
ENVOLVIMENTO DA
PROTEÍNA NEURONAL
SENSORIA DE CÁLCIO-1
(NCS-1) NA SINALIZAÇÃO
MUSCARÍNICA EM
CÉLULAS PC12

Belo Horizonte - MG
2007

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Envolvimento da proteína Neuronal Sensora de Cálcio- 1 (NCS-1) na sinalização muscarínica em células PC12

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia Bioquímica Molecular, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Marco A. Romano-Silva

Co-Orientador: Prof. Dr. Helton J. Reis

Belo Horizonte - MG
2007

*O homem sem limites dentro de si
Explora o melhor acesso para se limitar.
(Melissa Monteiro Guimarães)*

*Deve haver em algum lugar do papel
Um ponto de transparência
Ainda que provisório.
(Rodrigo Guimarães e Silva)*

*vou indo porque é cedo. e onde o tempo é tempo, é meu.
vou indo sem pressa porque é cedo e sem distâncias.
porque assim, sou sem desculpas. porque já não sei.
vou indo, me perguntando. onde poderia ser lugar mas é quase.
onde se espera um ponto, não responde. porque apenas se refere a.
vou me referindo porque parece canto mas é ritmo de andar.
vou voando porque nenhum espaço é lugar.
nenhuma esfera é onde. nem mesmo onde é assim tão divagar.
(Melissa Monteiro Guimarães)*

Dedico esta Tese aos meus pais,

Edson Guimarães e Mariza Monteiro Guimarães

Maior que a tese em si, é o conhecimento, paradoxo errante e insolúvel. Este se faz e borbulha o novo cada vez que a criança passeia o corpo consolidado de experiências. Vocês são o caminho por onde alimento e me desperto. Por onde desapeguei de mim, os limites, e por isso mesmo encontro-me um pouco mais madura, perto de minhas perguntas. Vocês são minhas escolhas, idéias, reações, resultados, processos, descobertas. É para o caminho que se existe! É para o ideal, o destino deste caminho.

A vocês, toda minha gratidão e meu respeito.

Ao meu orientador Marco Aurélio Romano-Silva

Ao meu co-orientador Helton José Reis

Ao colaborador deste trabalho Dr. Andreas Jeromin

Ao professor André Ricardo Massensini,

À professora Cristina Guatimosin Fonseca

Ao professor Gregory Thomas Kitten

Ao professor Marco Antônio Máximo Prado

Ao professor Marcus Vinícius Gomez

À professora Maria de Fátima Leite

À professora Mírian Martins Chaves

À professora Vânia Ferreira Prado

À aluna de iniciação científica Lívia Paulinelli Guimarães

Aos alunos de iniciação científica Antônio Giovanni Junior, Daniel de Souza Carneiro e Raphael Rabelo de Mello Penholati

Aos meus colegas de pós-graduação e de laboratório: Ana Cristina do Nascimento Pinheiro, Ana Cristina Magalhães, Alexandre de Barros, Bernardo Schettino, Bráulio Marccone de Castro, Bruno Rezende Souza, Célio de Castro Junior, Cristina Martins, Daniela Valadão, Danuza Montijo, Dawidson Assis Gomes, Débora Marques de Miranda, Fabiana Andrade Caetano, Fabíola Ribeiro, Flávio Pimenta, Gislene Cristina Valadares, Grace Schenatto Pereira, Janice Henriques da Silva, Juliana Garcia Carneiro, Juliara Márcia Henriques da Silva, Karen Cecília de Lima Torres, Luciene Bruno Vieira, Lucimar Teodoro Ferreira, Magda Santos Silva, Mateus Guerra, Michele Rodrigues, Monalise Costa Batista, Paulo Mellilo, Renan Pedra Souza

À Adriana Aparecida Pereira, Eliane Eustáquia Pereira, Darci Ferreira dos Santos, Sônia Mara de Oliveira Costa

Ao professor Christopher Kushmerick

À professora Fátima Soares Motta Noronha

Ao professor Jader Santos Cruz

Ao professor Humberto Correa

Ao professor Márcio Coelho

Ao professor Márcio Flávio Dutra

À professora Maria de Fátima Martins Horta

À professora Marilene Suzan Marques Michalick

Ao professor Paulo Sérgio Lacerda Beirão

Ao professor Paulo César de Matos Rodrigues

Ao professor Ramon Moreira Cosenza

À professora Santuza Maria Ribeiro

Ao professor Luis Armando de Marco

À professora Virgínia Maria Vidigal Fernandes

À Wolfanga Lentz Boson

À Aléxia Klein, Amália Verônica Mendes da Silva, Ana Antonialli, Andréia Laura Prates Rodrigues, Cíntia Martins Fagundes Rezende, Cecília Jorge Maciel, Cláudio Guimarães Sant'Ana, Cristiane Livia Malacco, David Alonso, Ivano Lara, Lúcia Elena Antonialli, Leonardo Bonato Felix, Levindo Diniz, Luiz Otávio Lunardi, Rodrigo Guimarães e Silva, Vanessa Cristina Araújo, Tânia Grigolli, Viviane Cardoso de Abreu, Walter Gomide

À Denise de Oliveira Azevedo

À Fernanda Jorge Maciel

À Edith Cordeiro, Joaquim Mendes Sant'Ana, Nadja Naira Guimarães, Patrícia Brant Monteiro, Regina Monteiro Campolina Barbosa

À Mariza Monteiro Guimarães, Edson Guimarães, Leonardo Monteiro Guimarães, Isabella Monteiro Guimarães, Rafael Monteiro Guimarães

Lista de abreviaturas	xiii
Reagentes e Soluções	xvii
Relação de figuras	xxvii
Resumo	xxxii
Abstract	xxxiii
1 INTRODUÇÃO	34
2 OBJETIVOS	55
2.1 Objetivo geral	56
2.2 Objetivos específicos	56
3 METODOLOGIA	58
3.1 Cultura celular	62
3.2 Plaqueamento Celular	62
3.3 Transfecção transitória mediada por lipossoma	62
3.4 Plasmídeos	63
3.5 Estímulo das células PC12-NCS-1 e PC12-wt expressando o domínio PH _{PLCδ} EGFP	64
3.6 Coleta das imagens das células expressando o domínio PH _{PLCδ} EGFP	64
3.7 Cálculo da fluorescência citoplasmática do domínio PH _{PLCδ1} -EGFP	65
3.8 Cálculo da fluorescência máxima citoplasmática do domínio PH _{PLCδ} -EGFP	65
3.9 Cálculo da razão fluorescência da membrana/fluorescência citoplasmática do domínio PH _{PLCδ} -EGFP	66

3.10 Detecção dos níveis intracelulares de Ca^{2+} em células marcadas com Indo1	66
3.11 Detecção qualitativa dos níveis intracelulares de Ca^{2+} com o marcador Fluo4	67
3.12 Preparo de extrato protéico	68
3.13 Dosagem de proteína	68
3.14 Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS	69
3.15 <i>Immunoblots</i>	69
3.16 Imunofluorescência	70
3.17 Quantificação da liberação de glutamato em células PC12-wt e PC12-NCS-1	70
3.18 Detecção e quantificação das vesículas endocitóticas em células PC12-wt e PC12-NCS-1	71
3.19 Quantificação do inositol radioativo ($[\text{}^3\text{H}]\text{-InsP}_3$) em células PC12-wt e PC12-NCS-1 estimuladas com CCH	72
3.19.1 Extração dos inositois totais	72
3.19.2 Formatação das resinas de troca aniônica e montagem das colunas	73
3.19.3 Eluição das amostras	73
4 RESULTADOS	75
5 DISCUSSÃO	141
5.1 Modelo de células PC12 expressando altos níveis de NCS-1	142
5.2 Alterações na dinâmica de hidrólise/formação de $\text{PIP}_2/\text{InsP}_3$ em células PC12-wt e PC12-NCS-1 estimuladas com CCH	143

5.3 Diferenças na dinâmica e na $[Ca^{2+}]_i$ nas células PC12-NCS-1 e PC12-wt estimuladas com CCH	148
5.4 Alterações na liberação de glutamato em células PC12-NCS-1 e PC12-wt estimuladas com CCH	155
5.4.1 Origem do glutamato liberado por células PC12	160
5.5 Participação da proteína NCS-1 na via colinérgica	164
5.6 Sinalização de Ca^{2+} , proteínas sensoras de cálcio e sua participação em transtornos neuropsiquiátricos	169
5.7 Considerações finais e perspectivas	174
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	176
7 ANEXO 1	206
8 POEMA	ccxxxviii

Lista de abreviaturas

Δ	Delta
μCi	Micro Curie
μL	Micro litro(s)
μm	Micrômetro(s)
μs	Micro segundo(s)
$[\text{Ca}^{2+}]_i$	Concentração intracelular de íons Ca^{2+}
2-APB	2-aminoetoxidifenil borato
5-HT	Serotonina
ACh	Acetilcolina
AMP	Mono fosfato de adenosina
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4- isoxazolepropiónico
AP1	Proteína adaptadora de clatrina do tipo 1
AP2	Proteína adaptadora de clatrina do tipo 2
ARF1	Fator de ribosilação de ADP do tipo 1
ATP	Trifosfato de adenosina
BAPTA-AM	1, 2 bis-(2-aminofenoxi)etano-N; N; N'; N'- ácido acetoximetil ester tetracético
BSA	Albumina de soro bovino
CAPS	Proteína ativadora de secreção dependente de Ca^{2+}
CBP	Proteínas ligadoras de Ca^{2+}
CCDV	Canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem
CCH	Carbacol
cm	Centímetro(s)
cm^2	Centímetro(s) quadrado(s)
DAG	Diacilglicerol
D2R	Receptor de dopamina do tipo 2
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético

EGTA	Ácido etileno glicol-bis (β -aminoetil éter) N,N,N',N'-tetraacético
EPM	Erro padrão da média
F	Fluorescência média na região de interesse
Fluo4-AM	Ácido 5-oxazolcarboxílico, 2-(6-bis(2-((acetiloxi)metóxi)-2-oxoetil)amino)-5(2-(2-bis(2-((acetiloxi)metóxi)-2-oxoetil)amino)-5-metilfenoxi)etóxi)-2-benzofuranil)-, (acetiloxi)metil ester
F ₀	Fluorescência média inicial
g	Gravidade(s) – força-
G418	Gentamicina
GDH	Glutamato desidrogenase
GDNF	Fator neurotrófico derivado da glia
GFP	Proteína verde fluorescente
GPCR	Receptor acoplado a proteína G
Gq	Subunidade Gq da proteína G
GRK2	Cinase do tipo 2 de receptor acoplado a proteína
HEPES	N-2-hidroxietil]piperazina-N'-[2-ácido etanosulfônico]
Hz	Hertz
IL1RAPL	Proteína semelhante à proteína associada ao receptor de interleucina-1
Indo1-AM	Metilfenoxietano- N,N,N',N'-ácido tetraacético, ester pentaacetoximetil
InsP3	Tri (1,4,5) fosfato inositol
InsP3R	Receptores de tri-fosfato inositol
K _D	Constante de afinidade
Kv4.2	Canal de K ⁺ dependente de voltagem (subunidade 4.2)
M1R	Receptor muscarínico do tipo 1
M4R	Receptor muscarínico do tipo 4
mg	Mili grama(s)

mL	Mili litro(s)
mM	Mili molar
ms	Mili segundo(s)
NADP ⁺	β-Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADPH	β-Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
NCS-1	Proteína neuronal sensora de Ca ²⁺ -1
NGF	Fator de crescimento neural
NMDA	N' metil D-aspartato
p/p	Peso/peso
p/v	Peso/volume
PC12	Célula originada de feocromocitoma
PC12-NCS-1	PC12 superexpressando estavelmente altos níveis de NCS-1
PC12-wt	PC12 selvagem
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDE	Fosfodiesterase de nucleotídeo cíclico
PH	Homologia a plecstrina
PH _{PLCδ} EGFP	Domínio PH da PLC-δ1 em fusão à GFP
PI4Kβ	Fosfatidilinositol 4β-cinase
PIP2	Fosfatidilinositol (4,5) bi-fosfato
PI(4,5)P2	Fosfatidilinositol (4,5) bi-fosfato
PLC	Fosfolipase C
POPOP	1,4-bi[2-(5-feniloxazol)]benzeno
PPO	2,5-difenil-oxazol
R _{max}	Razão máxima
R _{min}	Razão mínima
RNA	Ácido ribonucléico
RNA _m	RNA mensageiro
s	Segundo(s)
siRNA	Construção plasmidial de interferência de RNA
SNAP-25	Proteína associada a sinaptosoma de 25-kDa

SNARE	Complexo de fusão protéica sensível a N-etil-malamida
SNC	Sistema nervoso central
SNPs	Pequenas variações genotípicas
TGF β R1	Receptor do tipo 1 de transformação do fator de crescimento- β
TRIS	Tris-hidroximetil-aminometano
TRP	Receptor de potencial transitório
TRPC5	Receptor de potencial transitório canônico do tipo 5
U.A.	Unidades arbitrárias
UTP	Tri-fosfato de uracila
UV	Ultravioleta
V	Volts
v/v	Volume/volume
VAMP	Sinaptobrevina
VGLUT2	Transportador vesicular de glutamato tipo 2
VMAT1	Transportador vesicular de monoamina tipo 1
W	Watt(s)

Reagentes utilizados:

Calbiochem-Novabiochem Corporation (USA e Canada)

Usb-Corporation (USA)

Triton X-100

Ortovanadato de sódio

G418

Coquetel de inibidores de protease

Ionicina

Pluronic F127

Gibco-Invitrogen Corporation (USA)

DMEM alta glicose

Penicilina/streptomicina (P/S)

Soro equino (S.E.)

Soro fetal bovino (SFB)

Fator de crescimento neuronal-7S (“*neuronal growth factor*”-7S) (NGF)

Merck (Germany)

Na_2HPO_4

NaH_2PO_4

MOPS

EGTA

EDTA

MnCl₂

NaCl

KCl

CaCl₂

HEPES

Glicose

MgSO₄

Atropina

Clorofórmio

Metanol

Etanol

Bicarbonato de sódio

Promega Corporation

Transfast reagent

Sigma (USA)

CCH

BAPTA-AM

U73122

Indo1-AM

Nonidet P/40

β-NADP

L-glutamic

Desidrogenase l-glutâmico

Ácido l-glutâmico

Resina Dowex-1(8X)

[³H]-myo-inositol

POPOP

PPO

Tween 20 (Sigma-Ultra)

Ácido fórmico

Formato de amônio

Tetraborato de amônio

Formato de sódio

Analítica

Etanol

1,4-Dioxana

Tolueno

Naftaleno

Molecular Probes (USA).

Fluo4-AM

Amersham Biosciences (Germany):

Kit-ECL

Anticorpos utilizados:

Anticorpo primário monoclonal (camundongo) anti-actina (Chemicon U.S.A e Canada)

Anticorpo primário policlonal (camundongo) anti-VGLUT2 (Chemicon U.S.A e Canada)

Anticorpo primário policlonal (cabra) anti-receptor muscarínico tipo 1 (RM1) (Santa Cruz Biotechnology-USA)

Anticorpo primário policlonal (coelho) anti-fosfolipase C tipo β (PLC- β) (Santa Cruz Biotechnology-USA)

Anticorpo primário (cabra) anti-VMAT1 (Alphadiagnostic international)

Anticorpo secundário (cabra) anti-coelho conjugado à “*horseradish peroxidase-linked*”(HRP) (Molecular Probes)

Anticorpo secundário anti-cabra conjugado à HRP (Molecular Probes)

Anticorpo secundário (cabra) anti-camundongo conjugado à HRP (Molecular Probes)

Anticorpo secundário anti-camundongo ALEXA 568 nm

Anticorpo secundário (burro) anti-camundongo ALEXA 647 nm

Anticorpo secundário (burro) anti-cabra ALEXA 488 nm

Anticorpo secundário anti-coelho ALEXA 488nm

Soluções:

Meio de crescimento celular:

Meio DMEM alta glicose suplementado com 1% P/S, 5% de SFB e 5% SE (suplementado com 400µg/mL G418 para células PC12-NCS-1).

Meio DMEM alta glicose:

Adicionar ao meio DMEM diluído em água destilada/deionizada, 3,7g de bicarbonato de sódio. pH ajustado para 7,2 com HCl 0,1M. Filtrar em membrana 0,22µm em capela de fluxo laminar (esterilizada). Armazenar à 4°C em frascos estéreis.

DMEM alta glicose (composição):

CaCl₂ 1,8mM, Fe(NO₃)₃-9H₂O 0,000248mM, KCl 5,3mM, MgSO₄ 0,813mM, NaCl 110,34mM, NaH₂PO₄-H₂O 0,906mM, NaHCO₃ 3,5mM, D-Glicose 30,0mM, Vermelho fenol 0,0346mM, Piruvato de sódio 1,0mM, L-Arginina-HCl 0,398mM, L-Cisteína 2HCl 0,2mM, L-Glutamina 4,0mM, Glicina 0,399mM, L-Histidina HCl-H₂O 0,2mM, L-Isoleucina 0,802mM, L-Leucina 0,802mM, L-Lisina-HCl 0,798mM, L-Metionina 0,201mM, L-Fenilalanina 0,4mM, L-Serina 0,4mM, L-Treonina, 0,078mM, L-Triptofano, 0,078mM, L-Tirosina 2Na 2H₂O, 0,398mM, L-Valina, 0,803mM, D-pantotenato de cálcio, 0,0083mM, Cloreto de colina, 0,0285mM, Ácido Fólico, 0,00906mM, i-Inositol, 0,04mM, niacinamida, 0,0328mM, piridoxina HCl, 0,0196mM, riboflavina 0,00106mM, tiamina HCl 0,0118mM).

Meio de diferenciação celular:

DMEM alta glicose suplementado com 1% P/S, 2,5% de SFB, 2,5% SE e 100ng/mL NGF-7S (suplementado com 400µg/mL G418 para células PC12-NCS-1).

