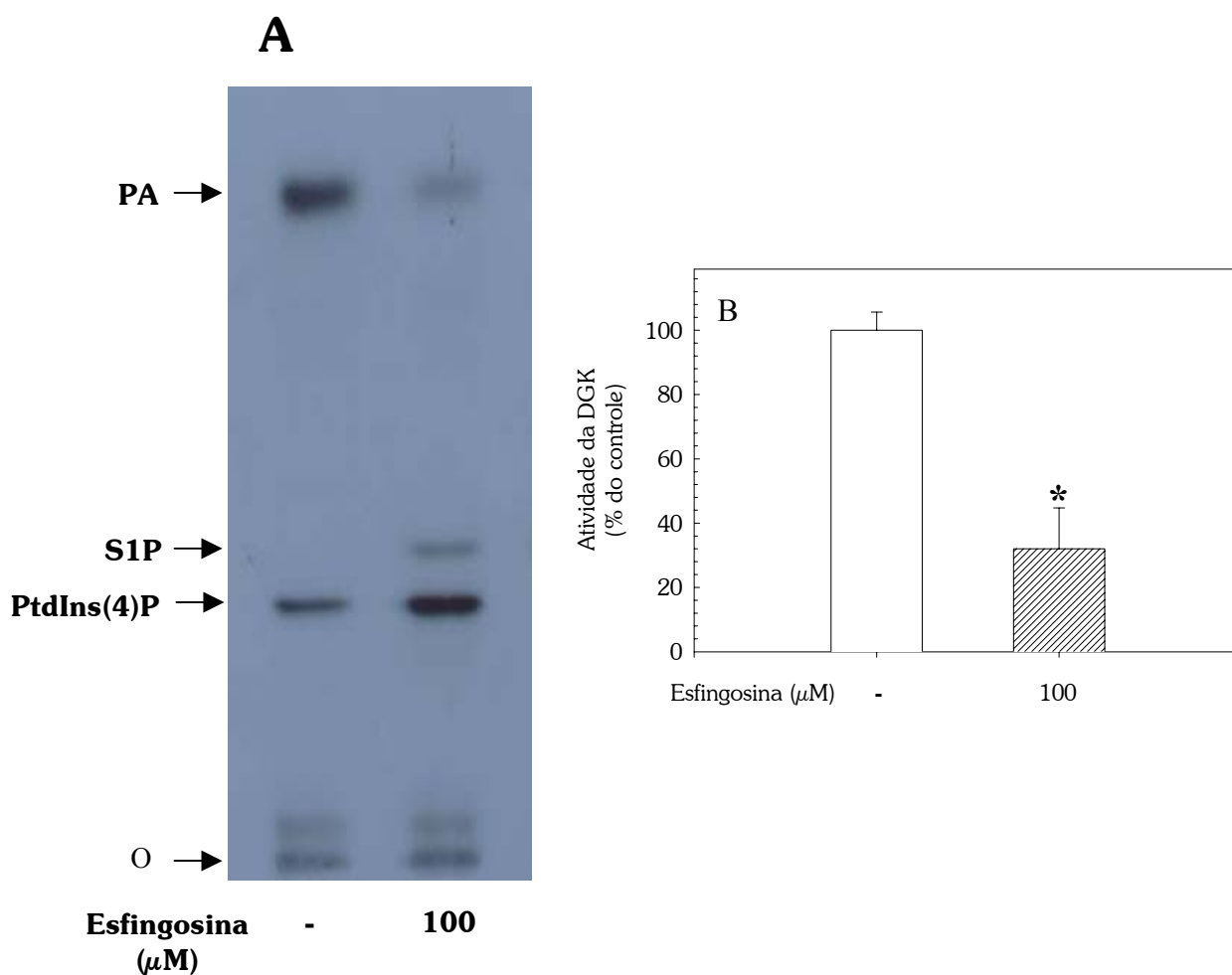


Figura 19: Efeito inibitório da esfingosina exógena na formação de PA pelas MBLs. As membranas ($0,2 \text{ mg} \times \text{mL}^{-1}$) foram pré-incubadas com Sph por 10 min e em seguida ensaiadas como descrito em Materiais e Métodos. **A:** autorradiograma representativo de uma cromatoplaça mostrando a formação de PA pela MBL em condições controle e na presença e $100 \text{ } \mu\text{M}$ de Sph (Einicker-Lamas *et al.*, 2003). **B:** quantificação da inibição provocada pela Sph na atividade da DGK. Os valores de atividade apresentados correspondem à média de 4 experimentos $\pm$ erro padrão. * $p \leq 0,01$ em relação ao controle sem Sph.

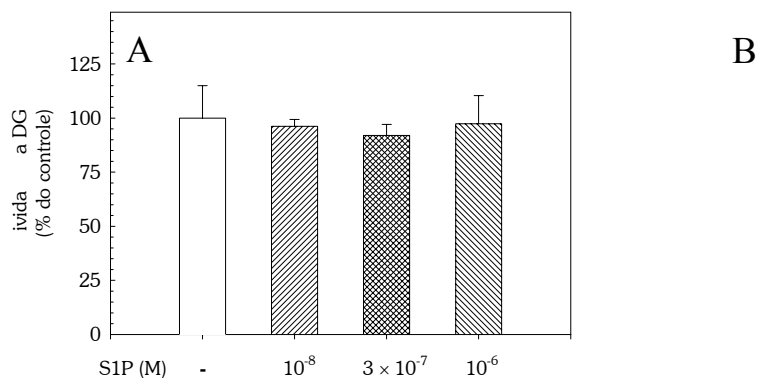


Figura 20: A esfingosina-1-fosfato e o PtdIns(4)P exógenos não influenciam na formação de PA pelas MBLs. Membranas ($0,2 \text{ mg} \times \text{mL}^{-1}$) foram pré-incubadas por 10 min na presença de **(A)** concentrações crescentes de S1P indicadas na abscissa ou na presença de **(B)** PtdIns(4)P na concentração formada pela MBL quando exposta a $100 \mu\text{M}$ de Sph. O procedimento de extração de PtdIns(4)P endógeno utilizado e outras condições do meio estão descritos em Materiais e Métodos. Os valores de atividade apresentados correspondem à média de pelo menos 2 experimentos $\pm$ erro padrão.

5 - Discussão

Os resultados apresentados nesta tese mostram a existência, numa preparação purificada de membrana basolateral de túbulos proximais, de uma atividade de DGK capaz de fosforilar DAG endógeno, cujos níveis alcançam $\approx 20 \text{ pmol PA} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$, em condições saturantes de ATP e Mg^{2+} (Figuras 14 e 15). Esta atividade encontra-se na faixa medida em frações microsomais não purificadas de rim de rato (Kato & Takenawa, 1990), que compreendem tanto membranas de origem intracelular quanto aquelas provenientes dos dois lados da célula (face luminal e face basolateral), de todos os segmentos do tecido renal (do córtex até a papila). As observações do presente trabalho indicam portanto, a localização de uma enzima potencialmente chave na regulação de eventos de transporte transepitelial (Férraille & Doucet, 2001) numa região do néfron onde ocorre a reabsorção de 70–80 % do ultrafiltrado e a secreção de grandes quantidades de H^+ e ânions orgânicos (de Mello Aires, 1999). Até onde chega o nosso conhecimento, este trabalho constitui o primeiro estudo de atividade da DGK num segmento do néfron delimitado, empregando como substrato o DAG localmente produzido no ambiente fisiológico da membrana.