Solução estoque de NGF-7S:

Diluído à uma concentração de 25µg/mL em meio DMEM alta glicose contendo 2,5% SFB, 2,5% SE e 1% P/S. Aliquotado (30-60 µL) e mantido à -20°C. Recomenda-se não recongelar.

Solução Krebs-HEPES de incubação ou perfusão:

124,0 mM NaCl, 4,0mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 10,0 mM Glicose, 25,0 mM HEPES. O pH foi ajustado para 7,4 com 5M NaOH

Solução de marcação Indo1-AM:

10µM Indo1-AM diluído em meio Krebs-HEPES de incubação contendo 1mM Ca²⁺ e 1% pluronic F127. Preparar a solução minutos antes da marcação celular. Manter à temperatura ambiente fora do contato da luz.

Solução de marcação Fluo4-AM:

10µM Fluo4-AM diluído em meio Krebs-HEPES de incubação contendo 1mM Ca²⁺. Preparar a solução minutos antes da marcação celular. Manter à temperatura ambiente fora do contato da luz.

Solução de marcação FM4-64:

30 μ M FM4-64/ 37°C por 12 horas em meio de diferenciação.

Reagente de Bradford:

0,06% (p/v) de azul de Comassie G-250 e 3% (v/v) de ácido perclórico. O comassie G foi diluído, primeiramente, no ácido perclórico e só depois de muita homogeneização completou-se com água deionizada para o volume total. Foi estocado à 4°C em frasco âmbar e usado em até sete dias.

Solução de NaCl :

0,15 M NaCl. O NaCl foi diluído em água deionizada e estocado à 4°C.

Solução de lise 1:

20mM Tris pH 8,0, 137mM NaCl, 0,5mM ortovanadato de sódio, 2mM ácido ocadáico, 10% glicerol, 1% Nonidet P40, 2% de coquetel de inibidores de protease. Estocado à 4°C. Adicionar o coquetel posteriormente junto à amostra.

PBS:

58mM Na₂HPO₄, 17mM NaH₂PO₄ e 68mM NaCl, pH 7,4

Tampão de corrida:

Tris-HCl 0,025M, pH8,3; glicina 0,192M e SDS 0,1% (p/v).

Tampão de amostra (6X):

SDS 0,2% (p/v), glicerol 0,2% (v/v), 2-mercaptoetanol 0,32% (v/v), azul de bromofenol 0,0001% (p/v) e Tris-Hcl 12,5mM, pH6,8.

Solução de bloqueio:

PBS 1X; Tween 20 0,5% (v/v); leite desnatado em pó (Molico[®], Nestle) 5% (p/v).

Gel de separação:

15% (v/v) de acrilamida/ bisacrilamida 29:1 (p/p); Tris-HCl 0,4M, pH 8,8; SDS 0,1% (p/v); persulfato de amônio 50mM e TEMED 0,05% (v/v).

Gel de concentração:

4% (v/v) de acrilamida/ bisacrilamida 29:1 (p/p); Tris-HCl 0,125M, pH 6,8; SDS 0,1% (p/v); persulfato de amônio 4mM e TEMED 0,025% (v/v).

Tampão de transferência:

Tris 48mM; glicina 39mM; metanol 20% (v/v); 0,013mM SDS.

Solução de Ponceau:

Ponceau S 1% (p/v); ácido acético 10% (v/v) -

Solução PBS-Tween:

Diluir Tween 20 0,1% (v/v) em solução PBS 1X.

Solução de formatação da resina de troca aniônica Dowex1(X8):

Diluir formato de amônio em água a 0,1N. Manter a solução à temperatura ambiente.

Solução de lise 2:

Preparar solução de clorofórmio-metanol (1:2). Recomenda-se que os produtos sejam dos fabricantes (Merck ou Sigma) e que essa solução seja preparada poucos minutos antes de sua utilização. Não estocar.

Solução de eluição 1:

Diluir tetraborato de amônio à 5mM e formato de sódio 60mmols/L em água destilada/deionizada. Manter à temperatura ambiente.

Solução de eluição 2:

Diluir formato de amônio à 0,2 M em solução preparadas de ácido fórmico à 0,1 M. Manter à temperatura ambiente.

Solução de eluição 3:

Diluir formato de amônio à 0,4 M em solução preparadas de ácido fórmico à 0,1 M. Manter à temperatura ambiente.

Solução de eluição 4:

Diluir formato de amônio à 1,0 M em solução preparadas de ácido fórmico à 0,1 M. Manter à temperatura ambiente.

Solução de eluição 5:

Diluir formato de amônio à 2,0 M em solução preparadas de ácido fórmico à 0,1 M.

Manter à temperatura ambiente.

Solução “Bray”:

0,3%v/v etanol; 0,3%v/v 1,4-dioxana, 0,3%v/v tolueno, 0,55M naftaleno, 0,55mM POPOP, 0,02M PPO, 0,09%v/v triton X-100. Para diluição completa, a solução foi deixada sob agitação durante horas em capela de fluxo laminar. A solução “Bray” foi mantida à 4°C em frasco âmbar.

Este trabalho foi realizado nos laboratórios de Neurofarmacologia (ICB-UFMG), com o apoio financeiro das seguintes Instituições:

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
- Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP)
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)
- Pró-Reitoria de Pesquisa da UFMG (PRPq-UFMG)
- Programa Avançado de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PADCT)
- Programa de Núcleos de Excelência (PRONEX)

Figura 1: $[Ca^{2+}]_i$ e o ajuste fino da atividade celular.	36
Tabela I: Proteínas pertencentes à família NCS.	40
Figura 2: Estrutura simplificada da proteína NCS-1.	43
Figura 3: Exposição da cauda miristoil após ligação ao Ca^{2+} .	44
Tabela II: Interações proteína-proteína descritas para NCS-1.	47
Figura 4: Morfologia de células PC12-wt e PC12-NCS-1 diferenciadas com NGF.	53
Figura 5: Via de sinalização muscarínica acoplada à dinâmica de hidrólise/formação de PIP2/InsP3.	54
Organograma 1: Resumo esquemático dos procedimentos experimentais realizados neste trabalho.	61
Figura 6: Distribuição espacial da proteína NCS-1 nas células PC12-wt e PC12-NCS-1 obtida a partir da técnica de imunofluorescência.	79
Figura 7: Expressão da proteína NCS-1 em células PC12-wt e PC12-NCS-1	80
Figura 8: Expressão endógena do receptor muscarínico (M1R) nas células PC12-wt e PC12- NCS-1.	81
Figura 9: Expressão endógena do receptor muscarínico (M1R) e actina presente no extrato total das células PC12-wt e PC12-NCS-1 não diferenciadas.	82
Figura 10: Distribuição espacial da proteína PLC- β 1 nas células PC12-wt e PC12-NCS-1.	84
Figura 11: Expressão endógena da proteína PLC- β nas células PC12-wt e PC12-NCS-1.	85

Figura 12: Quantificação da média da intensidade de fluorescência referente à presença da PLC- β 1 nos neuritos das células PC12-wt e PC12-NCS-1.	86
Figura 13: Dinâmica espacial do domínio PH _{PLCδ} EGFP antes e depois do estímulo das células PC12-wt e PC12-NCS-1 com CCH.	91
Figura 14: Dinâmica temporal do domínio PH _{PLCδ} EGFP das células PC12-wt e PC12-NCS-1 estimuladas com CCH.	92
Figura 14 <i>inset</i> : Fluorescência máxima do domínio PH _{PLCδ} EGFP presente no citoplasma das células PC12-wt e PC12-NCS-1.	92
Figura 15: Razão do domínio PH _{PLCδ} EGFP presente na membrana plasmática/citoplasma das células PC12-wt e PC12-NCS-1 após estímulo com CCH.	94
Figura 16: Porcentagem das células PC12-wt e PC12-NCS-1 apresentando diferentes perfis de distribuição do domínio PH _{PLCδ} EGFP após estímulo com CCH.	95
Figura 17: Formação de inositol radioativo ([³ H]-InsP ₃) em células PC12-wt e PC12-NCS-1 estimuladas com CCH.	97
Figura 18: Dinâmica espacial do domínio PH _{PLCδ} EGFP nas células PC12-wt e PC12-NCS-1 após estímulo despolarizante com KCl.	99
Figura 19: Dinâmica temporal do domínio PH _{PLCδ} EGFP das células PC12-wt e PC12-NCS-1 em presença de estímulo despolarizante com KCl.	100
Figura 20: Inibição pela atropina do deslocamento citoplasmático do domínio PH _{PLCδ} EGFP induzido por CCH.	102

-
- Figura 21: Curso temporal do deslocamento do domínio PH_{PLC δ} EGFP pelo U73122, um inibidor não seletivo da PLC nas células PC12-wt e PC12-NCS-1 estimuladas com CCH. 104
- Figura 21 *inset*: Máximo de fluorescência citoplasmática nas células submetidas ao estímulo com CCH na presença de U73122. 104
- Figura 22: Alterações na dinâmica do Ca²⁺ intracelular observadas nas células PC12-wt e PC12-NCS-1 marcadas com Fluo4 e estimuladas com CCH. 108
- Figura 23: Alterações na dinâmica temporal do Ca²⁺ intracelular observadas nas células PC12-wt e PC12-NCS-1 marcadas com Indo1 e estimuladas com CCH. 109
- Figura 24: Pico máximo da [Ca²⁺]_i verificado nas células PC12-wt e PC12-NCS-1 estimuladas com CCH. 110
- Figura 25: Dinâmica temporal das [Ca²⁺]_i das células PC12-wt e PC12-NCS-1 marcadas com Indo1 e estimuladas com CCH na ausência de Ca²⁺ extracelular. 111
- Figura 26: Dinâmica temporal de resposta do domínio PH_{PLC δ 1}-EGFP das células PC12-wt e PC12-NCS-1 submetidas ao estímulo com CCH na ausência do Ca²⁺ extracelular. 114
- Figura 27: Pico máximo de fluorescência do domínio PH_{PLC δ} -EGFP após estímulo das células PC12-wt e PC12-NCS-1 com CCH na ausência do Ca²⁺ extracelular. 115
- Figura 28: Inibição da dinâmica do domínio PH_{PLC δ 1}-EGFP observado nas células PC12-wt e PC12-NCS-1 pela ausência de Ca²⁺. 116

Figura 29: Inibição da dinâmica do domínio PH _{PLCδ1} -EGFP observado nas células PC12-wt e PC12-NCS-1 estimuladas com CCH na presença de antagonista dos estoques intracelulares de Ca ²⁺ sensíveis a InsP3.	117
Figura 30: Análise da fluorescência máxima do domínio PH _{PLCδ6} -EGFP induzido pelo CCH isoladamente após o bloqueio dos estoques intracelulares de Ca ²⁺ sensíveis a InsP3.	118
Figura 31: Liberação de glutamato por células PC12-wt e PC12-NCS-1 estimuladas com CCH.	124
Figura 32: Liberação de glutamato em células PC12-wt e PC12-NCS-1 permeabilizadas com digitonina.	125
Figura 33: Identificação da expressão endógena e distribuição espacial da proteína VGLUT2 nas células PC12-wt e PC12-NCS-1.	126
Figura 34: Identificação da proteína VGLUT2 presente no extrato total das células PC12-wt e PC12-NCS-1 através da técnica de <i>western blot</i> .	127
Figura 35: Identificação da proteína VGLUT2 em células PC12-wt e PC12-NCS-1 superexpressando a proteína VAMP-GFP.	128
Figura 36: Identificação da expressão e distribuição endógena das proteínas VGLUT2 e VMAT em células PC12-wt e PC12-NCS-1.	130
Figura 37: Liberação de glutamato por células PC12-wt e PC12-NCS-1 estimuladas com KCl.	132
Figura 38: Distribuição das vesículas originadas da endocitose constitutiva nas células PC12-wt e PC12-NCS-1.	135

Figura 39: Análise quantitativa da fluorescência presente nos neuritos e varicosidades das células PC12-wt e PC12-NCS-1.	136
Figura 40: Dinâmica do domínio PH _{PLCδ} EGFP em células PC12-wt e PC12-NCS-1 estimuladas com CCH na presença de um agente inibidor da enzima PI4K β .	139
Figura 41: Efeito da superexpressão da PI4K β no deslocamento do domínio PH _{PLCδ} EGFP em células PC12-NCS-1 e PC12-wt.	140
Figura 42: Hipótese Ca ²⁺ X NCS-1.	
Figura 43: Modelo proposto da interação funcional entre a proteína NCS-1 e os receptores muscarínicos.	154
	168

A proteína Neuronal Sensora de Cálcio-1 (NCS-1) pertence à superfamília de proteínas apresentando domínios EF-hand com afinidade ao Ca^{2+} . É expressa em neurônios e células neuroendócrinas onde modula a transmissão sináptica e plasticidade celular. Trabalhos descritos mostraram aumento da expressão da proteína NCS-1 no córtex pre-frontal de pacientes esquizofrênicos a partir de análises pós-morte sugerindo o envolvimento de NCS-1 nos mecanismos moleculares de regulação da transmissão dopaminérgica associados aos transtornos mentais. Entretanto, pouco se sabe a respeito da participação de NCS-1 na regulação da via de sinalização muscarínica. Neste trabalho foram verificados efeitos da superexpressão da NCS-1 em células PC12 (PC12-NCS-1) nos processos de liberação de glutamato, níveis de Ca^{2+} e dinâmica de fosfoinosítídeos provocados pela ativação da via muscarínica. Foi observado que o estímulo com carbacol (CCH) ($300\mu\text{M}$) induziu liberação de glutamato tanto nas células PC12 selvagens (PC12-wt) quanto nas células PC12-NCS-1. Entretanto a liberação de glutamato foi maior nas células PC12-NCS-1 em comparação às células PC12-wt respectivamente (14.4 ± 1.8 e 8.3 ± 0.9 nmol/mg de proteína). Níveis aumentados de glutamato liberado pelas células PC12-NCS-1 estimuladas com CCH foram observados tanto na presença quanto na ausência do influxo de Ca^{2+} . Além disso, níveis aumentados de InsP_3 ($663,0 \pm 63,0$ e $310,0 \pm 39,0$ % de fluorescência em U.A. \pm EPM) e na $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($766,35 \pm 35,0$ e $687,8 \pm 37,0$ em nM \pm EPM) foram observados nas células PC12-NCS-1 em comparação às células PC12-wt estimuladas com CCH ($300\mu\text{M}$) respectivamente. Padrões distintos na dinâmica intracelular de Ca^{2+} foram observados após o estímulo das células com CCH. Nas células PC12-NCS-1 foi observado um aumento na $[\text{Ca}^{2+}]_i$ seguido de um decaimento rápido. Nas células PC12-wt foi observado um decaimento lento na $[\text{Ca}^{2+}]_i$ característico de um platô. Tanto o aumento na formação de InsP_3 quanto na liberação de glutamato foram bloqueados pela atropina ($10\mu\text{M}$) nas células PC12-NCS-1 estimuladas com CCH. Esses resultados indicam que o aumento da expressão de NCS-1 nas células PC12 induz facilitação da dinâmica de formação de segundos mensageiros e da liberação de glutamato dependente da ativação muscarínica. Essas evidências sugerem que a proteína NCS-1 poderia estar envolvida na amplificação de processos adaptativos da sinalização muscarínica associados a patofisiologia dos transtornos neurais.

Neuronal calcium sensor-1 (NCS-1) belongs to the superfamily of EF-hand Ca^{2+} binding protein. It is expressed in neurons and neuroendocrine cells where it modulates synaptic transmission and plasticity. Finding of higher levels of NCS-1 in analyses pre-frontal cortex of *post-mortem* schizophrenic patients has been suggesting participation of NCS-1 in mechanisms of neuropsychiatric dysfunction (schizophrenia transtorn) by regulating dopaminergic transmission. However fewer are known about the involvement of NCS-1 in the muscarinic signaling. In this study it was verified the effect of NCS-1 overexpression in the pattern of glutamate release, intracellular Ca^{2+} levels and phosphoinositide dynamics evoked by a cholinergic agonist. Carbachol (CCH) (300 μM) evoked glutamate release from pheochromocytoma wild type cells (PC12-wt) and stable overexpressing NCS-1 (PC12-NCS-1). However it was more efficient to evoke glutamate release from PC12-NCS-1 compared with PC12-wt respectively (14.4 ± 1.8 and 8.3 ± 0.9 nmol/mg of protein). Increased glutamate release induced by CCH from PC12-NCS-1 was independent on extracellular Ca^{2+} influx. Additionally, a larger increase of cytoplasmic levels of InsP_3 (663.0 ± 63.0 and 310.0 ± 39.0 % of fluorescence in A.U.) and $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (766.35 ± 35.0 and 687.8 ± 37.0 in nmol/L) was observed after CCH (300 μM) stimulus of PC12-NCS-1 compared with PC12-wt respectively. Clearly distinction between intracellular Ca^{2+} dynamics was observed in PC12-NCS-1 and PC12-wt. A larger increase followed by fast decay of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was observed in PC12-NCS-1. A plateau with a delayed decay of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was characteristic of PC12-wt $[\text{Ca}^{2+}]_i$ response. Both enhancement of InsP_3 production and glutamate release observed in PC12-NCS-1 were blocked by atropine (10 μM). However at PC12-wt, glutamate release induced by CCH was not significantly blocked by atropine. Together, our data shows that higher expression of NCS-1 at PC12 cells induces an enhancement of second messenger dynamics and transmitter release dependent on muscarinic activation. These evidences suggest to the possible tuning position of NCS-1 on up-regulation of muscarinic signaling and its point to an important question of possible role of NCS-1 on adaptation of muscarinic pathway control associated with neuronal dysfunction.

1 INTRODUÇÃO

Os íons cálcio são considerados um dos mensageiros intracelulares mais versáteis e indispensáveis para o ajuste fino da atividade celular (Berridge e Bootman, 2000; Berridge, 2006). Tais íons poderiam receber o título de “maestro orquestrador” já que exercem papel de integração de diversas vias de sinalização celular (ver ilustração abaixo). Diferentes funções celulares que são finamente controladas pelo Ca^{2+} incluem processos como contração/relaxamento, excitabilidade, secreção-exocitose, regulação da atividade protéica, expressão gênica, plasticidade, memória e crescimento, desenvolvimento e morte celular (Berridge e Bootman, 2000; Sabatine e cols., 2002, Augustine e cols., 2003; Gomez e Zheng, 2006).

Diferentes funções neuronais são reguladas por alterações na concentração intracelular de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). A compreensão das vias de sinalização dependentes de Ca^{2+} em neurônios não só aumenta o conhecimento de aspectos básicos da regulação neuronal, mas também possibilita o esclarecimento das anormalidades da sinalização intracelular presentes em condições patológicas.

Para que cada uma de suas funções seja garantida de maneira específica é importante notar que os sinais e $[\text{Ca}^{2+}]_i$ são rigorosamente compartimentalizados em microdomínios e obedecem uma grande variação temporal, indo de frações de milisegundos a horas, dias e até mesmo semanas (Sabatini e Regehr, 1996). Canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem e/ou ligantes, bombas Ca^{2+} -ATPase, trocadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ e reservatórios intracelulares (como os retículos endoplasmático e nucleoplasmático, as mitocôndrias) compõem parte da maquinaria de controle da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ em condições basais, que variam de 10-100 nM e que, em condições de estímulo atingem níveis superiores (Lohman e Wong, 2005).

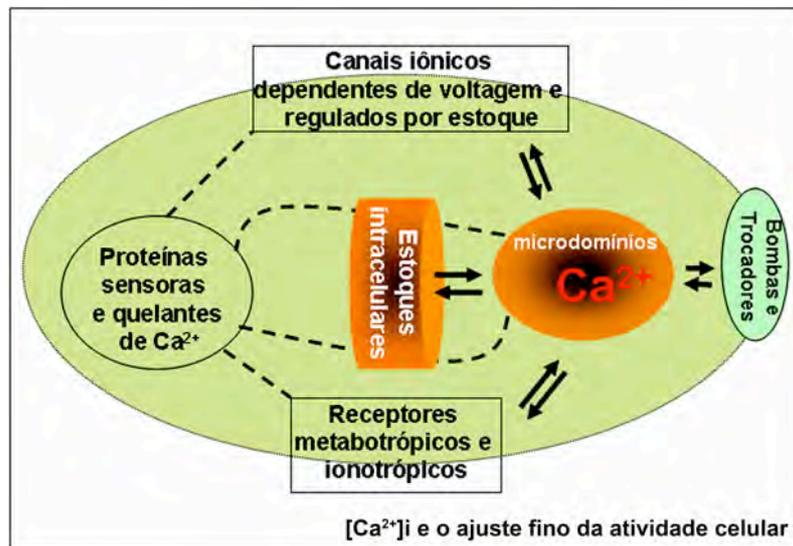


Figura 1: [Ca²⁺]_i e o ajuste fino da atividade celular.

Controle da [Ca²⁺]_i associado à diversidade de sinais intracelulares. Baixos níveis intracelulares de Ca²⁺ são controlados por receptores ionotrópicos, canais iônicos dependentes de voltagem, canais iônicos presentes nas membranas de estoques intracelulares (retículos endoplasmático, nucleoplasmático e mitocôndia), canais iônicos regulados pelo estoque (SOC) e bombas Ca²⁺-ATPases presentes na membranas.

Além dessa maquinaria de controle da dinâmica intracelular das $[Ca^{2+}]_i$, existe uma outra, capaz de detectar fina e precisamente, os diferentes níveis intracelulares de Ca^{2+} representada pelas proteínas ligantes de Ca^{2+} (**ver figura 1**). Tais proteínas apresentam estruturas com afinidades diferentes a este íon e por isso auxiliam na compartimentalização funcional do Ca^{2+} livre, já que interferem com sua concentração nos diferentes microdomínios (Burgoyne e cols., 2004). Assim, o processo de tradução espaço-temporal do sinal de Ca^{2+} em funções específicas se deve à interação molecular desse íon com proteínas denominadas ligantes de Ca^{2+} (*Ca²⁺ binding proteins* ou CBP) e/ou sensoras de cálcio (*Ca²⁺ sensor proteins*).

As primeiras, conhecidas como ligantes ou quelantes do Ca^{2+} intracelular compreendem proteínas como caldendrina (*caldendrin*), *calbindin*, parvalbumina e CBP 2, 3, 4 e 5, (Burgoyne e cols., 2004; Schawaller e cols., 2002; Mikhaylova, 2006). Já as proteínas sensoras de Ca^{2+} são capazes de responder a sinais específicos de Ca^{2+} , traduzindo esta variedade de sinais em diferentes funções neuronais (O'Callaghan e Burgoyne, 2003; Hilfiker, 2003; Burgoyne, 2007). Três características clássicas definem a propriedade peculiar destas proteínas em determinar a transdução seletiva de sinais intracelulares:

- 1- a afinidade a íons Ca^{2+} ;
- 2- a cinética;
- 3- a localização nos diferentes compartimentos intracelulares.

A sinaptotagmina I é um exemplo de proteína sensora de Ca^{2+} , que responde rapidamente a altas concentrações intracelulares de Ca^{2+} interferindo com a liberação de neurotransmissores (Koh e Bellen, 2003). A calmodulina é conhecida como arquétipo mais estudado entre as proteínas sensoras de Ca^{2+} , que ao ser ativada por esse íon

controla uma série de funções neuronais, como a de liberação de mediadores, processos de potenciação de longa duração (LTP), memória sináptica e comportamental (Chin e Means, 2000; Lisman e cols., 2002).

Uma grande família de proteínas sensoras de Ca^{2+} , presente principalmente em neurônios, é denominada “proteínas neuronais sensoras de Ca^{2+} ou proteínas NCS (*Neuronal Ca^{2+} Sensor*) (ver tabela I adiante). Esta família de proteínas é codificada por 14 genes no genoma humano (<http://www.liv.ac.uk/physiology/ncs/index.html>) e, em alguns casos, a diversidade ainda é maior, pela existência de processamento alternativo (*splices* variantes). Todos os grupos da família NCS apresentam quatro domínios EF-*hand*, um dos domínios mais descrito e que aparecem em, pelo menos, 83 tipos de proteínas sensoras de Ca^{2+} codificadas pelo genoma humano (Venter e cols., 2001). O domínio EF-*hand* consiste em uma estrutura hélice-alça-hélice (*helix-loop-helix*) formada por 29 aminoácidos, no qual seis destes, presentes na alça, estão envolvidos na ligação de alta afinidade para o Ca^{2+} (Burgoyne e Weiss, 2001). Além desta região, a maioria das proteínas NCS apresenta uma cauda miristoil formada por uma cadeia apolar de 14 carbonos adicionados, de forma pós-traducional, na porção N-terminal e que podem funcionar como verdadeiras âncoras de apoio às membranas (Zozulya e Stryer, 1992).

A recoverina foi a primeira proteína NCS a ser caracterizada. Ela é expressa especificamente em células fotossensíveis da retina e age especialmente impedindo a inativação da rodopsina regulando a transdução do estímulo luminoso em sinal elétrico (Palczewski e cols., 2000; Sallese e cols., 2000). Outros exemplos de proteínas NCS estão mostrados na tabela 1. Estas proteínas possuem afinidades em ordens submicromolares / micromolar para íons cálcio, e sofrem alterações conformacionais capazes de determinar a interação e regulação de diversas proteínas, além de alterações

na função fisiológica (Burgoyne e cols., 2004). A proteína NCS-1, foco principal do presente estudo, é uma integrante da família das proteínas NCS e será descrita estrutural e funcionalmente a seguir.

Tabela I: Proteínas pertencentes à família NCS

Proteínas pertencentes à família NCS	Expressão no cérebro ou retina	Presença do grupo miristoil na porção N-terminal
NCS-1	cérebro/retina	sim
Hipocalcina	cérebro	sim
Neurocalcina d	cérebro/retina	sim
VILIP-1	cérebro/retina	sim
VILIP-2	cérebro	sim
VILIP-3	cérebro	sim
Recoverina	retina	sim
GCAP1	retina	sim
GCAP2	retina	sim
GCAP3	retina	sim
KChIP1	cérebro	sim
KChIP2	cérebro	não
KChIP3	cérebro	não
KChIP4	cérebro	não

Abreviaturas: NCS-1 (*neuronal Ca²⁺ sensor-1*) ou proteína neuronal sensora de Ca²⁺, VILIP (*visinin-like protein*) ou proteína que interage com canais de K⁺ dependentes de voltagem, GCAP (*guanylyl-cyclase-activating protein*) ou proteína ativada por guanilato ciclase (ilustração modificada da revisão publicada por Burgoyne e cols., 2004).

A proteína NCS-1, originalmente denominada frequenina, foi caracterizada por meio de estudos com mutantes de *Drosophila sp* que a superexpressavam (Pongs e cols., 1993). Posteriormente, foi identificada também em *Xenopus sp*, *Caenorhabditis elegans* e em mamíferos (rato, macaco *Rhesus* e humanos), sendo nestes últimos encontrada, predominantemente, em tipos celulares neuronais e neuroendócrinos (Olafsson e cols., 1995; McFerran e cols., 1998; Koh e cols., 2003; Bai e cols., 2004; Negyessy e Goldman-Rakic, 2005).

Manipulações genéticas da frequenina em leveduras mostraram que esta é essencial à sobrevivência desses microorganismos (Hendricks e cols., 1999; Ames e cols., 2000). Em outros organismos como a *Dictyostelium discoideum*, o nocaute da NCS-1 provocou alterações na taxa de desenvolvimento desse animal; aboliu a formação dos canais semicirculares do ouvido interno em *zebrafish* e em *C. elegans* trouxe implicações negativas nos comportamentos de aprendizado e memória (Gomez e cols., 2001; Coukell e cols., 2004; Blasiolo e cols., 2005). Em mamíferos, embora o desenvolvimento e caracterização de camundongos nocaute para NCS-1 ainda esteja em fase experimental, sabe-se que a ausência de outras proteínas NCS, como hipocalcina, recoverina e KCHIP não foi letal à vida desses animais, mas interferiu com o desenvolvimento, transmissão de sinais e plasticidade neuronal dos mesmos (Howes e cols., 2002; Pennesi e cols., 2003; Kobayashi e cols., 2005; Sampath e cols., 2005; Burgoyne, 2007).

Estruturalmente, NCS-1 possui quatro motivos *EF-hand* (EF1-EF4), três dos quais (EF2-EF4) são capazes de interagir com Ca^{2+} . O domínio EF1 não interage devido à existência de uma substituição conservada no suposto sítio de ligação (ver ilustração II). A ligação do Ca^{2+} aos seus respectivos sítios segue cinética do tipo cooperativa permitindo a molécula responder conformacionalmente a concentrações intracelulares

de Ca^{2+} bastante pequenas da ordem de nM (Ames e cols., 1997; Hilfiker, 2003) (**ver figura 3**). NCS-1 também possui em seu domínio N-terminal uma cauda hidrofóbica miristoil, cuja função é permitir à molécula sua inserção nas membranas intracelulares e plasmática (**ver figura 2**). Vale ressaltar que a dinâmica observada da cauda miristoil da NCS-1 é diferente daquela de outras proteínas NCS (O'Callaghan e Burgoyne, 2003). Nestas, a cauda é exposta somente após interação com íons Ca^{2+} , o que não ocorre com NCS-1, uma vez que sua cauda miristoil é exposta constitutivamente (**ver figura 3**). Tal fato se deve à existência de resíduos de aminoácidos na cadeia N-terminal que fixam, estereoquimicamente, a cauda miristoil na posição exposta. De fato, a localização subcelular de NCS-1 é a rede de membranas *trans*-Golgi e a membrana plasmática, podendo ser encontrada também em vesículas intracelulares (O'Callaghan e cols., 2002). Isto permite que NCS-1 se ligue a membranas mesmo em ausência do íon cálcio (Hilfiker, 2003). E, além disso, permite também que esta proteína responda rapidamente a alterações na $[\text{Ca}^{2+}]_i$ próxima à membrana onde está inserida (Burgoyne, 2004). Quando NCS-1 se liga a íons Ca^{2+} é capaz de ativar outras proteínas, realizando, desta maneira, diversas funções que serão descritas com maiores detalhes a seguir.

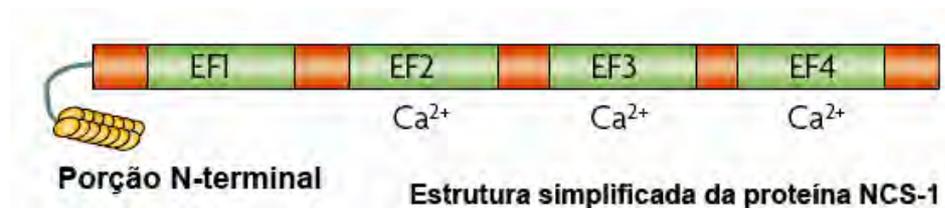


Figura 2: Estrutura simplificada da proteína NCS-1

A construção mostra os quatro domínios *EF-hand* (EF1-EF4). Três dos quais (EF2-EF4) são capazes de interagir com Ca^{2+} . O domínio EF1 não se liga ao Ca^{2+} . Na porção N-terminal da proteína fica posicionada a cauda hidrofóbica miristoil (ilustração modificada da revisão publicada por Burgoyne e cols., 2004).

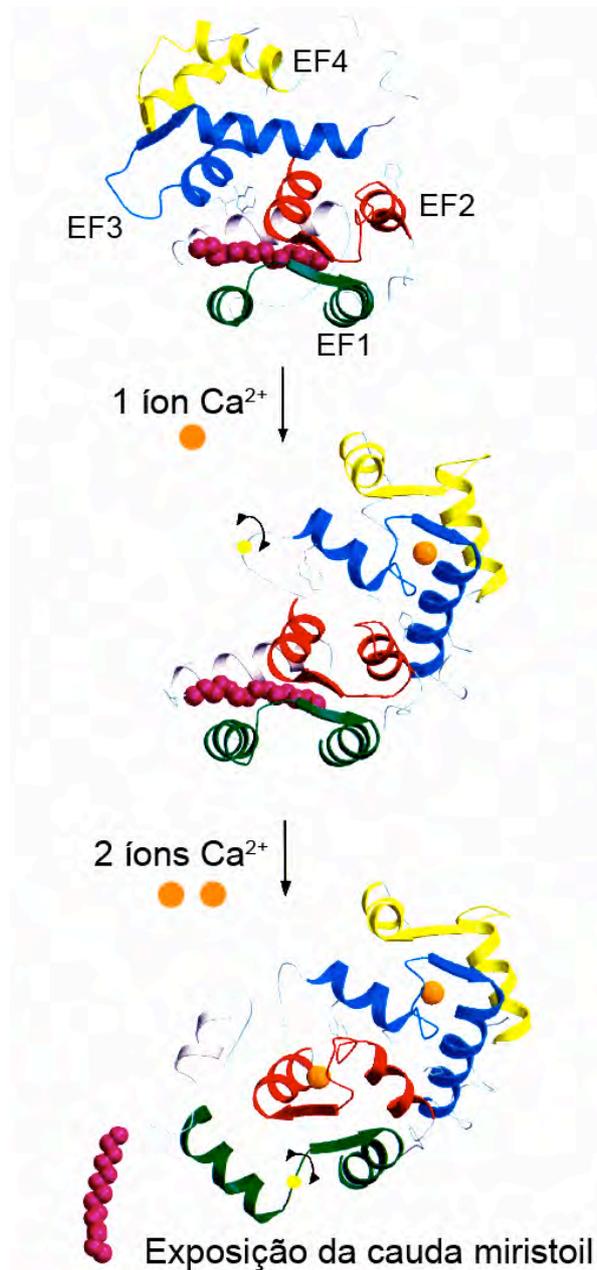


Figura 3: Exposição da cauda miristoil presente nas proteínas neuronais sensoras de Ca^{2+} após sua ligação a dois íons cálcio

Na ausência de Ca^{2+} a cauda miristoil se encontra próxima ao domínio EF1 (estrutura superior). Após ligação a, pelo menos, dois íons Ca^{2+} a molécula sofre uma alteração conformacional expondo sua cauda hidrofóbica (estrutura inferior). Esse processo (*Ca²⁺ myristoyl switch*) é característico da maioria das proteínas NCS. No caso da proteína NCS-1, independente da ligação ao Ca^{2+} , apresenta seu grupamento miristoil exposto. (Ilustração modificada foi obtida em Ames e cols., 2002).

O entendimento do papel multifuncional da proteína NCS-1 teve início através dos estudos de frequenina em *D. melanogaster*, cuja superexpressão resultou em aumento da facilitação da neurotransmissão e por esse efeito foi sugerido por Zucker em 2003, como proteína capaz de despertar sinapses latentes. Em outros modelos, incluindo células cromafins da adrenal e PC12, foi demonstrada a participação de NCS-1 no aumento da liberação de mediadores químicos e neurotransmissores (Pongs e cols., 1993; McFerran e cols., 1998; Burgoyne e Weiss, 2001; Hilfiker, 2003; Kapp-Barnea e cols., 2003).

Outras funções desempenhadas por NCS-1 incluem a regulação da atividade de canais de Ca^{2+} e K^{+} dependentes de voltagem, ativação da calmodulina, calcineurina, óxido nítrico (NO) sintase e inibição da guanilato ciclase (GC) em experimentos realizados *in vitro*, dessensibilização dos receptores de dopamina do tipo 2 (D2R), ativação *in vitro* e *in vivo* da fosfatidilinositol 4-cinase- β do tipo III (PI4K β), tráfego de membranas e canais de K^{+} dependentes de voltagem (Nef e cols., 1995; Schaad e cols., 1996; Weiss e cols., 2000; Zhao e cols., 2001; Nakamura e cols., 2001; Guo e cols., 2002; Kabbani e cols., 2002; Tsujimoto e cols., 2002; Haynes e cols., 2005).