O rim expressa altos níveis de $\text{PKC}\alpha$, sendo as isoformas β e γ indetectáveis. As isoformas de PKCs novas e atípicas também são expressas no córtex e na medula renal (Ostlund *et al.*, 1995; Karim *et al.*, 1995). Na MBL de túbulos proximais renais, a ativação de uma PKC residente, via receptor de angiotensina II, estimula a atividade da Na^+ -ATPase (Rangel *et al.*, 2001; Rangel *et al.*, 2002) e inibe a atividade da $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})$ -ATPase (Miranda *et al.*, 2003). Este mesmo agonista pode estimular a atividade da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase, via PKC, em células do túbulo proximal (Férraille & Doucet, 2001). Também já foi demonstrado o papel inibitório da PKC, dependente de

DAG, no transporte ativo de Ca^{2+} em MBLs renais, via ativação do receptor de adenosina (Coka-Guevara *et al.*, 1999). Dessa forma, o papel regulatório da PKC, no transporte ativo através do epitélio tubular renal, aponta para a participação da DGK nas redes regulatórias que modulam os processos mutuamente dependentes do transporte transepitelial de Ca^{2+} e Na^+ . Mais ainda, levando-se em consideração que a $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})\text{ATPase}$ de membrana plasmática é considerada a responsável pelo ajuste fino da atividade do Ca^{2+} citossólico (Coelho-Sampaio *et al.*, 1991), a DGK dessa membrana poderia, associada em complexos enzimáticos com a PI-PLC (van Blitterswijk & Houssa, 2000), participar de outros processos regulados por Ca^{2+} e DAG que vão desde a proliferação até a morte celular (Wright & McMaster, 2002). Evidentemente, estes processos poderiam não apenas ser regulados por flutuações de Ca^{2+} (provocadas por variações da atividade local de PKCs nos transportadores deste íon sinalizador), mas também por efeitos diretos ou indiretos influenciados pelo PA ou pelo seu derivado monoacilado, o ácido liso-fosfatídico (LPA) (Fukushima *et al.*, 2002). Recentemente foi mostrado que a atividade de uma família de PKCs, independentes de Ca^{2+} e DAG, é fortemente dependente de PA (Limatola *et al.*, 1994), sugerindo a existência de uma nova e potencial via de regulação celular.

Em células renais, a incubação de membranas luminais com ATP e MgCl_2 , leva a aumentos transitórios nos níveis de PA endógeno e dos fluxos passivos de Ca^{2+} através destas membranas (Somermeier *et al.*, 1983). Observações recentes de nosso laboratório mostram que o LPA triplica a atividade da $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})\text{ATPase}$, enquanto que o DAG a inibe (Figura 6), mais uma indicação do papel chave que a DGK (ou as DGKs) poderia(m) desempenhar na regulação de fluxos transepiteliais de íons e água através da modulação dos níveis recíprocos de DAG e PA/LPA.

É interessante destacar que, apesar da existência de uma extensa variedade de fosfolipídeos na membrana, apenas o PA e o PtdIns(4)P aparecem marcados quando as membranas de origem basolateral são incubadas com $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ e MgCl_2 (Figura 7). Muito embora permaneça na origem dos cromatogramas uma parcela não resolvida de radioatividade, é evidente que lipídeos essencialmente estruturais e sintetizados no retículo endoplasmático como a fosfatidilcolina e a fosfatidilserina não intercambiam seu grupamento fosforila quando organizados na estrutura da membrana. Como indicam os dados apresentados nesta tese e em outros estudos (Guilherme *et al.*, 1998; Einicker-Lamas *et al.*, 2003) apenas os glicerolipídeos de papel sinalizador parecem contar, na membrana basolateral de células renais, com a maquinaria enzimática completa para fosforilá-los e defosforilá-los. A membrana basolateral conta também com outras redes de sinalização completas envolvendo receptores, proteínas sinalizadoras (como as proteínas G), proteínas cinases e proteínas fosfatases, estrategicamente co-localizadas com seus alvos regulatórios (Rangel *et al.*, 2001), e estas redes poderiam estar funcionalmente relacionadas com aquelas que envolvem lipídeos sinalizadores. Tem sido postulado que lipídeo cinases (e as correspondentes fosfatases), proteína cinases (e suas fosfatases) formariam complexos funcionais com receptores de autacóides e ATPases nas pequenas invaginações da membrana basolateral chamadas cavéolas (Fujimoto, 1993; Coka-Guevara *et al.*, 1999; Tortelote *et al.*, 2002). Esta organização de componentes presentes em quantidades diminutas na membrana, não apenas favoreceria a eficiência na transmissão de sinais pela restrição topológica, como poderia ter um grande potencial regulatório. Há evidências de que a associação de PI-PLCs e DGKs em microdomínios de membrana teria implicações na modulação de processos celulares (Topham & Prescott, 2001) que por meio da ativação de PLDs, contribuíram também para aumentar

adicionalmente a concentração local e transitória de PA em resposta a diversos estímulos.

A DGK de MBL apresenta também uma resposta a variações de pH que contrasta com o observado para as DGKs de classes I e IV, encontradas no citossol e numa fração crua de membranas obtidas de homogenato total de cérebro de rato (Kato & Takenawa, 1990). Estas atividades são ensaiadas em vesículas unilamelares reconstituídas com excesso de dioleoil-glicerol (3,2 mM) e mostram um arredondado pico entre pH 7,0 e pH 8,0, com um máximo a pH 7,4. Também numa preparação micelar, a DGK de testículo bovino apresenta uma faixa de pH ótimo ainda mais ampla, entre 6,5 e 8,0 (Walsh *et al.*, 1994). A forte ativação da DGK de MBL nativa no estreito valor de pH 7,0 (Figura 9) é um forte indicativo: (a) da participação, na catálise, de grupamentos que dissociam a este pH; (b) de que a etapa do ciclo de catálise em que participam estes grupamentos seria altamente limitante da velocidade de reação envolvendo as quantidades diminutas de DAG endógeno; (c) de que pequenas variações de pH intracelular, num epitélio que acidifica, teriam um papel fundamental da regulação da DGK associada à membrana.

Fortes candidatos, entre as cadeias laterais de aminoácidos da DGK que participam criticamente na catálise, são os grupamentos imidazol de resíduos de histidinas que dissociam a pH em torno de 7,0³ (Westley, 1969⁴; Somero, 1986). Resíduos de histidina não são encontrados na pequena seqüência, altamente conservada, do sítio de ligação de ATP em DGKs e proteínas cinases (Hanks *et al.*, 1988). Uma vez que o clássico domínio contendo uma lisina, e responsável pela ancoragem de ATP no sítio catalítico de enzimas que catalisam a transferência de grupamentos fosforila (Inesi *et al.*, 1990), não se encontra em DGKs (van Blitterswijk &

³ O pK do anel imidazólico da histidina é 6,5 em solução aquosa e ligeiramente superior em microambientes hidrofóbicos (Stryer, 1996)

⁴ Ver figura 22.

Houssa, 1999), outros resíduos devem portanto participar na ligação do ATP à enzima. Um domínio também altamente conservado em todas as DGKs – independentemente do tamanho molecular – encontra-se na seqüência primária imediatamente vizinha ao sítio catalítico (Sakane *et al.*, 1990; Houssa *et al.*, 1997). Este domínio é caracterizado pela presença de resíduos de histidina que participariam na coordenação dos átomos de Mg^{2+} requeridos na formação de PA – mecanismo proposto para outras enzimas que têm resíduos de histidina claramente envolvidos na catálise, como por exemplo a oxalato descarboxilase e a aspartil aminopeptidase (Chakraborty *et al.*, 2002; Wilk *et al.*, 2002). O estabelecimento desta coordenação permitiria a formação do verdadeiro substrato doador de fosforila para a DGK, o complexo $Mg.ATP^{2-}$ (Figuras 11-14). A estratégica presença de resíduos de cisteína vizinhos ao de ligação do ATP, asseguraria por sua vez a ligação próxima – e portanto cineticamente favorável – do DAG. Os domínios ricos em cisteína (CDRs) têm sido implicados na ligação de DAG a DGKs (van Blitterswijk & Houssa, 1999), assim como no reconhecimento e ligação ao DNA e na interação proteína-proteína (Mackay & Crossley, 1998).

Outro papel dos resíduos de histidina (que não exclui o proposto acima) poderia ser – do ponto de vista mecanístico – semelhante ao proposto por Heath & Rock (1998) para a aciltransferase de glicerolípídeos a partir de estudos de mutação sítio-dirigida de resíduos de histidina do centro ativo. Estes autores propuseram que o anel imidazólico da histidina participaria como receptor de H, favorecendo seu deslocamento da função – OH a ser acilada. No caso da reação catalisada pela DGK, resíduos de histidina poderiam também favorecer a desprotonação do 3-OH e sua fosforilação, num processo sincronizado com a de saída do Mg^{2+} coordenado em outras histidinas para formar o complexo $Mg.ATP^{2-}$.

A estreita faixa de pH ótimo (7,0; Figura 9) para a formação de PA por MBLs nativas a partir de DAG endógeno, pH que corresponde ao encontrado no citoplasma das células tubulares proximais (Malnic *et al.*, 2002), é também compatível com a visão de que pequenas (nanomolares) variações intracelulares na atividade de íons H^+ poderiam modular localmente a relação DAG/PA. Na membrana, estas flutuações poderiam por sua vez contribuir para a regulação dos fluxos de H^+ e HCO_3^- (além de Cl^- e OH^-), em resposta a variações de pH nos compartimentos líquidos do organismo. Em células epiteliais de diferentes linhagens, DAG e PA regulam a atividade de diversos transportadores envolvidos em fluxo de ácido, como por exemplo o trocador Na^+ / H^+ (Gagnon *et al.*, 1999).

O estudo do comportamento térmico da atividade DGK em MBLs nativas no intervalo de 17 a 37 °C (Figura 11) revelou uma dependência não linear da velocidade da reação em função da temperatura. Duas particularidades deste comportamento merecem destaque. A primeira é a temperatura, relativamente baixa, em que ocorre a quebra no gráfico de Arrhenius (22 °C; Figura 11) quando os valores experimentais são ajustados por duas linhas retas. A segunda é a E_a , consideravelmente menor, nas temperaturas mais altas (10,9 kcal/mol) do que nas mais baixas (28,5 kcal/mol). Embora existam diversas causas para uma dependência não linear da temperatura e muitas delas sejam de difícil verificação, algumas poderiam aplicar-se à catálise da fosforilação de DAG por DGK em membranas nativas.

A primeira hipótese residiria na mudança do passo limitante na seqüência de catálise, assumindo (como se depreende da observação da Figura 17) que o DAG disponível para a DGK seria aquele resultante da atividade de uma PI-PLC acoplada (Thopham & Prescott, 2001). A temperaturas mais baixas (17–22 °C) para as quais foi encontrada uma E_a três vezes mais alta (28,5 kcal/mol), o passo limitante seria a ligação

do DAG à DGK após a sua liberação pela PI-PLC na imediata vizinhança da membrana. A temperaturas mais altas (22–37 °C), quando variações no microambiente lipídico da membrana da DGK não teriam mais influência, a transferência do grupamento fosforila do ATP para o DAG⁵ constituiria o passo limitante da reação. Isto significa que, em condições fisiológicas de temperatura, o estado metabólico da célula – e não as propriedades físicas da MBL – controlaria a velocidade de formação de PA. Uma explicação alternativa seria a de existência de duas diferentes conformações de DGK – prevalentes a diferentes faixas de temperatura – ambas capazes de ligar DAG e ATP, porém tendo diferentes propriedades de ligação e catálise (Dixon & Webb, 1964). Finalmente, já que a dependência da temperatura pode ser também adequadamente descrita por uma suave função curvilínea (linha tracejada na Figura 11), a DGK da MBL poderia ser uma única espécie macroscópica cujas propriedades estruturais – e em consequência disso também as catalíticas – mudariam continuamente com a temperatura. Esta possibilidade poderia se aplicar a DGK da MBL na qual fortes interações hidrofóbicas resultantes de sua associação à membrana, e/ou da ligação de DAG no centro ativo, seriam responsáveis pela alta capacidade calorífica da reação enzimática e, conseqüentemente, pelo comportamento curvilíneo alternativo da função $1/V$ vs $1/T$ (Sturtevant, 1977).

Como discutido acima, o estudo da dependência do pH (Figura 9) sugeriu fortemente o envolvimento de resíduos que dissociam em torno de pH 7,0 na catálise de formação de PA em MBL a partir de DAG endógeno e possíveis papéis nos mecanismos e etapas da reação. Como mencionado, resíduos de histidina que participam na ligação de cátions em diferentes reações enzimáticas foram encontrados – de forma altamente conservada – em domínios vizinhos ao centro ativo (de ligação de ATP) em todas as

⁵ Sem formar um complexo terciário; vide Figura 21 e discussão correspondente no texto.

isoformas encontradas e clonadas de DGK (Houssa *et al.*, 1997; van Blitterswijk & Houssa, 2000) e por causa dessa proximidade eles poderiam estar envolvidos na preservação de interações eletrostáticas entre a molécula de ATP^{4-} e o cátion Mg^{2+} em um complexo $\text{Mg}.\text{ATP}^{2-}$ cineticamente competente. Embora alguns estudos (Prevati *et al.*, 1994; Walsh *et al.*, 1995; Jiang *et al.*, 2000) tenham assumido que o complexo $\text{Mg}.\text{ATP}^{2-}$ é o substrato fosforilante de DAG, esses estudos careceram do emprego de apropriadas combinações nas concentrações de ATP e MgCl_2 capazes de mostrar – ou não – uma clara dependência da concentração de $\text{Mg}.\text{ATP}^{2-}$ como verdadeiro substrato.

As Figuras 14 e 15, correspondentes a experimentos realizados em duas diferentes combinações de substrato (ATP) e cofator (Mg^{2+}), mostram claramente que o verdadeiro substrato da DGK de MBL é o complexo $\text{Mg}.\text{ATP}^{2-}$. Esta conclusão se apóia em duas observações complementares e resultantes das duas diferentes combinações escolhidas. Na Figura 14, a velocidade da reação aumentou ao longo de uma hipérbole equilátera à medida que aumenta a concentração de $\text{Mg}.\text{ATP}^{2-}$ em coexistência com concentrações várias ordens de magnitude menor de ATP livre. A faixa de rápido aumento das concentrações de nucleotídeo livre coincidiram com o início da saturação da curva o que permite descartar o ATP livre como espécie reativa. A Figura 15, mostrando mais uma vez um comportamento Michaeliano em função da concentração de $\text{Mg}.\text{ATP}^{2-}$ – agora com decréscimo concomitante e linear de ATP livre – e obtendo o mesmo valor de K_m aparente para o complexo (0,32 e 0,39 mM, respectivamente), permite reforçar a conclusão de que o centro ativo da DGK liga $\text{Mg}.\text{ATP}^{2-}$ para fosforilar o DAG. Desta forma, diminuiria a força de repulsão entre as cargas negativas dos dois substratos, ATP^{4-} e DAG, favorecendo a fosforilação do segundo para formar PA. A aproximação dos dois substratos acentuaria a assimetria da ligação do Mg^{2+} ao ATP, desestabilizando a ligação fosfoanidrido terminal do nucleotídeo e favorecendo assim o

passo de transferência da fosforila γ para o substrato lipídico (Senter *et al.*, 1983; Yoshikawa *et al.*, 1987).

As reações envolvendo dois substratos (como é o caso da formação de PA a partir de DAG e ATP) têm um formalismo muito complexo (Cleland, 1967) e esta complexidade se acentua se houver ainda a participação de um cofator obrigatório (Mg^{2+}). Todavia, apesar de sua complexidade estas reações podem dar correlações lineares em gráficos duplo-recíprocos se não houver formação do complexo terciário, ou seja se o complexo binário da enzima com o primeiro substrato reagir com o outro substrato para formar o produto e simultaneamente a enzima livre (Dixon & Webb, 1964). As Figuras 12 e 14 mostraram um comportamento tipicamente Michaeliano – incluindo os respectivos duplo-recíprocos; *inset* – reforçando a visão construída a partir das figuras anteriores e que poderia ser resumida no esquema da Figura 21. No modelo proposto, a DGK com DAG previamente ligado reagiria com o complexo $Mg.ATP^{2-}$ formando PA e regenerando a enzima livre capaz de ligar novamente DAG e reiniciar um novo ciclo. Esta seqüência ordenada proposta corresponde a uma propriedade cinética geral que se aplica também às proteínas cinases: a de ligação seqüencial do substrato a ser fosforilado seguida da ligação do ATP (Kennelly & Krebs, 1991). O passo limitante, como proposto acima para a DGK ao analisar a dependência da temperatura em faixas próximas das fisiológicas, seria também o de transfosforilação do nucleotídeo.