Um dos aspectos de grande relevância do estudo funcional de NCS-1 é sua capacidade de interagir estruturalmente com uma série de proteínas (**ver tabela 2**). Tais interações da proteína NCS-1 com diferentes alvos podem envolver regiões distintas de NCS-1 e algumas dessas interações estruturais podem ocorrer de maneira independente de sua ligação ao Ca^{2+} (Kabbani e cols., 2002; Bahi e cols., 2003; Haynes e cols., 2006). Algumas dessas interações incluem as proteínas PI4K β , cinase de receptores acoplados à proteína G tipo 2 (GRK2), D2R e canais iônicos conhecidos como *transient receptor potential channel type 5* (TRPC5) dentre outras (**ver tabela 2**) (Zhao e cols., 2001; Kabbani e cols., 2002; Haynes e cols., 2005; Hui e cols., 2006). Experimentos

realizados em leveduras e em células de mamíferos mostraram que a interação física direta entre NCS-1 e a enzima PI4K β foi capaz de aumentar a atividade desta última levando ao aumento da formação de fosfoinositóis de membrana os quais estariam implicados com o tráfego de membranas e exocitose de vesículas sinápticas (Hendricks e cols., 1999; Zhao e cols., 2001; Koizumi e cols., 2002; Hilfiker, 2003; Haynes e cols., 2005).

Tabela II: Interações proteína-proteína descritas para NCS-1

Proteínas que interagem estruturalmente com NCS-1	Dependência de íons Ca ²⁺
AP1	Sim
ARF1	Sim
PI4K β tipo III	Sim
CAPS	Sim
D2R	Sim
GRK2	Não
IL1RAPL	Não
Kv4.2	Não
Calcineurina	Sim
PDE	Sim
InsP3R	Não
TPRC5	Sim
TGF β R1	Sim
AP2	Sim

A tabela resume as interações proteína-proteína já descritas para NCS-1 e indica se essas interações ocorrem de forma Ca²⁺ dependente ou Ca²⁺ independente. Abreviaturas: AP1, proteína adaptadora-1 de clatrina; AP2, proteína adaptadora-2 de clatrina; ARF1; ADP, fator de ribosilação-1; CAPS, proteína ativadora de secreção dependente de Ca²⁺; D2R, receptor de dopamina do tipo 2; GRK2, cinase-2 de receptor acoplado a proteína G; IL1RAPL, proteína semelhante à proteína associada ao receptor de interleucina-1; InsP3R, receptor de inositol trifosfato; Kv4.2, canal de potássio dependente de voltagem-subunidade 4.2; PDE, fosfodiesterase de nucleotídeo cíclico; PI4K β , fosfatidilinositol 4-cinase- β ; TGF β R1, type I receptor do tipo 1 de transformação do fator- β de crescimento; TRPC5, receptor de potencial transitório canônico do tipo 5 (Nakamura, 2001; Zhao e cols., 2001; Guo, 2002; Kabbani e cols., 2002; Haynes e cols., 2005; Haynes e cols., 2006, Hui e cols., 2006; Schlecker e cols., 2006) (tabela modificada do artigo de revisão Burgoyne, 2007).

Diante de inúmeras funções reguladas por NCS-1 já descritas anteriormente, ainda não foi estabelecido um modelo capaz de definir o papel central de NCS-1 nas diferentes vias de sinalizações e nos processos de facilitação da liberação de mediadores acoplados a estas. Uma relevante via de sinalização que sofre interferência direta de NCS-1 é a via dopaminérgica. Nesta, NCS-1 é sugerida como um componente crítico de amplificação do sinal dopaminérgico (Kabbani e cols., 2002). Experimentos de co-imunoprecipitação em neurônios estriatais revelaram que NCS-1 foi capaz de impedir a dessensibilização de D2R deixando-os mais expostos na membrana plasmática por meio da inibição de GRK2 (Kabbani e cols., 2002). Em 2005, Negyessy e Goldman-Rakic, utilizando técnicas de imunohistoquímica com microscopia eletrônica, identificaram a coexistência de NCS-1 e receptores DR2 em estruturas pré e pós-sinápticas presentes no córtex pré-frontal de macacos rhesus adultos (*Macaca mulatta*). Curiosamente, experimentos realizados a partir de amostras de córtex pré-frontal dorsolateral de pacientes, *post-mortem*, com esquizofrenia e transtorno bipolar identificaram níveis estatisticamente elevados de NCS-1 em comparação aos indivíduos controle (Koh e cols., 2003; Bai e cols., 2004). NCS-1 não só está envolvida na regulação da via dopaminérgica; mas, através desta, poderia estar implicada nos mecanismos fisiopatológicos de condições neuropsiquiátricas como na esquizofrenia e transtorno bipolar (revisado por Bai e cols., 2004; Braunewell, 2005; Souza e cols., 2006, Stone e cols., 2007).

Além da participação da proteína NCS-1 na sinalização dopaminérgica, outros estudos mostraram o seu envolvimento em mecanismos intracelulares associados à ativação de receptores tirosina-cinase e acoplados à proteína G. É o caso da sinalização mediada por GDNF e as vias purinérgica e bradicinérgica, respectivamente (Wang e cols., 2001; Koizume e cols., 2002; Kabbani e cols., 2002). No exemplo da via

purinérgica, NCS-1 parece potencializar a liberação de mediadores químicos induzida por ATP ou UTP através de uma maquinaria associada ao aumento do metabolismo de fosfoinositóis disparado pela ativação da enzima PI4K, uma vez que o uso de óxido de fenilarsino, inibidor desta enzima, levou ao bloqueio da excitose mediada por ATP/UTP (Koizume e cols., 2002; Rajebhosale e cols., 2003). No entanto, ainda não se conhecem os mecanismos que governam os distintos papéis funcionais de NCS-1 dentro de cada modelo celular e na transmissão de sinais. Faltam estudos que identifiquem e correlacionem cada uma das funções exercidas por NCS-1 associadas às diferentes vias de sinalização intracelulares.

Neste trabalho, foi investigado, em modelo celular de superexpressão da NCS-1, como esta proteína estaria envolvida em aspectos da via sinalizatória dependente da atividade colinérgica. Ainda não foram descritos trabalhos mostrando o envolvimento direto de NCS-1, particularmente, na via de sinalização colinérgica. No entanto, essa hipótese, tem fundamento em algumas evidências descritas a seguir, que apontam a NCS-1 como possível participante da regulação da via colinérgica.

Uma das regiões cerebrais onde a transmissão colinérgica está presente, correlacionando-se a aspectos cognitivos, aprendizado e memória é o hipocampo (House e cols., 1999; Levey e cols., 2001; Porter e cols., 2002; Power e cols., 2003; Willets e cols., 2004; Hasselmo e cols., 2006). Sabe-se que NCS-1 foi descrita em neurônios hipocámpais de rato e sugerida como proteína modulatória da plasticidade sináptica de curta duração (conhecida pelo termo *short-term plasticity*) (Sippy e cols., 2003). Nesse modelo a superexpressão de NCS-1 mudou a eficiência sináptica associada ao disparo de pulso elétrico pareado (*paired-pulse*) de um perfil depressor para facilitador (Sippy e cols., 2003).

Experimentos comportamentais realizados em *C. elegans* mostraram que diferenças na expressão de NCS-1 foram capazes de interferir com funções mais complexas como aprendizado e memória (Gomez e cols., 2001, Dahl e cols., 2005). Além disso, os estudos de fatores epigenéticos e variações genótípicas (SNPs) de NCS-1 em humanos têm sugerido o envolvimento desta proteína na fisiopatologia da esquizofrenia, retardo mental, transtorno bipolar e comportamento de vício (*addiction*) e abstinência (Bahi e cols., 2003; Koh e cols., 2003; Bai e cols., 2004). Embora os mecanismos que expliquem a participação de NCS-1 em cada um desses processos ainda não estejam elucidados é possível relacioná-los a alterações na via de sinalização colinérgica.

Sabe-se que os mecanismos fisiopatológicos das doenças de Alzheimer, esquizofrenia, transtorno bipolar e outras demências têm sido associados às alterações de algumas vias de sinalização, em especial a transmissão colinérgica (Bartus e cols., 1982; Martin e Bruno, 1998; Bartus e cols., 1999; Shiozaki e cols., 2001; Isacson e cols., 2002; Elizabeth e cols., 2007). Ao mesmo tempo, uma série de proteínas NCS tem sido propostas como elementos chave capazes de desempenhar papéis importantes para a compreensão dos mecanismos de transtornos neuropsiquiátricos (revisado por Bai e cols., 2004; Braunewell, 2005; Souza e cols., 2006, Blazejczyk e cols., 2006). Daí a importância do entendimento e caracterização das vias sinalizatórias susceptíveis a alterações funcionais e adaptativas associadas à ativação e/ou superexpressão de NCS-1, uma vez que esta vem sendo descrita como possível participante dos mecanismos fisiopatológicos de doenças neuropsiquiátricas.

Neste trabalho foram analisados diferentes parâmetros que podem estar intrinsicamente correlacionados e integrados à regulação por NCS-1. Diante das evidências encontradas na literatura confirmando a interação e ativação de PI4K β por

NCS-1 e o aumento de níveis de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂), neste estudo, buscou-se aliar o processo de quebra/produção de PIP₂ e inositol 1,4,5 trifosfato (InsP₃) respectivamente, à dinâmica intracelular de Ca²⁺ e liberação de mediadores químicos (nesse caso, o glutamato) utilizando como modelo células PC12 selvagens (PC12-wt) e células PC12 superexpressando estavelmente a proteína NCS-1 (células PC12-NCS-1).

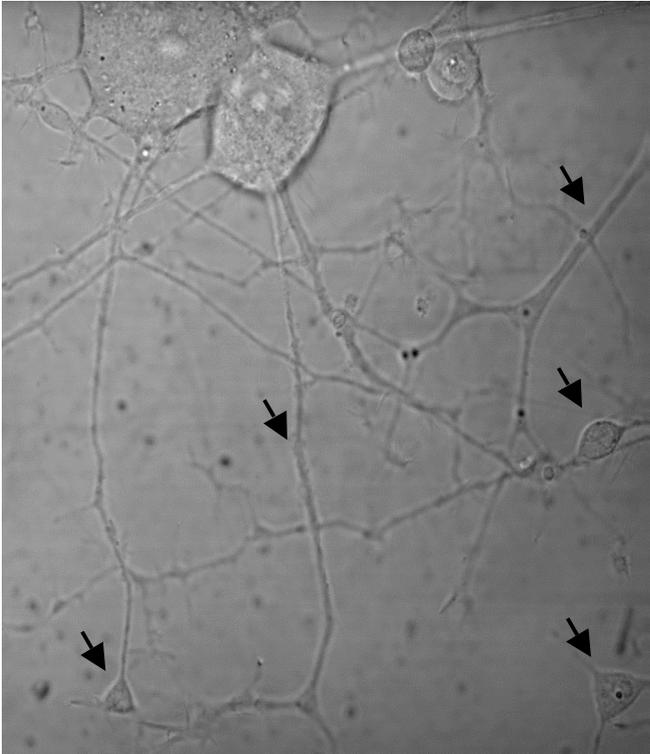
Diversos estudos a respeito de sinalização celular mediada por receptores acoplados a proteína G (GPCR), assim como os mecanismos de liberação de neurotransmissores, têm sido realizados em uma linhagem clonal originada do tumor de células cromafins da adrenal (ou feocromocitoma) de ratos, conhecidas como células PC12 (Greene e Tischler, 1976 e 1982; Klenchin e cols., 1998). Estas, quando diferenciadas com fator de crescimento neuronal (NGF), desenvolvem neuritos e varicosidades além da maquinaria molecular necessária aos mecanismos de transmissão de sinais e liberação de mediadores químicos. Nestas condições podem ser denominadas de células PC12 com fenótipo conhecido como *neuron like* (Greene e Tischler, 1976; Dichter e cols., 1977; Tischler e Greene, 1980; Jumblatt e Tischler, 1982, Martin e Grishanin, 2003; Monterrat e cols., 2007). Expressam proteínas próprias de um neurônio clássico como complexo SNARE (syntaxina1, SNAP-25), sinaptotagmina, canais de Ca²⁺, Na⁺ e K⁺ dependentes de voltagem, receptores ionotrópicos como os nicotínicos, e GPCR como os receptores muscarínicos (**Patrick e Stallcup, 1977**; Jumblatt e Tischler, 1982; **Vicentini LM e cols., 1986**; Furukawa e cols., 1991, 1993 e 1994; Catterall 1999; Atlas, 2001; Jahn e cols., 2003; Taverna e cols., 2007).

Neste trabalho, para a análise dos processos de sinalização celular ativados pela via muscarínica foi realizada análise comparativa entre as células PC12-wt, expressando níveis endógenos da proteína NCS-1, e células PC12-NCS-1, modificadas geneticamente para expressar estavelmente níveis aumentados de NCS-1. A imagem de

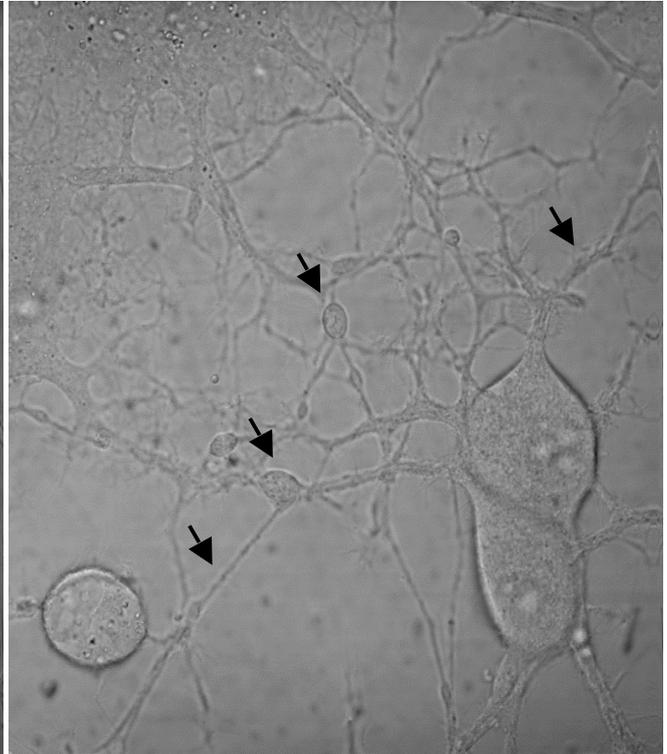
transmissão obtida por meio de microscopia confocal mostra a morfologia das células diferenciadas PC12-wt e PC12-NCS-1 (**figura 4**). Como indicado pelas setas, é possível observar nos dois tipos celulares, o desenvolvimento de neuritos e varicosidades característico do fenótipo “*neuron like*” de células PC12 submetidas à diferenciação com NGF-7S (**ver figura 4**).

A ativação da via muscarínica, neste modelo, foi obtida através a utilização do carbacol (CCH), agonista colinérgico eficaz para ativação de receptores muscarínicos acoplados à dinâmica de fosfoinosítídeos (**Vicentini LM e cols., 1986; Messing e cols., 1989**). Como mostra na **figura 5**, o CCH é capaz de induzir hidrólise/formação de PIP2/InsP3 através da ativação em seqüência de receptores muscarínicos, proteína G e enzima fosfolipase C (PLC). O InsP3 formado é capaz de agir nos receptores de InsP3 (InsP3R), mobilizar o Ca^{2+} do retículo endoplasmático; interferindo, dessa maneira com os níveis intracelulares de Ca^{2+} . Além de receptores InsP3R capazes de interferir com os níveis intracelulares de Ca^{2+} , as células PC12 também expressam canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (CCDV) e receptores de potencial transitório (TRP), que consistem basicamente em canais catiônicos não seletivos capazes de provocar o influxo de Ca^{2+} . Variações dos níveis de Ca^{2+} neste modelo é capaz de controlar a liberação de mediadores químicos. Dessa forma, os processos celulares regulados pela atividade muscarínicas escolhidos para análise comparativa entre as células PC12-wt e PC12-NCS-1 foram: i) hidrólise de PIP2 e formação de InsP3, ii) dinâmica e níveis intracelulares de Ca^{2+} , iii) liberação de mediadores químicos.

PC12-wt



PC12-NCS-1

**Figura 4: Morfologia de células PC12-wt e PC12-NCS-1 diferenciadas com NGF**

Antes da realização dos experimentos, as células PC12-wt e PC12-NCS-1 eram cultivadas durante sete dias na presença de NGF (100ng/mL) a fim de se diferenciarem e adquirirem fenótipo do tipo “*neuron-like*”. As setas pretas indicam a formação de neuritos e varicosidades nos dois tipos celulares após diferenciação.