A associação física entre as enzimas PI-PLC e DGK poderia também segregar o *pool* de DAG acessível ao sítio catalítico da segunda, canalizando especificamente para ela moléculas de DAG produzidas em resposta a estímulos, como no caso da ativação de fibroblastos por bradicinina (van der Bend *et al.*, 1994). A utilização exclusiva de DAG canalizado a partir de uma PI-PLC parece ser o caso da DGK residente na MBL. Como mostrado na Figura 16, a inibição da PI-PLC por U73122 leva a uma diminuição

drástica na formação de PA indicando que a atividade da DGK de MBL encontra-se controlada – em termos de substrato fosforilável – pela atividade de uma PI-PLC associada a ela na membrana. O DAG de MBL tampouco é fosforilado na presença de Triton X-100, quando ocorre ruptura das interações lipídeo/proteína, embora nestas condições a formação de PtdIns(4)P seja preservada e até se acentue (Guilherme *et al.*, 1998).

A idéia da inacessibilidade de DAG proveniente de outros *pools* ao centro ativo da DGK, como por exemplo àquele constituinte estrutural da membrana, é reforçado pelos experimentos de DAG exógeno que não aumenta a atividade da DGK, embora seja capaz de modular a atividade da $(Ca^{2+}+Mg^{2+})ATPase$ de MBLs. Este efeito na ATPase seria exercido provavelmente por meio de interações com domínios citossólicos facilmente acessíveis das PKCs, também residentes nesta membrana (Rangel *et al.*, 2002), em contraste com o sítio de acesso restrito da DGK. Poderia ser argumentado que a falta de efeito do DAG exógeno se deveria à especificidade dos grupamentos acila para a catálise pela DGK. Todavia, as DGKs de mamíferos fosforilam *in vitro* diferentes espécies de DAG (*sn*-1,2-diacilglicerol) independentes da composição de seus ácidos graxos, sendo apenas requerida a estereoespecificidade da esterificação nas posições 1 e 2 da molécula de glicerol (Hodgkin *et al.*, 1998). A única exceção é a DGK ϵ , que mostra especificidade pelos *sn*-2-araquidonoil DAGs (Bunting *et al.*, 1996; Tang *et al.*, 1996; Pettitt & Wakelan, 1999). No entanto, esta isoforma é sensível ao inibidor R59949, em contraste com o observado para a DGK de túbulos proximais na presença de baixas ou altas concentrações do seu coadjuvante, o substrato $Mg.ATP^{2-}$ (Jiang *et al.*, 2000) (Figura 17). Além disso, a análise por *Northern blotting* parece excluir o tecido renal dos locais de expressão da DGK ϵ (Tang *et al.*, 1996).

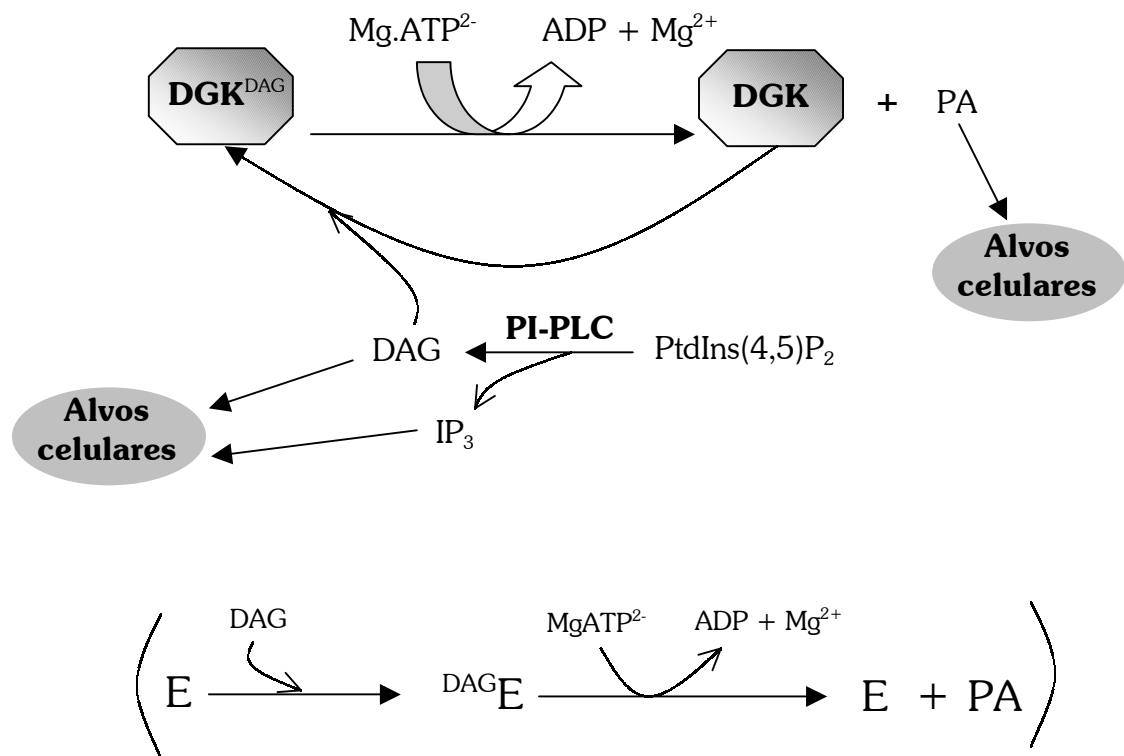


Figura 21: Modelo para a catálise de formação de PA pela DGK de MBLs, acoplada à PI-PLC fornecedora do primeiro substrato (DAG). Após o ataque nucleofílico da fosforila γ -terminal do $Mg.ATP^{2-}$ ao complexo binário DGK^{DAG} e transferência da fosforila do ATP para o DGK, o ADP seria liberado (e em seguida fosforilado nas mitocôndrias vizinhas a MBL) e o Mg^{2+} permaneceria transitoriamente coordenado no domínio vizinho ao centro ativo até a formação de um novo complexo $Mg.ATP^{2-}$. Entre parênteses: representação simplificada do modelo.

A caracterização da DGK de MBL discutida até agora abordou aspectos relacionados com uma atividade “basal”, isto é, não associada a fluxos regulatórios ao longo das redes à qual a enzima se encontra provavelmente vinculada. Como passo preliminar para a investigação da influência de hormônios e autacóides de efeito regulatório em eventos do túbulo proximal, estudou-se finalmente a influência na atividade da DGK de quatro sinalizadores: Ca^{2+} , Sph, S1P e PtdIns(4)P.

A DGK de MBL mostrou-se insensível a variações nos níveis de Ca^{2+} na faixa fisiológica (Figura 17). Três hipóteses poderiam ser apresentadas para explicar este comportamento. A primeira seria a de incluir a DGK de MBL na classe de isoformas independentes de Ca^{2+} , como as descritas em cérebro de rato (Kato & Takenawa, 1990). A segunda possibilidade seria a de que o íon Ca^{2+} ativaria a translocação de DGK para a membrana como mostrado para a enzima de timo (Sakane *et al.*, 1991). Com a enzima (de MBL) já residindo na membrana este efeito não seria observado na faixa de flutuações fisiológicas do íon. A terceira possibilidade seria que a sensibilidade ao Ca^{2+} se revelaria somente com a enzima ativada por hormônios e autacóides, que modulam as redes regulatórias residentes na MBL (Caruso-Neves *et al.*, 1997; Coka-Guevara *et al.*, 1999; Rangel *et al.*, 1999). Esta hipótese é reforçada pelos estudos de Jiang *et al.*, (2000) que atribuíram ao domínio RVH (domínio conservado existente nas DGKs classe I que é homólogo a proteínas da famílias de recoverinas) a função de domínio autoinibitório – que atuaria junto com o domínio EF-hands (que liga Ca^{2+}). O domínio RVH, incapaz de ligar Ca^{2+} , participaria combinado com o domínio EF-hands na ativação e nas mudanças conformacionais na enzima induzidas por Ca^{2+} . Esta última possibilidade poderia também explicar a falta de resposta ao inibidor R59949 (Figura 18), resposta que também parece ocorrer num estado ativado da DGK após ligação do íon Ca^{2+} (Jiang *et al.*, 2000). Há evidências de que, em micelas, os

efeitos regulatórios de Ca^{2+} e do ativador PS são mutuamente dependentes (Sakane *et al.*, 1991). Resposta ao Ca^{2+} como a da DGK de timo foi observada na presença de anfifílicos como o deoxicolato ou a Sph, capazes de expor adequadamente o domínio E-F-hands da DGK (Sakane *et al.*, 1990). A inibição detectada com concentrações altas de Ca^{2+} (Figura 16) poderia talvez corresponder a um estado patológico no qual a concomitante elevação dos níveis de Ca^{2+} (por hipoxia tisular, por exemplo; Sanidas *et al.*, 1989) e DAG (por inibição DGK) levaria à lesão e à morte celular. A ativação de uma PKC dependente de DAG, poderia inclusive potencializar o dano mitocondrial postulado (Dempsey *et al.*, 2000).