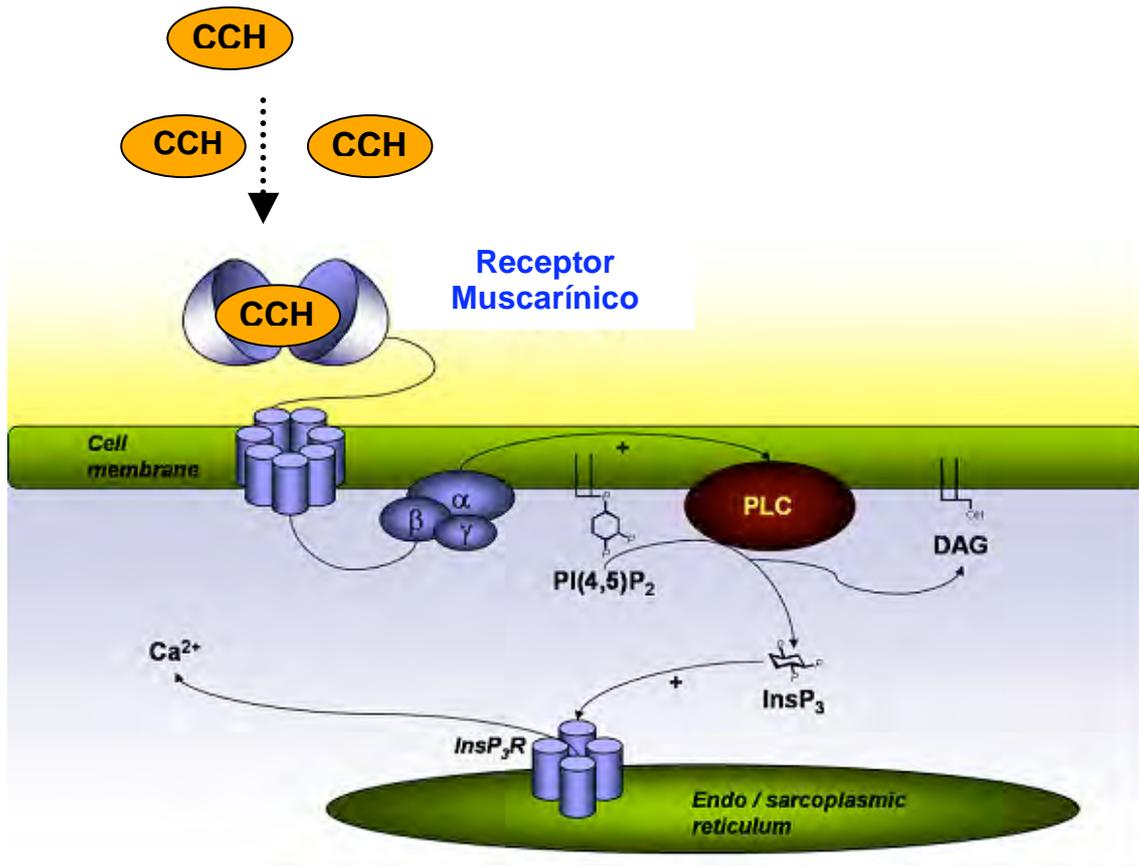


Figura 5: Via de sinalização muscarínica acoplada à dinâmica de hidrólise/formação de PIP₂/InsP₃:

Neste trabalho a via muscarínica foi ativada através do estímulo das células com CCH. Este é capaz de ativar receptores muscarínicos induzindo, conseqüentemente, à hidrólise de PIP₂ e formação de InsP₃ através da ativação da enzima PLC. Os estoques sensíveis a InsP₃ são ativados e o Ca²⁺ presente nos mesmos é mobilizado para o citoplasma. Variações nos níveis intracelulares de Ca²⁺ pode interferir, entre diversas funções neuronais, na regulação da liberação de mediadores químicos.

Abreviaturas: α, β, γ, subunidades da proteína G; PI(4,5)P₂, fosfatidilinositol bi-4,5-fosfato; InsP₃, inositol (1,4,5) trifosfato; PLC, fosfolipase C; InsP₃R, receptor de InsP₃; Ca²⁺, íons cálcio.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar o papel da superexpressão de NCS-1 na transmissão de sinais em células PC12 submetidas a estímulo muscarínico.

2.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Identificar diferenças no processo espaço-temporal de hidrólise/formação de PIP2 e InsP₃ respectivamente, entre as células PC12-wt e células PC12-NCS-1 estimuladas com carbacol (CCH).

-Verificar se os mecanismos de degradação/formação de PIP2 e InsP₃ respectivamente, induzido por CCH nos dois tipos celulares são dependentes da via de ativação muscarínica, PLC-β e ou PI4K; entrada do Ca²⁺ extracelular e/ou mobilização de Ca²⁺ de estoques intracelulares.

-Verificar alterações na dinâmica e nos níveis intracelulares de Ca²⁺ em células PC12-wt e PC12-NCS-1 submetidas ao estímulo com CCH.

- Comparar o padrão de liberação de glutamato entre as células PC12-wt e PC12-NCS-1 estimuladas com CCH e verificar a dependência da via de ativação muscarínica, entrada do Ca²⁺ extracelular e/ou mobilização do Ca²⁺ intracelular. Caracterizar origem da liberação de glutamato em células PC12.

-Verificar as possíveis diferenças no padrão de distribuição vesicular entre as células PC12-wt e PC12-NCS-1 e compará-las aos perfis de liberação de glutamato nos dois tipos celulares.

3 METODOLOGIA

A metodologia apresentada neste trabalho encontra-se sintetizada no **organograma 1**. Para a realização de todos os experimentos foram necessárias manutenção contínua da cultura, plaqueamento e diferenciação das células PC12-wt e PC12-NCS-1. Basicamente, as técnicas utilizadas consistiram em experimentos de detecção e análises fluorimétricas (**ver organograma 1**).

Para visualização da dinâmica de hidrólise/formação de PIP2/InsP3 em células isoladas foi utilizado marcador fluorescente apresentando alta afinidade por PIP2 e vinte vezes mais afinidade por InsP3. Esse biosensor consiste na construção plasmidial contendo região codificadora do domínio homólogo à plecstrina (“*pleckstrin homology*” ou PH) da proteína PLC δ em fusão com a seqüência codificadora da proteína fluorescente verde (GFP), também conhecido como domínio PH_{PLC δ} EGFP (Stauffer e cols., 1998; Varnai e Balla, 1998; Hirose e cols., 1999; Nash e cols., 2001; Nahorski e cols., 2003; Bartlett e cols., 2005). Dessa maneira foi possível visualizar, em tempo real e em células individualizadas expressando o domínio PH_{PLC δ} EGFP, a dinâmica de hidrólise/formação de PIP2/InsP3 após o estímulo das células com CCH. As células diferenciadas foram transfectadas transitoriamente com o domínio PH_{PLC δ} EGFP, acopladas a uma câmara de perfusão e submetidas à microscopia confocal.

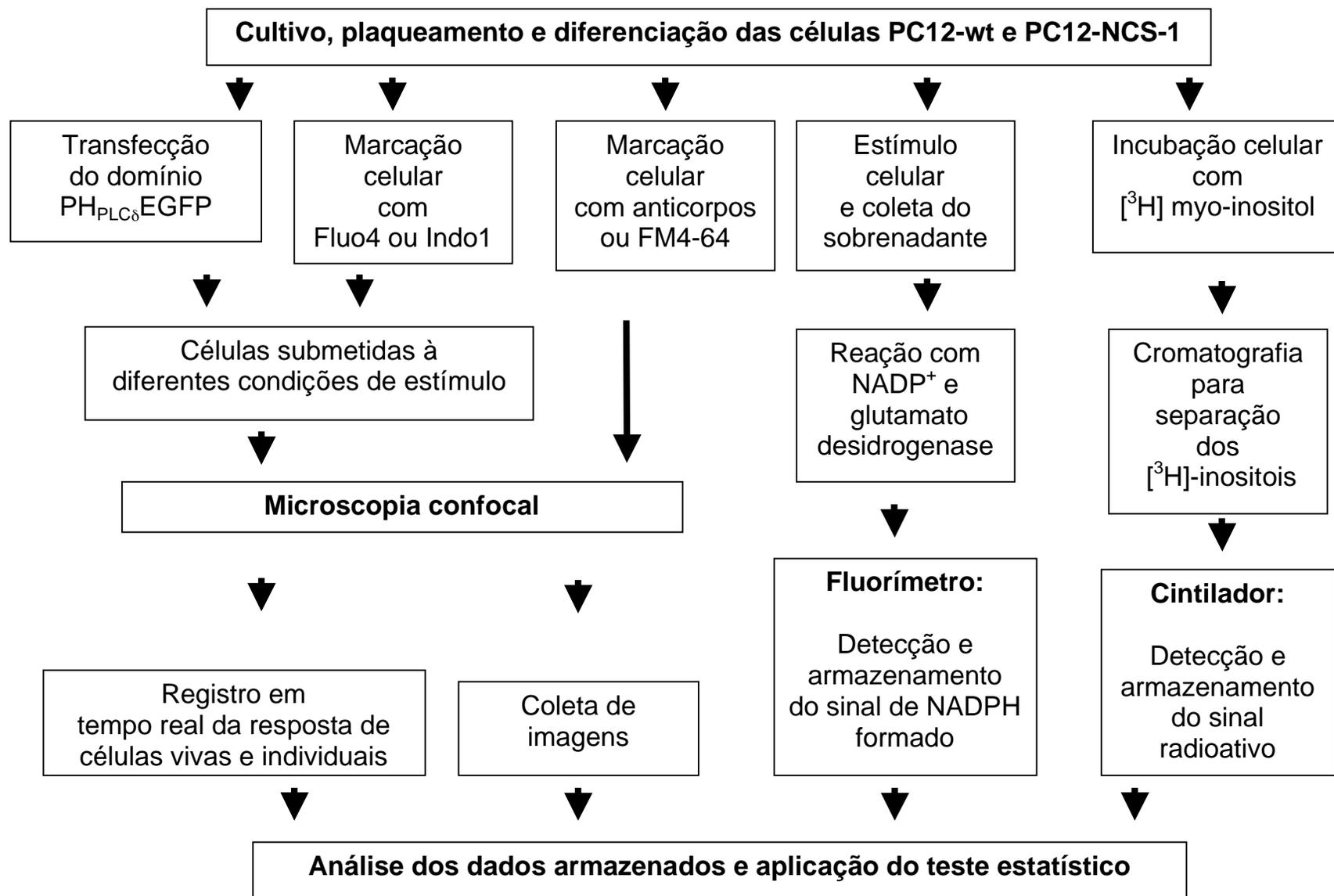
Para quantificação dos [3 H]-inositóis, as células foram incubadas com myo-[3 H]-inositol e o extrato celular contendo todas as frações de [3 H]-inositóis foi submetido a cromatografia em coluna de troca aniônica (Dowex1-X8). Os [3 H]-inositóis isolados foram quantificados por meio de espectrofluorímetro de cintilação líquida.

Os padrões e os níveis intracelulares de Ca $^{2+}$, provocados pela ativação das células PC12-wt e PC12-NCS-1 com CCH, foram acompanhados através da marcação

celular com fluoróforos específicos para Ca^{2+} (Fluo4 ou Indo1) e o registro dos sinais foram obtidos por meio de microscopia confocal.

Para os experimentos de liberação de glutamato foi realizada reação enzimática deste com o NADP^+ e glutamato desidrogenase. A fluorescência do NADPH, indicativo da presença de glutamato no sobrenadante celular, foi detectada por meio de fluorímetro.

Por fim, os experimentos de imunofluorescência e de marcação vesicular das células PC12 com FM4-64 foram analisados a partir da coleta de imagens por microscopia confocal. A seguir pode-se acompanhar a descrição detalhada de cada um dos procedimentos experimentais citados acima.



Organograma 1: Resumo esquemático dos procedimentos experimentais realizados neste trabalho.

3.1 Cultura celular

Células PC12-wt e PC12-NCS-1 foram gentilmente cedidas pelo Dr. Andreas Jeromin (Center for Learning and Memory, Univ. Texas, USA). Ambas células PC12-wt e PC12-NCS-1 foram mantidas em meio de crescimento celular. A cada dois dias o meio era trocado e toda semana as células eram removidas para um novo frasco de cultivo estéril-75cm² (Sarsted-USA). A fim de garantir a expressão estável da proteína NCS-1 as células PC12-NCS-1 foram mantidas em meio de crescimento suplementado com 400µg/mL G418 (como descrito em Koizumi et al., 2002).

3.2 Plaqueamento Celular

Antes dos experimentos, as células foram soltas da placa com PBS/EDTA (5mL por frasco de 75cm²), centrifugadas à temperatura ambiente, durante 5min a 3000 rpm e ressuspendidas em meio de diferenciação sem NGF-7S. Posteriormente, foram contadas utilizando uma câmera de Neubauer (Boeco/Germany) e plaqueadas, para os experimentos de microscopia confocal, 10⁵ células em lamínulas de vidro-22mm (Corning/México) inseridas em placas de 35mm (Sarsted). Para os experimentos de myo-[³H]inositol radioativo e liberação de glutamato foram plaqueadas 2,5 x 10⁵ células por placa de 60mm. Após plaqueamento, as células eram cultivadas durante sete dias antes da realização dos experimentos na presença de meio de diferenciação celular contendo 100ng/mL de NGF-7S (**ver soluções**).

3.3 Transfecção transitória mediada por lipossoma

As células diferenciadas foram submetidas à transfecção transitória com 1µg de PH_{PLC δ 1}-EGFP plasmidial. A transfecção foi mediada por lipossoma usando o reagente Transfast[®] (Promega) na proporção de 1µg/3µl (plasmídeo/Transfast[®]) em meio DMEM

alta glicose sem reagentes adicionais. Após 48h de transfecção, tempo necessário para expressão máxima do domínio PH_{PLC δ 1}-EGFP, os experimentos foram realizados.

A transfecção das células PC12-wt e PC12-NCS-1 com plasmídeos contendo a sequência codificadora da sinaptobrevina (VAMP) em fusão à GFP (VAMP-GFP) seguiu o mesmo protocolo descrito anteriormente.

A co-transfecção transitória das células com os plasmídeos de expressão do domínio PH_{PLC δ} -EGFP da proteína fosfatidilinositol 4-cinase do tipo β (PI4K β) foi realizada, na razão de 0,5 μ g/1,5 μ g de DNA plasmidial respectivamente e 6 μ L de reagente Transfast[®] por placa. A quantidade três vezes maior do vetor da PI4K β em comparação ao vetor do domínio PH_{PLC δ 1}-EGFP foi escolhida a fim de garantir que toda célula transfectada com domínio PH_{PLC δ 1}-EGFP estivesse também transfectada com a PI4K β .

3.4 Plasmídeos

Os vetores contendo a sequência do domínio PH_{PLC δ 1}-EGFP, da enzima PI4K β e da proteína VAMP em fusão à GFP (VAMP-GFP) foram fornecidos, gentilmente, pelo Dr. A. Jeromin. A construção da sequência codificadora referente ao domínio PH_{PLC δ 1}- foi subclonado no vetor Alpha⁺-EGFP, descrito previamente segundo Crameri e colaboradores (1996) e Stauffer e colaboradores (1998). A construção do vetor pcDNA3 contendo a sequência codificadora da PI4K β humana (pcDNA3-PI4K β) foi gerada segundo protocolo descrito por Meyers e Cantley (1997) e Godi e colaboradores (1999).

3.5 Estímulo das células PC12-NCS-1 e PC12-wt expressando o domínio PH_{PLC δ} EGFP

As lamínulas, contendo as células previamente transfectadas, foram fixadas a uma câmara de perfusão (com capacidade para 400 μ l) e acopladas ao microscópio confocal juntamente a um sistema de fluxo laminar (à 3mL/min) controlado por válvulas e mangueiras associadas a um reservatório contendo as soluções experimentais.

Após o fluxo contínuo da solução de perfusão (com/sem Ca²⁺) durante 2-3 minutos, as células eram submetidas a diferentes estímulos com as seguintes drogas teste diluídas no meio de perfusão (CCH, EGTA, CCH + EGTA, CCH + atropina, U73122, CCH + U73122, CCH + 2APB ou CCH + wortmanina como indicado nos resultados e gráficos específicos). Todos os experimentos de perfusão foram realizados à temperatura ambiente (20-25°C).

3.6 Coleta das imagens das células expressando o domínio PH_{PLC δ} EGFP

A câmara foi montada em um microscópio invertido (Zeiss Axiovert 100) com uma objetiva de imersão em água (40x, 1.2 NA), acoplada a um sistema de microscopia confocal a laser, Bio-Rad MRC 1024, através do “*software timecourse*” 1.0. Confocal.

As imagens das células expressando transitoriamente o domínio PH_{PLC δ} -EGFP foram obtidas pela excitação das mesmas a 488nm (a partir de um laser de argônio) e os sinais de emissão foram detectados com filtro de seleção de banda na faixa de 522/35nm. As imagens foram registradas a uma taxa de 1 Hz. Parâmetros referentes à coleta de imagens e dos registros de “time-course” como a potência do laser (10%), iris (3), ganho (1300) e contraste (-7) permaneceram constantes nos experimentos de *time-course*.

3.7 Cálculo da fluorescência citoplasmática do domínio PH_{PLC δ 1}-EGFP

Os registros de *time-course* de uma célula individual foram obtidos através da seleção de uma região de interesse (RI) no citoplasma da célula. Esta foi selecionada em áreas distantes do núcleo e da membrana celular a fim de se evitar erros em decorrência de movimentos do campo de registro durante o procedimento experimental. Os níveis qualitativos do domínio “PH_{PLC δ 1}” foram calculados, para cada célula, pela razão da intensidade de fluorescência referente à EGFP (F) sobre a fluorescência basal (F_0) expressa em porcentagem. Cada registro de F foi equivalente à média da intensidade de fluorescência dos *pixels* contidos na RI e F_0 foi obtido pela média da seleção de dez registros F antes do estímulo da célula. O método (F/F_0) foi usado para corrigir os fatores tais como concentração do marcador, intensidade da excitação e eficiência de detecção do registro (Koizumi et al., 1999; Bootman and Lipp, 1999). As curvas médias representativas, apresentadas na maioria dos gráficos, foram obtidas pelo cálculo da média da intensidade de fluorescência do domínio PH_{PLC δ 1}-EGFP (F/F_0 em % \pm EPM) de todas as células analisadas em, pelo menos, três experimentos independentes. Cada experimento foi realizado em duplicata ou triplicata.

3.8 Cálculo da fluorescência máxima citoplasmática do domínio PH_{PLC δ} -EGFP

Do registro normalizado de “*time-course*” (F/F_0 em %) mostrado na seção anterior, foi coletada a fluorescência citoplasmática máxima equivalente à translocação máxima do domínio PH_{PLC δ} -EGFP para o citoplasma após o estímulo com CCH (300 μ M). Assim, foi

calculada a média da fluorescência máxima (\pm EPM) de todas as células analisadas em, pelo menos, três experimentos independentes realizados em duplicatas ou triplicatas.