Assim como o observado com as DGKs de origem tímica (a de 80 e 150 kDa; Sakane *et al.*, 1989) e a DGK presente em frações microssomais de homogenato de fígado de rato (Previali *et al.*, 1994) a Sph também se mostrou um potente inibidor da DGK de MBL. O efeito inibitório da Sph na DGK de MBL poderia ser indireto e devido à formação de S1P ou aos níveis aumentados de $\text{PtdIns}(4)\text{P}$ (Figura 19). Todavia, a Figura 19 mostra que nem S1P nem $\text{PtdIns}(4)\text{P}$ adicionados são capazes de influenciar na atividade da DGK, tornando plausível a hipótese de que o efeito observado na figura 19 resulte de uma influência da própria Sph, diretamente na DGK ou através de uma via mais complexa que envolva receptores de Sph na MBL (Hla & Maciag, 1990).

Merece ser finalmente mencionado que, em diferentes células, as respostas da DGK a fosfoinosítídeos em geral, revelou-se variável, com ativação em alguns casos e inibição em outros (Walsh *et al.*, 1995; van Blitterswijk & Houssa, 2000). Evidentemente um efeito inibitório do $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ sobre a DGK (Walsh *et al.*, 1995) poderia constituir um mecanismo de feedback negativo de grande significado fisiológico capaz de contribuir também para a modulação recíproca dos níveis de PA, DAG e fosfoinosítídeos na membrana. Embora a variabilidade nas respostas a Sph e fosfoinosítídeos possa ser

atribuída mais uma vez a características de isoformas diferentes (Previati *et al.*, 1994), ela também poderia refletir estados de regulação/desregulação diversos ou simplesmente ser devida às condições não-fisiológicas de ensaio na presença de micelas com variadas espécies de anfifílicos.

Finalmente, a análise em conjunto dos resultados que mostram ausência de efeito do Ca^{2+} e do inibidor R59949 e acentuada inibição pela Sph, poderia permitir a identificação da DGK detectada no presente trabalho com uma isoforma molecularmente caracterizadas. A combinação destas respostas, encontradas nesta tese, permitiu caracterizar a isoforma η da classe II. Esta conclusão é reforçada pela observação de que análises de *Northern blotting* permitiram detectar a DGK η em homogenato total de rim de hamster (Klauck *et al.*, 1996).

6 – CONCLUSÕES E FUTURAS DIREÇÕES

1. Neste estudo demonstrou-se pela primeira vez a atividade de DGK em um compartimento definido (MBL) do tecido renal. Esta enzima foi capaz de catalizar a fosforilação do DAG endógeno formado pela atividade basal de PI-PLC presente nesta membrana.
2. O perfil da dependência do pH mostra o envolvimento, na catálise, de grupamentos que dissociam em torno de pH 7,0 e permite atribuir a resíduos de histidina próximos do centro ativo um papel na coordenação dos íons Mg^{2+} requeridos para a fosforilação do DAG.
3. O substrato fosforilante do DAG é o complexo $Mg.ATP^{2-}$ o que diminuiria as repulsões eletrostáticas entre os grupamentos negativamente carregados dos dois substratos (carboxilas do DAG e fosforilas do ATP).
4. A dependência estritamente Michaeliana da atividade da enzima em relação à concentração de $Mg.ATP^{2-}$ (um dos substratos), na presença de uma concentração fixa do outro (DAG), permite postular um mecanismo de catálise no qual o nucleotídeo reage com o complexo binário DGK^{DAG} gerando PA por transferência da fosforila γ -terminal sem formar um complexo terciário $^{DAG}DGK^{ATP}$.
5. A complexa dependência da temperatura revela a importância do entorno lipídico na catálise e abre a possibilidade de etapas – ou ainda de conformações da enzima – com diferentes energias de ativação.
6. A combinação das respostas a Ca^{2+} , R59949 e Sph, assim como sua origem tisular, permite postular que a DGK de MBL pertence à classe das $DGK\eta$.

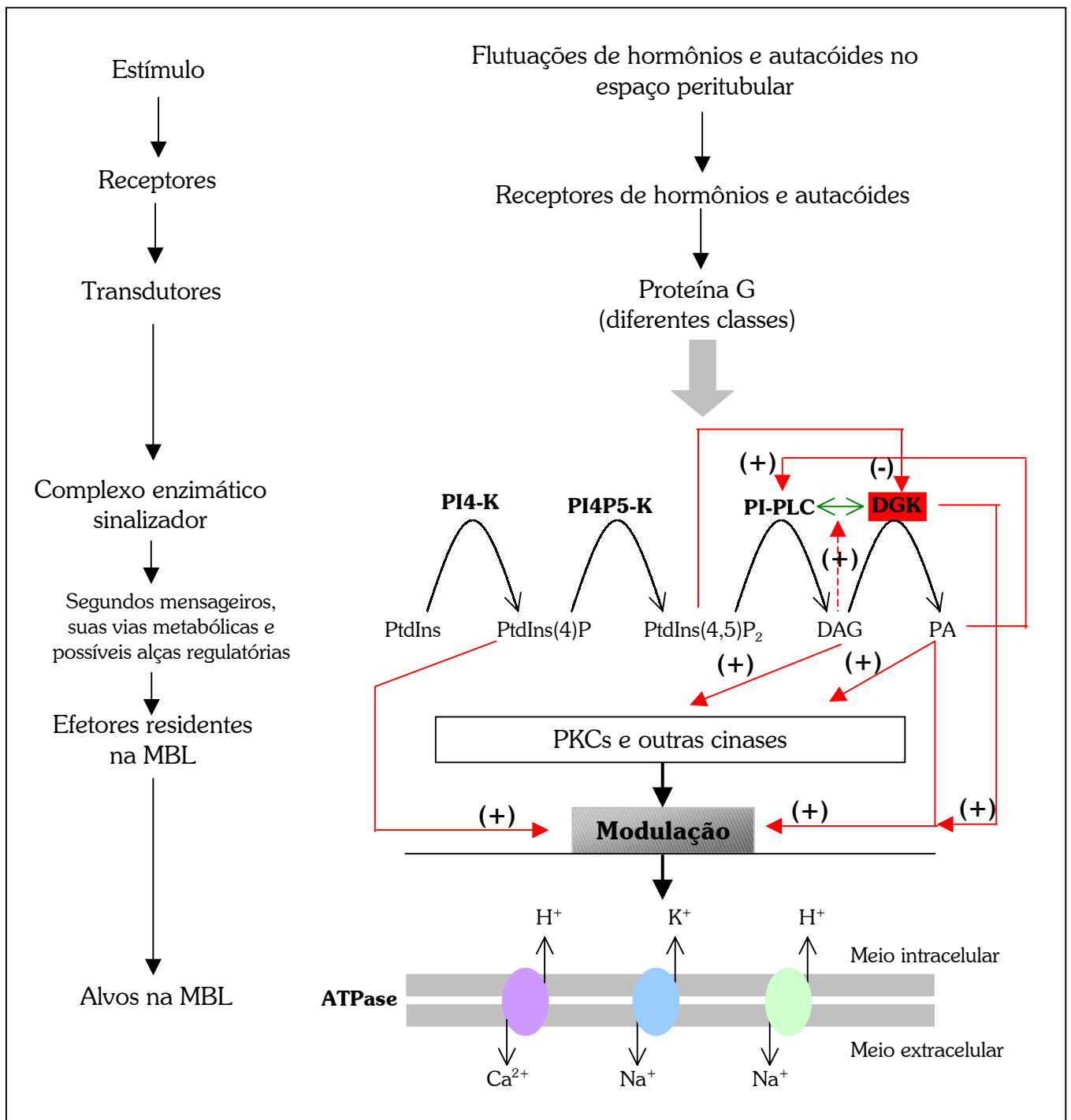


Figura 22: Cascatas e redes de transdução de sinal na MBL de túbulos proximais renais e suas possíveis inter-relações na modulação do transporte ativo. A regulação proposta das enzimas – indicada pelas setas em vermelho – apóia-se em dados desta tese e em outros descritos na literatura em vários modelos (ver texto).

- 7.** A DGK de membrana basolateral participaria de uma rede regulatória envolvendo glicerofosfolídeos sinalizadores, influenciada por esfingolipídeos como a esfingosina.
- 8.** Variações na atividade da DGK modulariam os níveis recíprocos de DAG e PA na MBL (e provavelmente LPA), contribuindo para a regulação de processos de transporte que ocorrem nestas membranas e, conseqüentemente, para a homeostasia dos compartimentos líquidos (Figura 22).

6 - BIBLIOGRAFIA

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2002) *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition, *Garland Science*, New York, USA.
- 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**: 436-9.
- Assunção-Miranda, I., Costa-Sarmiento, G., Cerqueira, D.M., Miranda, T.A., Silva, C.V.C. & Vieyra, A. (2003) Regulação da (Ca²⁺+Mg²⁺)ATPase de túbulos proximais renais por peptídeos derivados da metabolização de AII? Poster apresentado na XVIII Reunião anual da FeSBE, Curitiba, PR, Brasil.
- Berridge, M. J. (1993) Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* **361**: 315-325.
- Berridge, M.J. & Irvine, R.F. (1984) Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* **312**: 315-321.
- 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.
- Bunting, M., Tang, W., Zimmerman, G.A., McIntyre, T.M. & Prescott, S.M. (1996) Molecular cloning and characterization of a novel human diacylglycerol kinase ζ . *J. Biol. Chem.* **271**: 10230-10236.
- Caruso-Neves, C., Francisco-Pedro, L.G., Souza, 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**: 336-334.

- Caruso-Neves, C., Rangel, L.B.A., Vives, D., Vieyra, A., Coka-Guevara, S. & Lopes, A.G. (2000) 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.
- Chakraborty, S., Chakraborty, N., Deepti, J., Salunke, D.M. & Datta, A. (2002) Active site geometry of oxalate decarboxylase from *Flammulina velutipes*: role of histidine-coordinated manganese in substrate recognition. *Protein Science* **11**: 2138-2147.
- Cleland, W.W. (1967) The statistical analysis of enzyme kinetic data. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **29**: 1-32.
- 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.
- Coka-Guevara, S., Markus, R.P., 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.
- D'Santos, C.S., Clarke, J.H. & Divecha, N. (1998) Phospholipid signalling in the nucleus. *Biochim. Biophys. Acta* **1436**: 201-232.
- de Chaffoy de Courcelles, D., Roevens, P., Belle, H.V., Kennis, L., Somers, Y. & Clerck, F.D. (1989) The role of endogenously formed diacylglycerol in the propagation and termination of platelet activation – A biochemical and functional analysis using the novel diacylglycerol kinase inhibitor, R59949. *J. Biol. Chem.* **264**: 3274-3285.
- de Mello-Aires, M. & Malnic, G. (2002) Distal tubule bicarbonate transport. *J. Nephrol.* **5**: S97-S111.
- de Mello-Aires, M. (1999) Fisiologia. 2ª edição, Guanabara Koogan, São Paulo, Brasil.

- 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. Lung Cell Mol. Physiol.* **279**: L429-L438.
- Dixon, M. & Webb, E.C. (1964) *Enzymes*. 2nd edition, Acad. Press Inc., New York, USA.
- 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. (in press)*
- Exton, J.H. (1994) Phosphatidylcholine breakdown and signal transduction. *Biochim. Biophys. Acta* **1212**: 26-42
- 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.
- Féraille, E. & Doucet, A. (2001) Sodium-potassium-adenosinetriphosphatase-dependent sodium transport in the kidney: hormonal control. *Physiol. Reviews* **81**: 345-417.
- Frohman, M.A. & Morris, A.J. (1999) Phospholipase D structure and regulation. *Chem. Phys. Lipids* **98**: 127-140.
- Fujimoto, T. (1993) Calcium pump of the plasma membrane is localized in caveolae. *J. Cell Biol.* **120**: 1147-1157.
- Fukushima, N., Ishii, I., Contos, J.J.A., Weiner, J.A. & Chun, J. (2001) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **41**: 507-534.
- Gagnon, F., Hamet, P. & Orlov, S.N. (1999) Na⁺, K⁺ pump and Na⁺-coupled ion carriers in isolated mammalian kidney epithelial cells: regulation by protein kinase C. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **77**: 305-319.

- Gerrard, J.M., Bitler A.M., Peterson, D.A. & White, J.G. (1978) Phosphatidic acid releases calcium from a platelet membrane fraction in vitro. *Prostaglandins Med.* **1**: 387-396.
- Gmaj, P., Murer, H. & Carafoli, E. (1982) Localization and properties of a high affinity $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})\text{ATPase}$ in isolated kidney cortex plasma membranes. *FEBS Lett.* **144**: 226-230.
- Goñi, F.M. & Alonso, A. (1999) Structure and functional properties of diacylglycerols in membranes. *Progress in Lipid Research* **38**: 1-48.
- Goto, K. & Kondo, H. (1993) Molecular cloning and expression of a 90-kDa diacylglycerol kinase that predominantly localizes in neurons. *Proc Natl. Acad. Sci. (USA)* **90**: 7598-7602.
- Gu, R.M. & Wang, W.H. (2002) Arachidonic acid inhibits K channels in basolateral membrane of the thick ascending limb. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **283**: F407-414.
- 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 $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})\text{ATPase}$ by endogenous phosphatidylinositol-4-phosphate. *Biosc. Rep.* **18**: 79-89.
- Gurr, M.I. & Harwood, J.L. (1991) Lipid biochemistry – an introduction. 4th edition, *Chapman & Hall*, New York, USA.
- Ha, K.S. & Exton, J.H. (1993) Differential translocation of protein kinase C isozymes by thrombin and platelet-derived growth factor. A possible function for phosphatidylcholine-derived diacylglycerol. *J. Biol. Chem.* **268**: 10534-10539.

- Hammerman, M.R. & Gavin III, J.R. (1984) Insulin-stimulated phosphorylation and insulin binding in canine renal basolateral membranes. *Am. J. Physiol.* **247**: F408-F417.
- Hanks, S.K., Quinn, A.M. & Hunter, T. (1988) The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* **241**: 42-52.
- Heath, R.J. & Rock, C.O. (1998) A conserved histidine is essential for glycerolipid acyltransferase catalysis. *J. Bacteriol.* **180**: 1425-1430.
- Hla, T. & Maciag, T. (1990) An abundant transcript induced in differentiating human endothelial cells encodes a polypeptide with structural similarities to G-protein-coupled receptors. *J. Biol. Chem.* **265**: 9308-9313.
- Hodgkin, M.N., Pettitt, T.R., Martin, A., Michell, R.H., Pemberton, A.J. & Wakelan, M.J.O. (1998) Diacylglycerols and phosphatidates: which molecular species are intracellular messengers? *Trends Biol. Sci.* **23**: 200-204.
- Hokin, M.R. & Hokin, L.E. (1959) The synthesis of phosphatidic acid from diglyceride and adenosine triphosphate in extracts of brain microsomes *J. Biol. Chem.* **234**: 1381-1386.
- Hokin, M.R. & Hokin, L.E. (1953) Enzyme secretion and the incorporation of ^{32}P into phospholipids of pancreatic slices. *J. Biol. Chem.* **203**: 967-977.
- Horwitz, J. & Perlman, R.L. (1987) Phospholipid metabolism in PC12 pheochromocytoma cells. *Methods Enzymol.* **141**: 169-175.
- Houssa, B., Schaap, D., van der Wal, J., Goto, K., Kondo, H., Yamakawa, A., Shibata, M., Takenawa, T. & van Blitterswijk, W.J. (1997) Cloning of a novel human diacylglycerol kinase (DGK θ) containing three cysteine-rich domains, a proline-rich region, and a pleckstrin homology domain with an overlapping Ras-associating domain. *J. Biol. Chem.* **272**: 10422-10428.