3.9 Cálculo da razão fluorescência da membrana/fluorescência citoplasmática do domínio PH_{PLC δ} -EGFP

O cálculo foi realizado com imagens das células, coletadas no tempo de fluorescência citoplasmática máxima do domínio PH_{PLC δ} -EGFP na presença de CCH. Estas imagens foram analisadas através da utilização do programa “Metamorph Image Analysis Program” (Universal Imaging - West Chester, PA, USA). Foram selecionadas regiões na periferia da célula (que incluem a membrana plasmática) e regiões no interior da célula (que incluem o citoplasma) para quantificação da intensidade média de fluorescência de cada uma dessas áreas. A razão foi calculada a partir da divisão entre média da intensidade de fluorescência do domínio PH_{PLC δ} EGFP presente na membrana plasmática (em unidades arbitrárias, U.A.) e a média da intensidade de fluorescência do domínio PH_{PLC δ} EGFP presente no citoplasma (em U.A.) \pm EPM. Diferenças foram consideradas estatísticas quando $p < 0,05$ utilizando o teste “*t student*” não pareado. Foram analisadas imagens distribuídas em, pelo menos, quatro experimentos independentes realizados em triplicatas.

3.10 Detecção dos níveis intracelulares de Ca²⁺ em células marcadas com Indo1

Células PC12-wt e PC12-NCS-1 plaqueadas na lamínula e diferenciadas foram incubadas, à temperatura ambiente, por 45min com solução de marcação Indo1-AM (ver

soluções). Para desesterificação, as células foram, em seguida, incubadas por mais 15min adicionais em meio HBSS contendo 1mM Ca^{2+} .

Para obtenção das imagens de fluorescência, as células marcadas, acopladas ao sistema de perfusão e microscopia confocal, foram excitadas a 351nm (laser de argônio). A emissão resultante foi coletada a 405 e 460 nm através de filtros separados por dois fotomultiplicadores.

As razões das fluorescências ($R=F_{405}/F_{460}$) dentro da RI selecionada no citoplasma celular foram usadas para calcular as $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de acordo com a equação descrita por Grynkiewicz e colaboradores (1985) e Bers e colaboradores (1995):

$$[\text{Ca}]_i = K_d * \beta[(R-R_{\min}) / (R_{\max} - R)],$$

onde

K_d *in vitro* do Indo = 250nM

Valor de β (razão da fluorescência de Indo-1 (livre/ligado) registrada a 485nm = 3.0

Cada experimento foi realizado em triplicata e repetidos, pelo menos, em cinco dias diferentes. Apenas as células responsivas foram submetidas à análise. O tratamento estatístico foi realizado utilizando o teste “*t-student*” não pareado. Os valores foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

3.11 Detecção qualitativa dos níveis intracelulares de Ca^{2+} com o marcador Fluo4

A marcação das células PC12-wt e PC12-NCS-1 com Fluo4 seguiu a mesma metodologia utilizada para Indo1-AM. Exceto que não foi necessária a adição de *Pluronic* ao meio de

incubação (**ver soluções**), já que as células PC12 incorporam o Fluo4-AM com muita facilidade. O comprimento de excitação utilizado foi de 488nm e a emissão do sinal foi detectado por um filtro de seleção de banda de 522/35nm. Foi calculada a média dos registros de “*time-course*” das células responsivas ao CCH. As curvas médias representativas foram obtidas pelo cálculo da média da intensidade de fluorescência do Fluo4 (F/F_o em % \pm EPM) de todas as células analisadas. As análises foram representativas de, pelo menos, cinco experimentos independentes.

3.12 Preparo de extrato protéico

Células PC12-wt e PC12-NCS-1 foram lavadas em PBS e, posteriormente, incubadas em tampão de lise 1 (**ver soluções**) durante 30 minutos no gelo, com intervalos para agitação de 10 minutos. O extrato foi centrifugado à 12000 g a 4°C por 20 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi coletado para dosagem de proteína.

3.13 Dosagem de proteína

Para a quantificação protéica foi utilizado o método descrito por Bradford (Bradford, 1976). Entre 0,2 e 1,0 μ L de extrato protéico foram adicionados a 1,0mL de solução de NaCl e 1,0mL de reagente de Bradford (**ver soluções**). Após a homogenização, incubou-se a mistura por 2 minutos a temperatura ambiente. Então, foram feitas as leituras das absorbâncias no espectrofotômetro (Kinetics/ Endpoint System Analyser - Hitachi) no comprimento de onda de 595nm. Em cada dosagem, uma curva de calibração com albumina bovina (1 a 10 μ g) foi utilizada.

3.14 Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS

Realizou-se eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante de acordo com Laemmli colaboradores (1970). Resumidamente, o gel foi preparado a partir das soluções do gel de separação e do gel de concentração (**ver soluções**). As amostras foram diluídas em tampão da amostra, aquecidas durante 5 min/100°C e 50µg homogenato protéico foram fracionados no gel presente em uma cuba contendo tampão de corrida. As condições de corrida utilizadas foram 100 volts, 4°C, durante 2-4 horas /aproximadamente em fonte Amersham/Bioscience EPS 3501-X0.

3.15 Immunoblots

O *western blot* foi realizado como descrito por Towbin e colaboradores (1979). Ao término da eletroforese, o gel foi lavado com tampão de transferência e montado no aparato adequado com papéis de filtro e uma membrana de nitrocelulose (Hybond, Amersham Biosciences). A transferência foi realizada a 24V, 80mA por 8-12 horas. Ao fim da transferência, a membrana foi corada com solução de Ponceau (**ver soluções**) por 3 minutos em agitação constante e descorada com água deionizada.

A membrana foi incubada por uma hora com solução de bloqueio. Em seguida, incubou-se as membranas por 2 horas com anticorpos primários. As membranas foram lavadas 3 vezes por 7 minutos em solução PBS-Tween (**ver soluções**) e incubadas por 1h, à temperatura ambiente, com os anticorpos secundários diluídos em PBS-Tween. A detecção

foi realizada pelo processo de quimioluminescência, utilizando o *kit* ECL™ (Amersham Biosciences/Germany). Após a sensibilização do filme de raio X (Kodak), este foi revelado com solução reveladora e fixadora (GBX, Kodak).

3.16 Imunofluorescência

As células PC12-NCS-1 e PC12-wt diferenciadas foram lavadas duas vezes com PBS a temperatura ambiente e fixadas durante 5 min com metanol (1mL por placa) a 4°C. Após a fixação, foram cuidadosamente lavadas duas vezes por 10 min com PBS a 4°C. As células foram, então, incubadas durante 20 min a temperatura ambiente em uma solução de bloqueio e permeabilização (300µL para cada lamínula) (ver soluções). Posteriormente foram lavadas duas vezes com PBS e incubadas a 4°C *overnight* (aproximadamente 12hs) com anticorpo primário diluído em solução PBS contendo 1% (p/v) BSA. Após marcação com o anticorpo primário foram lavadas quatro vezes por 5 min com solução PBS e incubadas em ambiente escuro com anticorpo secundário durante 1 hora à temperatura ambiente. Por fim, foram lavadas quatro vezes por 5 min com solução PBS e submetidas à microscopia confocal para aquisição das imagens.

3.17 Quantificação da liberação de glutamato em células PC12-wt e PC12-NCS-1

As células PC12-NCS-1 e PC12-wt plaqueadas ($2,5 \times 10^5$ células por placa de cultura de 60mm) e diferenciadas com NGF-7S foram incubadas por 15min a 37°C/5% CO₂ com as drogas teste (CCH, EGTA, CCH + EGTA, CCH + atropina conforme indicado nos resultados) em meio Krebs de incubação contendo 2mM CaCl₂.

A liberação de glutamato foi detectada pela medida do aumento da fluorescência resultante da produção de NADPH em presença do NADP⁺ e da glutamato desidrogenase,

através de ensaio fluorimétrico descrito por Nicholls e colaboradores (1987) e modificado por Romano-Silva e colaboradores (1993). Resumidamente, a 2,0 mL de sobrenadante contendo o glutamato liberado pelas células PC12 foi adicionado em uma cubeta e incubado com β -NADP (1mM) e 50 unidades de glutamato desidrogenase (EC1.4.1.3.).

A fluorescência à 360/450nm (excitação/emissão) foi quantificada através de um espectrofluorímetro “*Photon Technology International, Canadá*”. Depois da estabilização do sinal de fluorescência, 5 nmol de glutamato foi adicionado como padrão interno. Os dados foram expressos em nmol de glutamato por miligrama de proteína (Sigma-Stat, Jandel Corporation). Diferenças foram consideradas significativas para valores de $p < 0,05$ usando o teste “*t-student*” não pareado.

3.18 Detecção e quantificação das vesículas endocitóticas em células PC12-wt e PC12-NCS-1

As células PC12-wt e PC12-NCS-1, diferenciadas por 7 dias com NGF, foram marcadas em meio diferenciação contendo FM4-64 por 12h e posteriormente lavadas em meio de perfusão a fim de retirar o marcador presente na membrana plasmática (**versões**). A marcação com FM4-64 foi detectada através de microscopia confocal. O campo celular foi excitado com laser de argônio a 568nm e a fluorescência emitida foi coletada através do filtro HQ598nm. As imagens armazenadas foram analisadas através da utilização do programa “Metamorph Image Analysis Program” (Universal Imaging - West Chester, PA, USA) para quantificação da fluorescência emitida nos neuritos e varicosidades. Foram selecionadas RIs de tamanho constante (300 “pixels”) nos neuritos e varicosidade das células PC12-wt e PC12-NCS-1. Foi feita média dos níveis de fluorescência em todas as RIs selecionadas nos neuritos e varicosidade de células PC12-

NCS-1 (n: 131) e PC12-wt (n: 111). Os experimentos foram realizados em triplicatas em 2 dias diferentes.

3.19 Quantificação do inositol radioativo ($[^3\text{H}]\text{-InsP}_3$) em células PC12-wt e PC12-NCS-1 estimuladas com 300 μM CCH

As células PC12-NCS-1 e PC12-wt foram plaqueadas e diferenciadas (ver cultivo celular). Um dia antes do experimento as células PC12-wt e PC12-NCS-1 foram incubadas *overnight* com $[^3\text{H}]\text{-myo-inositol}$ (0,5 $\mu\text{Ci/placa}$) diluído em meio de crescimento. Posteriormente, as células foram estimuladas com CCH (300 μM) durante 5 minutos.

3.19.1 Extração dos inositois totais

Foram adicionados 2,7mL da solução de lise 2 (ver soluções) por cada placa (60mm) de cultura, transferência para tubos de hemólise e homogeneização dos mesmos por inversão (20 vezes). Posteriormente, adicionou-se 600 μL de água destilada-deionizada, 600 μL clorofórmio e centrifugação dos tubos por 5min a 3000 rpm. A fase aquosa (superior) contendo os inositois foi separada da fase lipídica e diluída com água destilada-deionizada (8 vezes).

3.19.2 Formação das resinas de troca aniônica e montagem das colunas

Foi adicionada resina Dowex-1(X8) (100g) em um béquer de 500mL. Adicionou-se solução de formatação (20mL). Agitou-se durante 2h à temperatura ambiente. Após

decantação da resina, retirou-se a solução de formatação e adicionou-se uma nova solução (20mL). Esse processo foi repetido duas vezes, deixando por fim, em agitação na solução de formatação durante 15h. A resina formatada foi então armazenada a 4°C em 20mL de solução de formatação. Minutos antes da montagem das colunas, a resina formatada foi lavada 3 vezes em solução formato de amônio e água destilada/deionizada de forma intercalada. As colunas foram montadas em pipetas de vidro (do tipo Pasteur) contendo uma pequena esfera de vidro para impedir a perda da resina. As colunas foram empacotadas com 1mL de resina formatada sob agitação constante em água destilada/deionizada, sempre com o cuidado de nunca deixar a resina entrar em contato com o ar.

3.19.3 Eluição das amostras

A fase aquosa obtida do processo de extração contendo os inositóis totais foi submetida à coluna de troca aniônica e eluída, primeiramente, com 25mL de água destilada/deionizada para retirada dos inositóis livres, com 21mL de solução de eluição 1 (ver soluções) para retirada dos ^3H -gliceroinositóis e, posteriormente, com 11mL das soluções de eluição 2-5 (ver soluções) a fim de isolar as seguintes frações na ordem indicada: [^3H]-InsP₁, [^3H]-InsP₂, [^3H]-InsP₃ e [^3H]-InsP₄. As frações referentes ao [^3H]-InsP₃ (alíquotas de 100µl) foram adicionadas à solução “Bray” modificada (Henriques e Gomez, 1975) e quantificadas por meio de espectrofluorímetro de cintilação líquida. Esse experimento foi realizado em, pelo menos, três dias diferentes. A análise estatística foi realizada utilizando o teste “*t*” de *student*.

4 RESULTADOS

Inúmeros trabalhos utilizaram as células PC12 como modelo de estudo funcional da proteína NCS-1 (Kabanni e cols., 2002; Koizume e cols., 2002, Taverna e cols., 2002; Barry e cols., 2006). As células PC12 são originadas do tumor da glândula adrenal (feocromocitoma). Tais células apresentam uma maquinaria de excitação regulada por Ca^{2+} , expressão endógena de proteínas do complexo SNARE, canais iônicos regulados por voltagem ou ligantes e GPCR tornando-as assim um bom modelo para estudos de sinalização e liberação de mediadores químicos (Lang e cols., 2001; Aoyagi e cols., 2005).

Neste trabalho, o estudo de sinalização celular regulada por níveis elevados de NCS-1 foi realizado utilizando-se células PC12 expressando estavelmente níveis aumentados de NCS-1 (PC12-NCS-1) e células PC12 selvagens (PC12-wt). Inicialmente, foram utilizadas técnicas da imunofluorescência e *immunoblot* a fim de caracterizar os níveis de expressão de NCS-1 presentes nos dois tipos celulares. A distribuição espacial de NCS-1 pode ser observada através da técnica de imunofluorescência na **figura 6**. A proteína encontra-se distribuída no citoplasma, membrana plasmática e, em maiores proporções nas regiões perinucleares. Nas células PC12-wt a marcação perinuclear é mais fraca indicando níveis menores de expressão da proteína NCS-1 nessas células (**figura 6**). Através da técnica de *western blot* do extrato total das células PC12-wt e PC12-NCS-1, fica evidente a diferença nos níveis de NCS-1 entre os dois tipos celulares (**figura 7**). As células PC12-NCS-1 apresentam níveis de expressão maiores da proteína NCS-1 em comparação às células PC12-wt (**figura 7**). As culturas celulares (PC12-NCS-1 e PC12-wt) utilizadas nos experimentos posteriores foram caracterizadas regularmente quanto aos

níveis de expressão da NCS-1 através da técnica de *immunoblot* a fim de garantir a proposta experimental estudada.

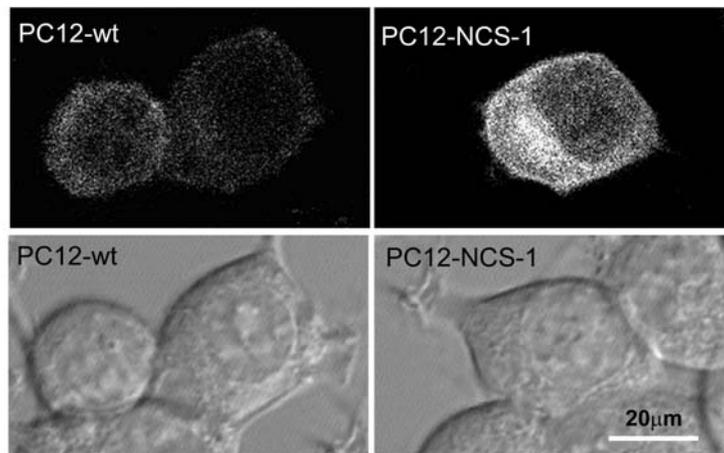


Figura 6: Distribuição espacial da proteína NCS-1 nas células PC12-wt e PC12-NCS-1 obtidas a partir da técnica de imunofluorescência.

As células plaqueadas e diferenciadas foram marcadas com anticorpo primário anti-NCS-1 (coelho) (1:700) e com anticorpo secundário anti-coelho-Alexa 488nm (1:500). As lamínulas contendo as células marcadas foram acopladas a um sistema de microscopia confocal e excitadas com um laser de argônio à 488nm. Imagens foram obtidas através da coleta da luz emitida por um filtro de seleção à 514/35nm (imagens dos painéis superiores) e através da luz de transmissão (imagens dos painéis inferiores). As imagens das células PC12-wt (à esquerda) e PC12-NCS-1 (direita) são representativas de, pelo menos, três experimentos independentes.

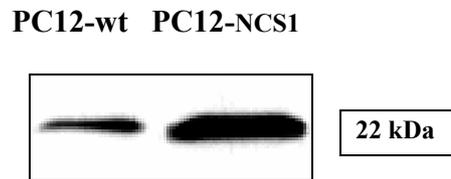


Figura 7: Expressão da proteína NCS-1 em células PC12-wt e PC12-NCS-1.

O extrato total das células PC12-wt e PC12-NCS-1 foi submetido às técnicas de eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS e *western blot* (ver métodos). Resumidamente, as membranas foram incubadas com anticorpo primário policlonais anti-frequenina (coelho) (1:5000) e, posteriormente, com anticorpo secundário anti-coelho conjugado à HRP (1:20000). A detecção das bandas foi obtida pelo processo de quimioluminescência, utilizando o “kit” ECL™.

Com a finalidade de investigar se as células PC12-wt e PC12-NCS-1 expressavam, endogenamente, elementos participantes da via de sinalização muscarínica, foi analisada a presença de proteínas como receptores muscarínicos e fosfolipase C (PLC). Os primeiros são proteínas essenciais uma vez que desencadeiam a ativação inicial da via muscarínica. Já a PLC é uma enzima que, após a ativação dos receptores muscarínicos, determina a hidrólise de PIP2 e formação de segundos mensageiros como diacilglicerol (DAG) e InsP3 (ver **figura 5**). A expressão endógena de receptores muscarínicos que poderiam estar associados à via de hidrólise/formação de PIP2/InsP3 nas células PC12-wt e PC12-NCS-1 foi analisada através das técnicas de *western blot* e imunofluorescência. A **figura 8** evidencia, através da técnica de imunofluorescência e obtenção das imagens por microscopia confocal, a presença dos receptores muscarínicos do tipo I (M1R) nas células PC12-wt e PC12-NCS-1. Uma vez que o anticorpo (anti-M1R) utilizado era específico para sítios internos no receptor, a técnica da imunofluorescência foi realizada em condições permeabilizantes (ver métodos). Nestas condições, os anticorpos anti-M1R foram capazes de atingir o meio intracelular definindo um padrão de distribuição espacial predominantemente vesiculado. Assim, diferentes níveis de reciclagem dos receptores muscarínicos nos dois tipos celulares analisados foram observados (**figura 8**).

O extrato protéico total das células diferenciadas foi separado em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes e, através da técnica de *western blot* (ver métodos), foi identificada uma banda de aproximadamente 80 kDa referente à expressão dos receptores muscarínicos M1R tanto nas células PC12-wt e PC12-NCS-1 (**figura 9**).

Sabendo que a via clássica de hidrólise/formação de PIP2/InsP3 via receptores muscarínicos (M1R e M3R) está acoplada, principalmente à ativação da PLC- β (revisado por Weernink e cols., 2006), verificou-se a expressão e distribuição espacial dessa

enzima nos dois tipos celulares. As **figuras 10 e 11** evidenciam, tanto nas células PC12-wt quanto nas células PC12-NCS-1, respectivamente, a expressão endógena da PLC- β pela técnica de imunofluorescência e de *western blot*. A distribuição espacial da PLC- β nas células PC12-wt e PC12-NCS-1 se restringe, preferencialmente, aos neuritos (**figura 10**).

Avaliou-se possíveis diferenças no padrão de distribuição de PLC- β nos neuritos dos dois tipos celulares. A quantificação da intensidade de fluorescência foi feita a partir da seleção de uma R.I. nos neuritos das células PC12-wt e PC12-NCS-1. Não foram observadas diferenças significativas na quantificação da PLC- β presentes nos neuritos das células PC12-wt e PC12-NCS-1 (**figura 12**).

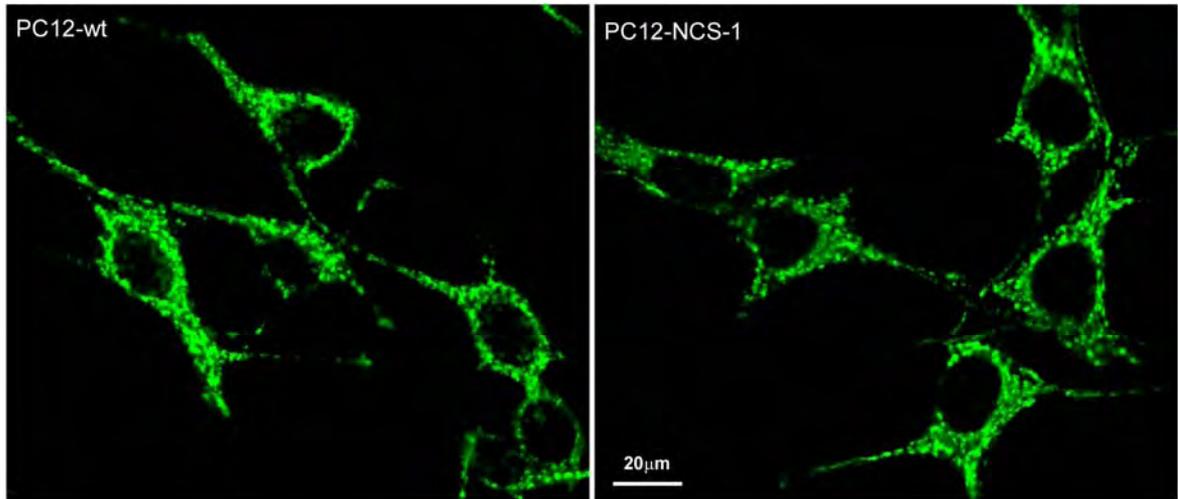


Figura 8: Expressão endógena do receptor muscarínico (M1R) nas células PC12-wt e PC12-NCS-1.

As células PC12-wt e PC12-NCS-1, submetidas à técnica de imunofluorescência em condições permeabilizantes (ver métodos), foram incubadas com anticorpo primário anti-M1R (cabra) (1:100) e com anticorpo secundário Alexa 488nm anti-cabra (1:200). As imagens foram obtidas através da microscopia confocal pela excitação das células à 488nm e coleta do sinal emitido por um filtro à 522/35. As imagens são representativas de, pelo menos, três experimentos independentes.

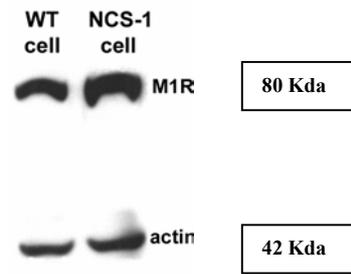


Figura 9: Expressão endógena do receptor muscarínico (M1R) e actina presente no extrato total das células PC12-wt e PC12-NCS-1 não diferenciadas.

O extrato total das células PC12-wt e PC12-NCS-1 foi submetido às técnicas de eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS e *western blot* (ver métodos). Resumidamente, as membranas foram reveladas com os anticorpos primários anti- M1R (cabra) (1:100) e anti-actina (camundongo) (1:1000) e com os anticorpos secundários anti-cabra conjugado à peroxidase (1:2000) e anti-camundongo conjugado à HRP (1:15000). A detecção das bandas foi obtida pelo processo de quimioluminescência, utilizando o “kit” ECLTM. O mesmo experimento foi repetido utilizando o extrato total de três diferentes lotes das células PC12-wt e PC12-NCS-1.

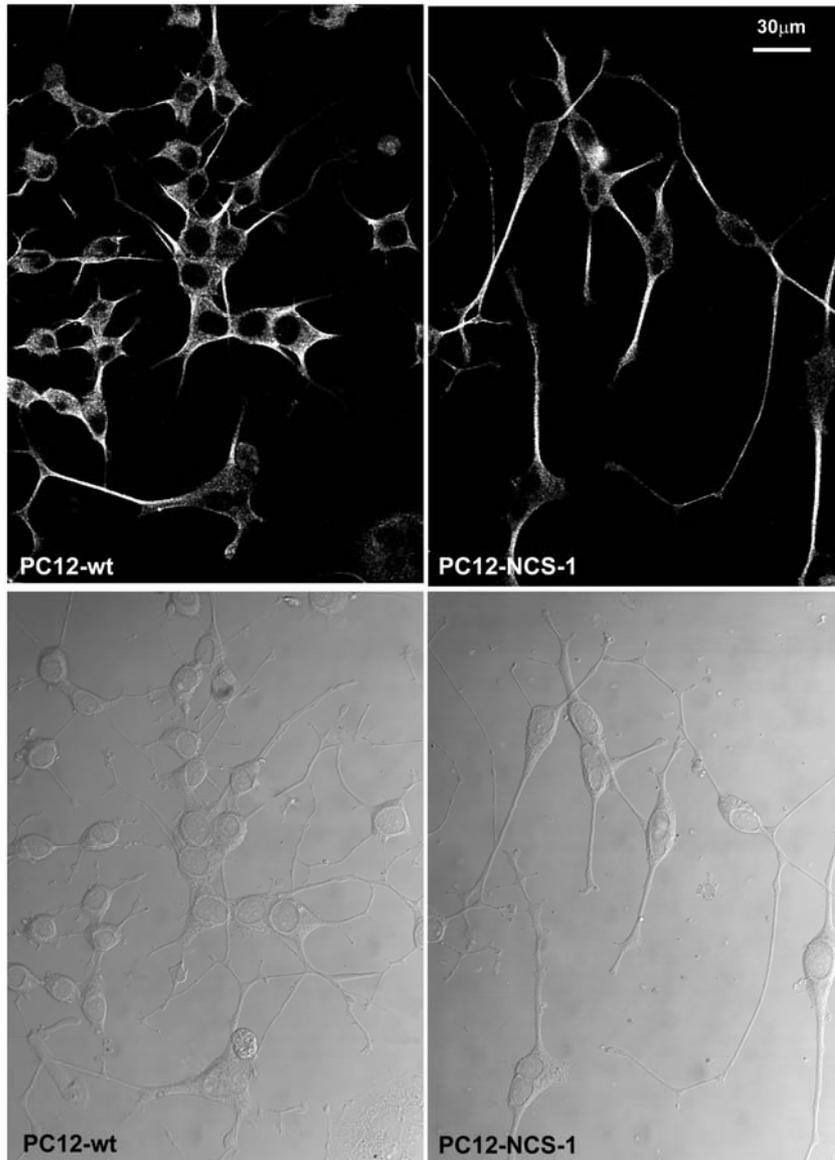


Figura 10: Distribuição espacial da proteína PLC- β 1 nas células PC12-wt e PC12-NCS-1.

As células foram incubadas com anticorpo primário anti- PLC- β 1 (coelho) (1:200) e com anticorpo secundário anti-coelho-Alexa 488nm (1:500). Imagens obtidas através da microscopia confocal a partir da excitação, à 488nm, do campo celular. A luz emitida foi coletada por um filtro à 522/35nm. Painéis inferiores mostram as imagens de luz transmitida.



Figura 11: Expressão endógena da proteína PLC- β nas células PC12-wt e PC12-NCS-1.

O extrato total das células PC12-wt e PC12-NCS-1 não diferenciadas e diferenciadas (dif.) foi submetido às técnicas de eletroforese em gel desnaturante e *western blot* (ver métodos). Resumidamente, as membranas foram reveladas com os anticorpos primários policlonais (coelho) anti-PLC β (1:500) e anticorpos secundários anti-coelho conjugado à HRP (1:20000). A detecção das bandas foi obtida pelo processo de quimioluminescência, utilizando o “*kit*” ECLTM. O resultado apresentado acima é representativo de, pelo menos, três experimentos independentes.

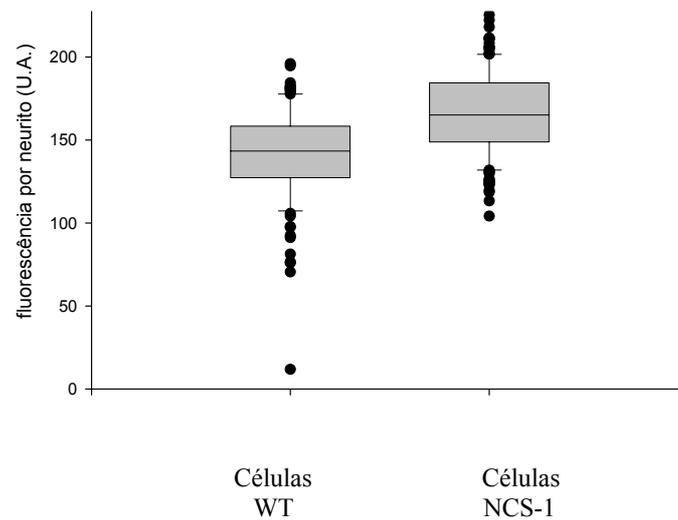


Figura 12: Quantificação da média da intensidade de fluorescência referente à presença da PLC- β 1 nos neuritos das células PC12-wt e PC12-NCS-1.

As imagens obtidas através da microscopia confocal foram analisadas através do programa “Metamorph Image Analysis Program” (Universal Imaging - West Chester, PA, USA). A análise das imagens foi realizada a partir da seleção de regiões de interesse de tamanho constante (300 *pixels*) nos neuritos das células PC12-wt e PC12-NCS-1. As barras indicam a mediana referente à fluorescência (em U.A.) da R.I. selecionada no neurito das células analisadas. A mediana é representativa das células analisadas em experimentos realizados em, pelo menos, três dias independentes. Não foi encontrada diferença significativa.

Trabalhos anteriores demonstraram a participação de NCS-1 em diferentes vias sinalizatórias, como por exemplo, nas vias dopaminérgica e purinérgica. Estes trabalhos mostraram que NCS-1 foi capaz de induzir aumento da liberação de mediadores químicos como dopamina e hormônio de crescimento, alterar o estado de fosforilação dos receptores dopaminérgicos e interferir com índices de formação de [³H]-PIP2, [³H]-PI(4)P (Koizume e cols., 2002; Kabbani e cols., 2002; Gromada e cols., 2005).

Neste trabalho, a investigação funcional de NCS-1 em células PC12, foi caracterizada, basicamente, pela exploração de alterações na sinalização celular dependentes do estímulo da via colinérgica. Os parâmetros da sinalização avaliados foram i) dinâmica de hidrólise/formação de PIP2/InsP3; ii) perfis intracelulares de Ca²⁺; iii) níveis de liberação de mediadores químicos.

A interferência dos altos níveis de expressão de NCS-1 na dinâmica de hidrólise/formação de PIP2/InsP3 induzidos pelo estímulo colinérgico foi avaliada utilizando método que permite a observação da dinâmica intracelular desses fosfoinosítois em células vivas e em tempo real. Para isso, células PC12-wt e PC12-NCS-1 foram transfectadas com plasmídeo contendo inserto codificador do domínio PH_{PLC δ} EGFP (**ver métodos**) e submetidas a estímulo com CCH (300 μ M). Foram observadas diferenças na intensidade de fluorescência e no perfil de deslocamento do domínio PH_{PLC δ} EGFP entre as células PC12-wt e PC12-NCS-1 (**figuras 13 e 14**). Na **figura 13**, é possível observar a distribuição antes e depois do estímulo com CCH (300 μ M) nos dois tipos celulares. Antes do estímulo, o domínio PH_{PLC δ} EGFP se encontra, predominantemente, distribuído na membrana plasmática (**figura 13**). Sabendo

que as células sofreram diferenciação com NGF (100 μ g/mL) durante 7 dias, nota-se que a distribuição, apesar de ser restrita à membrana plasmática, tende a se acumular mais nos neuritos (**figura 13**). Depois do estímulo com CCH (300 μ M), uma maior proporção do domínio PH_{PLC δ} EGFP das células PC12-NCS-1 encontra-se no citoplasma (**figura 13-painel direito-abaxo**). Nas células PC12-wt sob as mesmas condições de estímulo, o domínio PH_{PLC δ} EGFP encontra-se parte no citoplasma e parte na membrana plasmática (**figura 13-painel esquerdo-abaxo**).

A dinâmica de resposta do domínio PH_{PLC δ} EGFP ao estímulo com CCH (300 μ M) ao longo do tempo experimental foi registrada através da marcação de uma região de interesse (R.I.) no citoplasma das células PC12-wt e PC12-NCS-1. Dentro da R.I., as variações de fluorescência ao longo do tempo (*time course*) foram analisadas para construção da curva temporal de resposta do domínio PH_{PLC δ} EGFP ao CCH (**figura 14**) (ver métodos). As células PC12-NCS-1, após o estímulo com CCH (300 μ M), apresentaram deslocamento do domínio PH_{PLC δ} EGFP para o citoplasma, mais rápido e maior, em comparação ao deslocamento observado nas células PC12-wt (**figura 14**).

Para a quantificação desses valores e avaliação da reprodutibilidade da resposta do domínio PH_{PLC δ} EGFP ao CCH nos dois tipos celulares, pelo menos 10 experimentos independentes, foram analisados (ver métodos). Após o estímulo com CCH (300 μ M), a média da intensidade de fluorescência referente à translocação máxima do domínio PH_{PLC δ} EGFP para o citoplasma nas células PC12-NCS-1 foi significativamente maior (663,0 \pm 63,0) (n:14) que a média da intensidade de fluorescência observada nas células PC12-wt (310,0 \pm 39,0) (n: 21) com $P < 0,0001$ (**inset figura 14**).

Uma vez que as células provenientes de experimentos independentes apresentavam variações nos níveis de expressão do domínio PH_{PLC δ} EGFP, foi realizada análise da razão da intensidade de fluorescência do domínio PH_{PLC δ} EGFP nas frações da membrana plasmática, dividida pela intensidade no citoplasma presente nos dois tipos celulares (ver métodos). Foi verificada menor razão nas células PC12-NCS-1 ($0,83 \pm 0,07$) (n:20) quando comparada às células PC12-wt ($1,60 \pm 0,10$) (n:22) com $P < 0,01$ (**figura 15**). A razão menor, observada nas células PC12-NCS-1, indica níveis reduzidos do domínio PH_{PLC δ} EGFP na membrana e maiores índices no citoplasma. Além disso, os valores das razões encontrados para cada tipo celular confirmam a relação proporcional de como variaram as intensidades da fluorescência do domínio PH_{PLC δ} EGFP na membrana plasmática X citoplasma.

Durante a realização dos experimentos, a análise individualizada das células indicou que havia diferentes padrões de resposta do domínio PH_{PLC δ} EGFP ao estímulo com CCH (300 μ M), resumidos em três perfis básicos de resposta (**figura 16**). O primeiro perfil, caracterizado como deslocamento máximo observado, apresentou gradiente de fluorescência entre a membrana e o citoplasma iguais. Nesse perfil, o domínio PH_{PLC δ} EGFP, após o estímulo com CCH, encontra-se homoganeamente distribuído entre os compartimentos de membrana plasmática e citoplasma. No segundo, caracterizado por um gradiente parcial, o domínio PH_{PLC δ} EGFP pode ser observado parcialmente na membrana plasmática e no citoplasma. No terceiro perfil, o domínio PH_{PLC δ} EGFP foi observado apenas na membrana plasmática. Nesse caso, a célula analisada não foi responsiva, uma vez que não se observou deslocamento para o citoplasma após o estímulo com CCH (300 μ M). Houve maior número de células PC12-NCS-1 (67 %)

apresentando o primeiro perfil em comparação às células PC12-wt (17%) (**figura 16, barra “PH_{PLC δ} EGFP no citoplasma”**). Um número maior de células PC12-wt (71%) em comparação às células PC12-NCS-1 (20%) responderam ao CCH predominantemente com o segundo perfil (**figura 16, barra “PH_{PLC δ} EGFP no citoplasma e na membrana”**). Além disso, houve reduzido número de células PC12-wt (12%) e PC12-NCS-1 (13%) não responsivas ao CCH e, por isso, foram enquadradas no terceiro perfil (**figura 16, barra “PH_{PLC δ} EGFP na membrana”**). O conjunto dos resultados experimentais e de suas análises reunidas na **figuras 13, 14, 15 e 16** sugerem fortemente facilitação na dinâmica hidrólise/formação de PIP₂/InsP₃ nas células PC12-NCS-1 submetidas ao estímulo com CCH (300 μ M).