- Houssa, B., Widt, J., Kranenburg, O., Moolenaar, W.H. & van Blitterswijk, W.J. (1999) Diacylglycerol kinase θ binds to and is negatively regulated by active RhoA. *J. Biol. Chem.* **274**: 6820-6822.
- Imai, S., Sakane, F. & Kanoh, H. (2002) Phorbol ester-regulated oligomerization of diacylglycerol kinase δ linked to its phosphorylation and translocation. *J. Biol. Chem.* **277**: 35323-35332.
- 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.
- Inesi, G., Sumbilla, C. & Kirtley, M.E. (1990) Relationships of molecular structure and function in Ca^{2+} -transport ATPase. *Physiol Rev.* **70**: 749-760.
- Jiang, Y., Sakane, F., Kanoh, H. & Walsh, J.P. (2000) Selective of the diacylglycerol kinase inhibitor 3-{2-(4-[bis-(4-fluorophenyl)methylene]-1-piperidinyl)ethyl}-2,3-dihydro-2-thioxo-4(1H)quinazolinone (R59949) among diacylglycerol kinase subtypes. *Biochem. Pharm.* **59**: 763-772.
- Kai, M., Sakane, F., Imai, S., Wada, I. & Kanoh, H. (1994) Molecular cloning of a diacylglycerol kinase isozyme predominantly expressed in human retina with a truncated and inactive enzyme expression in most other human cells. *J. Biol. Chem.* **269**: 18492-18498.
- Kanoh, H., Yamada, K. & Sakane, F. (1990) Diacylglycerol kinase: a key modulator of signal transduction? *Trends Biol. Science* **15**: 47-50.
- Kanoh, H., Yamada, K. & Sakane, F. (2002) Diacylglycerol kinases: emerging downstream regulators in cell signaling systems. *J. Biochem.* **131**: 629-633.

- Karim, Z., Defontaine, N., Paillard, M. & Poggiolo, J. (1995) Protein kinase C isoforms in rat kidney proximal tubule: acute effect of angiotensin II. *Am. J. Physiol.* **269**: C134-C140.
- Kato, H., Kawai, S. & Takenawa, T. (1988) Disappearance of diacylglycerol kinase translocation in ras-transformed cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **154**: 959-966.
- Kato, M. & Kako, K.J. (1987) Orientation of vesicles isolated from baso-lateral membrane of renal cortex. *Mol. Cell. Biochem.* **78**: 9-16.
- Kato, M. & Takenawa, T. (1990) Purification and characterization of membrane-bound and cytosolic forms of diacylglycerol kinase from rat brain. *J. Biol. Chem.* **265**: 794-800.
- Kennelly, P.J. & Krebs, E.G. (1991) Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatase. *J. Biol. Chem.* **266**: 15555-15558.
- Klauck, T.M., Xu, X., Mousseau, B. & Jaken, S. (1996) Cloning and characterization of a glucocorticoid-induced diacylglycerol kinase. *J. Biol. Chem.* **271**: 19781-19788.
- Lara, L.S., Bica, R.B., Sena, S.L., Correa, J.S., Marques-Fernandes, M.F., Lopes, A.G. & Caruso-Neves, C. (2002) Angiotensin-(1-7) reverts the stimulatory effect of angiotensin II on the proximal tubule Na⁺-ATPase activity via a A779-sensitive receptor. *Regul. Pept.* **103**: 17-22.
- Limatola, C., Schaap, D., Moolenaar, W.H. & van Blitterswijk, W.J. (1994) Phosphatidic acid activation of protein kinase C ζ overexpressed in COS cells: comparison with other protein kinase C isotypes and other acidic lipids. *Biochem. J.* **304**: 1001-1008.
- Liscovitch, M., Czarny, M., Fiucci, G. & Tang, X. (2000) Phospholipase D: molecular and cell biology of a novel gene family. *Biochem J.* **345**: 401-15.

- Lowry, O.H., Rosembrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- MacDonald, M.L., Mack, K.F., Richardson, N. & Glomset, J.A. (1988) Regulation of diacylglycerol kinase reaction in swiss 3T3 cells. *J. Biol. Chem.* **263**: 1575-1583.
- Mackay, J.P. & Crossley, M. (1998) Zinc fingers are sticking together. *Trends Biochem. Science* **23**: 1-4.
- Maia, J.C.C., Gomes, S.L. & Juliani, M.H. (1983) In: Genes of Parasites: a Laboratory Manual, Morel C.M., *Editora Fundação Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Brazil.
- Malnic, G., Fernandez, R., Cassola, A.C., Barreto-Chaves, M.L., de Souza, M.O. & Aires, M.M. (1997) Mechanisms and regulation of H⁺ transport in distal tubule epithelial cells. *Wien. Klin. Wochenschr.* **109**: 429-34.
- McPhail, L.C., Waite, K.A., Regier, D.S., Nixon, J.B., Qualliotine-Mann, D., Zhang, W.X., Wallin, R. & Sergeant, S. (1999) A novel protein kinase target for the lipid second messenger phosphatidic acid. *Biochim. Biophys. Acta* **1439**: 277-90.
- Michell, R.H. (1975) Inositol phospholipids and cell surface receptor function. *Biochim. Biophys. Acta* **415**: 81-47.
- Monaco, M.E., Moldover, N.H. & Walden, P.D. (2002) Analysis of hormone-stimulated phosphatidylinositol synthesis. *J. Cell. Physiol.* **194**: 151-161.
- Moolenaar, W.H., Kruijer, W., Tilly, B.C., Verlaan, I., Bierman, A.J. & de Laat, S.W. (1986) Growth factor-like action of phosphatidic acid. *Nature* **323**: 171-3.
- Nishizuka, Y. (1984) The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature* **308**: 693-698.
- Nishizuka, Y. (1988) The heterogeneity and differential expression of multiple species of the protein kinase C family. *Biofactors* **1**: 17-20.

- Nishizuka, Y. (1992) Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* **258**: 607-614.
- Nobe, K., Aizawa, H., Ohata, H. & Momose, K. (1995) Protein kinase C is involved in translocation of diacylglycerol kinase induced by carbachol in guinea pig *taenia coli*. *Biochem. Pharmacol.* **50**: 591-599.
- Nozawa, Y. (2002) A thematic series on lipid signaling: prologue. *J. Biochem.* **131**: 283-284.
- Ohanian, J. & Ohanian, V. (2001) Lipid second messenger regulation: the role of diacylglycerol kinases and their relevance to hypertension. *J. Human Hypert.* **15**: 93-98.
- Ostlund, E., Mendez, C.F., Jacobsson, G., Fryckstedt, J., Meister, B. & Aperia, A. (1995) Expression of protein kinase C isoforms in renal tissue. *Kidney Int.* **47**: 766-773.
- Pettitt, T.R. & Wakelam, M.J.O. (1999) Diacylglycerol kinase ϵ , but not ζ , selectively removes polyunsaturated diacylglycerol, inducing altered protein kinase C distribution *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **274**: 36181-36186.
- Previati, M., Bertagnolo, V., Mazzoni, M., Osti, F., Borgatti, P. & Capitani, S. (1994) Diacylglycerol kinase activity in rat liver nuclei. *Cell. Signal.* **6**: 393-403.
- 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.
- 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. (2001) protein kinase C-induced phosphorylation modulates the Na⁺-ATPase activity from proximal tubules. *Biochim. Biophys. Acta* **1512**: 90-97.
- Sacktor, B., Roseblom, I.L., Liang, C.T. & Cheng, L. (1981) Sodium gradient- and sodium plus potassium gradient-dependent L-glutamate uptake in renal basolateral membrane vesicles. *J. Membr. Biol.* **60**: 63-71.
- Sakane, F., Imai, S., Kai, M., Wada, I. & Kanoh, H. (1996) Molecular cloning of a novel diacylglycerol kinase isozyme with a pleckstrin homology domain and a C-terminal tail similar to those of the EPH family of protein tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* **271**: 8394-8401.
- Sakane, F., Yamada, K. & Kanoh, H. (1989) Different effects of sphingosine, R59022 and anionic amphiphiles on two diacylglycerol kinase isozymes purified from porcine thymus cytosol. *FEBS Lett.* **255**: 409-413.
- Sakane, F., Yamada, K., Imai, S.I. & Kanoh, H. (1991) Porcine 80 kDa diacylglycerol kinase is a calcium-binding and calcium/phospholipid-dependent enzyme and undergoes calcium-dependent translocation. *J. Biol. Chem.* **266**: 7096-7100.
- Sakane, F., Yamada, K., Kanoh, H., Yokoyama, D. & Tanabe, T. (1990) Porcine diacylglycerol kinase sequence has zinc finger and E-F hand motifs. *Nature* **344**: 345-348.
- Sanidas, D., Garnham, A. & Mian, R. (2002) Hypoxia-induced chemiluminescence in human leukocytes: the role of Ca²⁺. *Eur. J. Pharmacol.* **453**: 183-7
- Sanjuán, M.A., Jones, D.R., Izquierdo, M. & Mérida, I. (2001) Role of diacylglycerol kinase α in the attenuation of receptor signaling. *J. Cell Biol.* **153**: 207-219.

- Scalera, V., Storelli, C., Storelli-Joss, C., Haase, W. & Murer, H. (1980) A simple and fast method for isolation of basolateral plasma membranes from rat small-intestinal epithelial cells. *Biochem. J.* **186**: 177-181.
- Schaap, D., Widt, J., van der Wal, J., Vandekerckhove, J., van Damme, J., Gussow, D., Ploegh, H.L., van Blitterswijk, W.J. and van der Bend, R.L. (1993) Purification, cDNA-clonning and expression of human diacylglycerol kinase. *FEBS Lett.* **275**: 151-158.
- Schauf, C., Moffett, D. & Moffett, S. (1993) Fisiologia Humana. 2ª edição, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil.
- Senter, P., Eckstein, F. & Kagawa, Y. (1983) Substrate metal-adenosine 5' - triphosphate chelate structure and stereochemical course of reaction catalyzed by the adenosinetriphosphatase from the thermophilic bacterium PS3. *Biochemistry* **22**: 5514-5518.
- Somermeyer, M.G., Knauss, T.C., Weinberg, J.M. & Humes, H.D. (1983) Characterization of Ca^{2+} transport in rat renal brush-border membranes and its modulation by phosphatidic acid. *Biochem. J.* **214**: 37-46.
- Somero, G.N. (1986) Protons, osmolytes, and fitness of internal milieu for protein function. *Am. J. Physiol.* **251**: R197-R213.
- 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.
- Stryer, L. (1996) Bioquímica. 4ª edição, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil.
- Sturtevant, J.M. (1977) Heat capacity and entropy changes in processes involving proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **74**: 2236-40

- Tang, W., Bunting, M., Zimmerman, G.A., McIntyre, T.M. & Prescott, S.M. (1996) Molecular cloning of a novel human diacylglycerol kinase highly selective for arachidonate-containing substrates. *J. Biol. Chem.* **271**: 10237-10241.
- Taussky, H.H. & Shorr, E. (1953) A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. *J. Biol. Chem.* **202**: 675-685.
- Topham, M.K. & Prescott, S.M. (1999) Mammalian diacylglycerol kinases, a family of lipid kinases with signaling functions. *J. Biol. Chem.* **274**: 11447-11450.
- Topham, M.K. & Prescott, S.M. (2001) Diacylglycerol kinase ζ regulates Ras activation by a novel mechanism. *J. Cell Biol.* **152**: 1135-1143.
- Topham, M.K., Bunting, M., Zimmerman, G.A., McIntyre, T.M., Blackshear, P.J. & Prescott, S.M. (1998) Protein kinase C regulates the nuclear localization of diacylglycerol kinase-zeta. *Nature* **394**: 697-700.
- Tortelote, G.G., Valverde, R.H.F., Ribeiro, M.G.L., Nunes-Tavares, N., Einicker-Lamas, M., Hassón-Voloch, A. & Vieyra, A. (2002) Presence of caveolae in *E. electricus* (L.) electric organ: regulatory microdomains involved in ionic transport? Poster apresentado na XVII Reunião anual da FeSBE, Salvador, BA, Brasil.
- Tsukamoto, Y., Tamura, T. & Marumo, F. (1988) ATP-driven Ca^{2+} pump in the basolateral membrane of rat kidney cortex catalyzes an electroneutral $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ antiport. *Biochim. Biophys. Acta* **945**: 281-90
- van Blitterswijk, W.J. & Houssa, B. (1999) Diacylglycerol kinases in signal transduction. *Chem. Phys. Lipids* **98**: 95-108.
- van Blitterswijk, W.J. & Houssa, B. (2000) Properties and functions of diacylglycerol kinases. *Cell Signal.* **12**: 595-605.

- van der Bend, R.L., de Widt, J., Hilkmann, H. & van Blitterswijk, W.J. (1994) Diacylglycerol kinase in receptor-stimulated cells converts its substrate in a topologically restricted manner. *J. Biol. Chem.* **269**: 4098-4102.
- Vieyra, A. (1996) Catalytic and structural modifications of sarcoplasmic reticulum and plasma membrane ($\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$) ATPases induced by organic solutes that accumulate in living systems. *Biosci. Rep.* **16**: 115-27.
- Walker, A.J., Draeger, A., Houssa, B., van Blitterswijk, W.J., Ohanian, V. & Ohanian, J. (2001) Diacylglycerol kinase theta is translocated and phosphoinositide 3-kinase-dependently activated by noradrenaline but not angiotensin II in intact small arteries. *Biochem. J.* **353**: 129-137
- Walsh, J.P., Suen, R. & Glomset, J.A. (1995) Arachidonoyl-diacylglycerol kinase. Specific *in vitro* inhibition by polyphosphoinositides suggests a mechanism for regulation of phosphatidylinositol biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **270**: 28647-28653.
- Walsh, J.P., Suen, R., Lemaitre, R.N., & Glomset, J.A. (1994) Arachidonoyl-diacylglycerol kinase from bovine testis. Purification and properties. *J. Biol. Chem.* **269**: 21155-21164.
- Wang, W.H., Cassola, A. & Giebisch, G. (1994) Involvement of actin cytoskeleton in modulation of apical K channel activity in rat collecting duct. *Am. J. Physiol.* **267**: F592-F598 .
- Way, K.J., Chou, E. & King, G.L. (2000) Identification of PKC-isoform-specific biological actions using pharmacological approaches. *Trends Physiol. Sci.* **47**: 181-187.
- Westley, J. (1969) Enzymic Catalysis. ____ edition, *Harper & Row*, New York, USA.
- Whittembury, G. & Proverbio, F. (1970) Two modes of Na extrusion in cells from guinea pig kidney cortex slices. *Pflugers. Arch.* **316**: 1-25

- Wilk, S., Wilk, E. & Magnusson, R.P. (2002) Identification of histidine residues important in the catalysis and structure of aspartyl aminopeptidase. *Arch. Biochem. Biophys.* **407**: 176-183.
- Wright, M.N. & McMaster, C.R. (2002) Phospholipid synthesis, diacylglycerol compartmentation and apoptosis. *Biol. Res.* **35**: 223-229.
- Yoshikawa, K., Shinohara, Y., Terada, H. & Kato, S. (1987) Why is Mg^{2+} necessary for specific cleavage of the terminal phosphoryl group of ATP? *Biophys. Chem.* **27**: 251-254.

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](#)