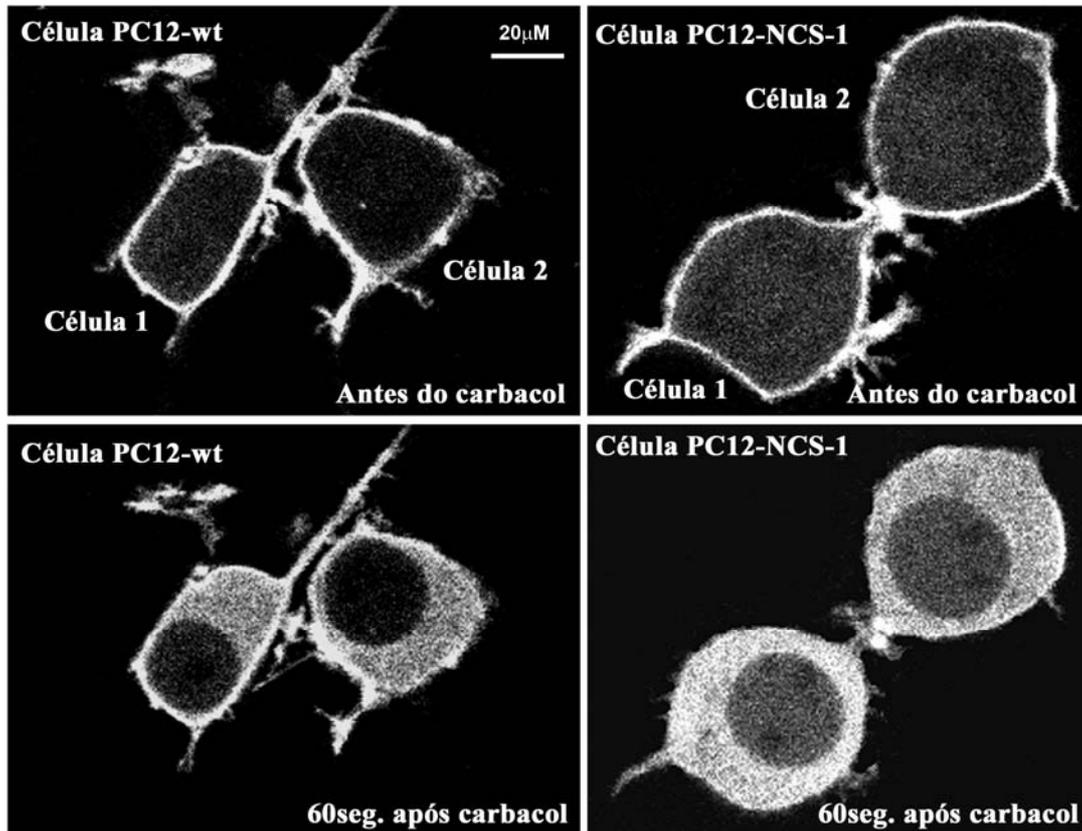


Figura 13: Dinâmica espacial do domínio PH_{PLC δ} EGFP em células PC12-wt e PC12-NCS-1 estimuladas com CCH.

As células PC12-wt e PC12-NCS-1 diferenciadas e expressando, transitoriamente, o domínio PH_{PLC δ} EGFP, foram acopladas ao sistema de perfusão e estimuladas com CCH (300µM). As imagens foram obtidas por microscopia confocal pela excitação das células transfectadas à 488nm e o sinal emitido foi detectado por um filtro à 522/35 nm. Os painéis superiores e os inferiores mostram, respectivamente, o perfil espacial do domínio PH_{PLC δ} EGFP antes do estímulo com CCH e 60seg. após o estímulo com CCH. As imagens são representativas de, pelo menos, dez experimentos independentes.

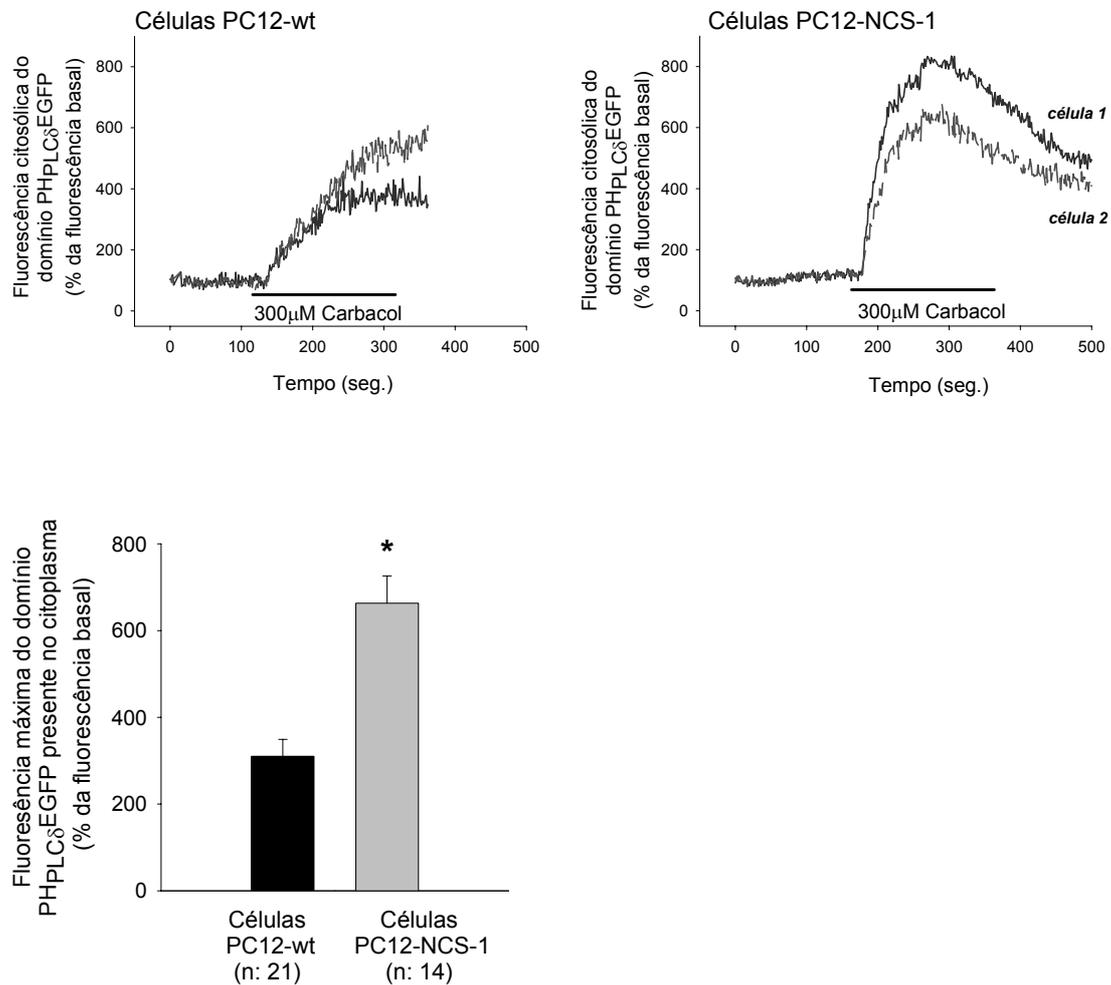


Figura 14: Dinâmica temporal do domínio PH_{PLC_δ}EGFP das células PC12-wt PC12-NCS-1 estimuladas com CCH.

Os registros, expressos em % da fluorescência basal, mostram o curso temporal (*time-course*) de resposta do domínio PH_{PLC_δ}EGFP em presença do CCH (300μM) nas células PC12-wt e PC12-NCS-1. Uma região de interesse (R.I.) foi selecionada no citoplasma de cada célula a fim de obter os registros da intensidade de fluorescência do domínio PH_{PLC_δ}EGFP durante todo o período experimental. As curvas acima representadas foram

obtidas pela razão da intensidade de fluorescência do domínio PH_{PLC δ 1}-EGFP (F) de cada tempo de coleta pela fluorescência basal (F_o) expressa em % (**ver métodos**).

Inset: Cálculo da média da intensidade máxima de fluorescência no citoplasma das células PC12-wt (n:21) e das células PC12-NCS-1 (n:14) após estímulo com CCH (300 μ M). Foi encontrada diferença significativa utilizando-se *t student* (não pareado) para $P < 0,0001$. * comparação entre células PC12-NCS-1 em relação às células PC12-wt.

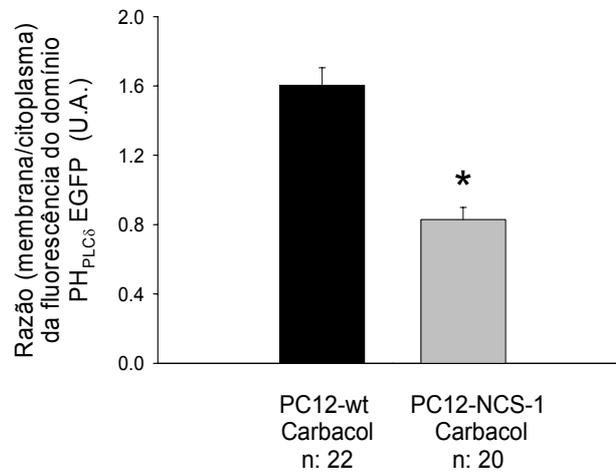


Figura 15: Razão do domínio PH_{PLCδ}EGFP presente na membrana plasmática/citoplasma das células PC12-wt e PC12-NCS-1 após estímulo com CCH.

As imagens obtidas por microscopia confocal foram analisadas através do programa *Metamorph Image Analysis Program* (Universal Imaging - West Chester, PA, USA). A análise foi realizada dividindo a média da intensidade de fluorescência do domínio PH_{PLCδ}EGFP presente na membrana plasmática pela intensidade presente no citoplasma das células PC12-wt (n: 22) e PC12-NCS-1 (n:20). Foi encontrada diferença significativa utilizando-se *t student* (não pareado) para $P < 0,05$. * para diferença estatística das células PC12-NCS-1 em relação às células PC12-wt.

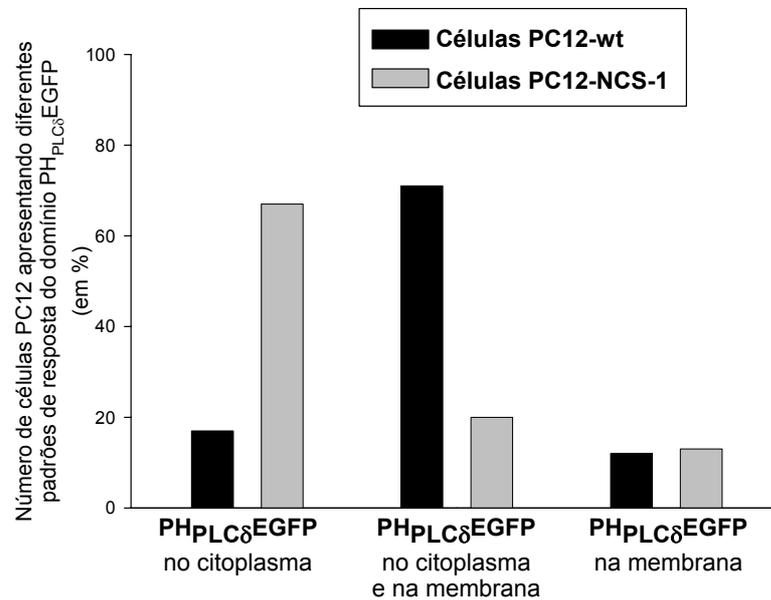


Figura 16: Porcentagem das células PC12-wt e PC12-NCS-1 apresentando diferentes perfis de distribuição do domínio PH_{PLCδ}EGFP após estímulo com CCH.

A contagem das células de acordo com as três classificações de resposta se refere à imagem no tempo de resposta máxima ao estímulo com CCH (300μM). A classificação foi feita de acordo com o gradiente de distribuição espacial do domínio PH_{PLCδ}EGFP para a imagem referente à resposta máxima ao CCH. O primeiro perfil (PH_{PLCδ}EGFP no citoplasma) indica gradiente de distribuição homogêneo do domínio PH_{PLCδ}EGFP entre a membrana plasmática e o citoplasma. O segundo perfil (PH_{PLCδ}EGFP no citoplasma e na membrana) indica distribuição do domínio PH_{PLCδ}EGFP no citoplasma e na membrana plasmática. O terceiro perfil (PH_{PLCδ}EGFP na membrana) indica o não deslocamento do domínio PH_{PLCδ}EGFP para o citoplasma durante o estímulo.

Houve a tentativa de quantificar os níveis intracelulares de InsP_3 após o estímulo das células com CCH ($300\mu\text{M}$) através de outro procedimento experimental. Foram quantificados os níveis de $[\text{}^3\text{H}]\text{-InsP}_3$ gerados nas células PC12-wt e PC12-NCS-1 após estímulo com CCH ($300\mu\text{M}$). Após o estímulo com CCH ($300\mu\text{M}$), $[\text{}^3\text{H}]\text{-inositois}$ totais foram extraídos e submetidos à uma coluna de troca aniônica para fracionamento do $[\text{}^3\text{H}]\text{-InsP}_3$ (ver métodos). Observou-se variação muito grande na quantificação de $[\text{}^3\text{H}]\text{-InsP}_3$ nas células PC12-wt e PC12-NCS-1 estimuladas com diferentes concentrações de CCH (50, 100 e $300\mu\text{M}$) (**figura 17**). Embora as respostas induzidas por $50\mu\text{M}$ e $300\mu\text{M}$ de CCH apresentarem tendência à produzirem maior quantidade de $[\text{}^3\text{H}]\text{-InsP}_3$ em relação às células não estimuladas com CCH, não foram detectadas diferenças significativas tanto entre a produção basal e induzida de $[\text{}^3\text{H}]\text{-InsP}_3$, quanto a produção de $[\text{}^3\text{H}]\text{-InsP}_3$ induzida por CCH entre as células PC12-wt e as células PC12-NCS-1 (**figura 17**).

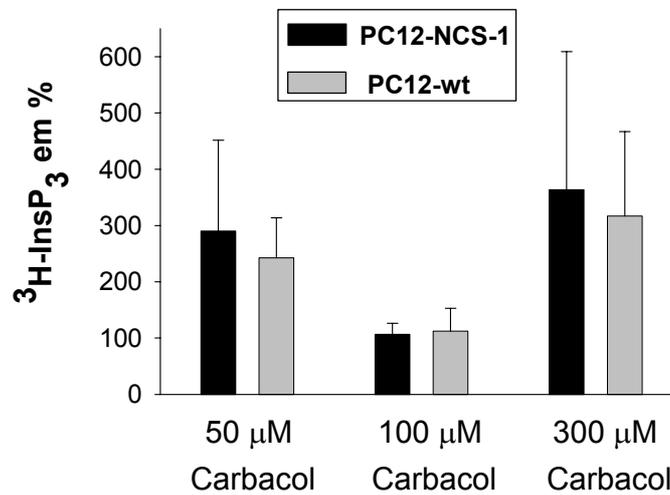


Figura 17: Formação de inositol radioativo ($[^3\text{H}]\text{-InsP}_3$) em células PC12-wt e PC12-NCS-1 estimuladas com CCH.

Células PC12-wt e PC12-NCS-1 foram incubadas *overnight* com $[^3\text{H}]\text{-myo-inositol}$ ($0,5\mu\text{Ci}$ para $2,5 \times 10^5$ células/placa 60mm). Posteriormente as células foram estimuladas com CCH ($300\mu\text{M}$) e os inositóis totais foram extraídos e submetidos a coluna de troca aniônica. As frações referentes ao $[^3\text{H}]\text{-InsP}_3$ foram eluídas e quantificadas em espectrofluorímetro de cintilação líquida. Cada barra representa a porcentagem média de $[^3\text{H}]\text{-InsP}_3$ em relação à quantificação basal de $[^3\text{H}]\text{-InsP}_3$ das células não estimuladas com CCH (\pm EPM). Os resultados são representativos de, pelo menos, três experimentos independentes. Não foi encontrada diferença significativa.

A fim de confirmar se o deslocamento do domínio PH_{PLC δ} EGFP era dependente da via regulada por proteínas G e não através de despolarização celular, as células PC12-wt e PC12-NCS-1 transfectadas transitoriamente com o domínio PH_{PLC δ} EGFP foram estimuladas com KCl (60mM) e, posteriormente, estimuladas com CCH (300 μ M). Na **figura 18**, observa-se a distribuição espacial do domínio PH_{PLC δ} EGFP nas células PC12-wt e PC12-NCS-1 depois do estímulo com KCl (60mM) (**painéis superiores**) e depois do estímulo com CCH (300 μ M) (**painéis inferiores**). Tanto nas células PC12-wt quanto nas células PC12-NCS-1, o domínio PH_{PLC δ} EGFP não foi responsivo ao estímulo despolarizante com KCl (**figura 18, painéis superiores**) confirmando a hipótese que, neste modelo, estímulos despolarizantes são incapazes de provocar a produção de InsP₃ assim como o deslocamento do domínio PH_{PLC δ} EGFP. Logo após o estímulo com CCH, as células PC12-wt e PC12-NCS-1 foram responsivas (**figura 18, painéis inferiores**) sugerindo que se tratavam de células viáveis experimentalmente por apresentarem uma maquinaria molecular de hidrólise/formação de PIP₂/InsP₃ respectivamente. O perfil de resposta do domínio PH_{PLC δ} EGFP a partir da análise do curso temporal demonstrou, durante o estímulo despolarizante com KCl (60mM), que não houve resposta do domínio PH_{PLC δ} EGFP em nenhuma das células (**figura 19**). Durante a lavagem das células não houve alteração nos níveis citoplasmáticos do domínio PH_{PLC δ} EGFP e, após o estímulo com CCH (300 μ M), o domínio PH_{PLC δ} EGFP foi responsivo tanto nas células PC12-wt quanto nas células PC12-NCS-1 (**figura 19**).

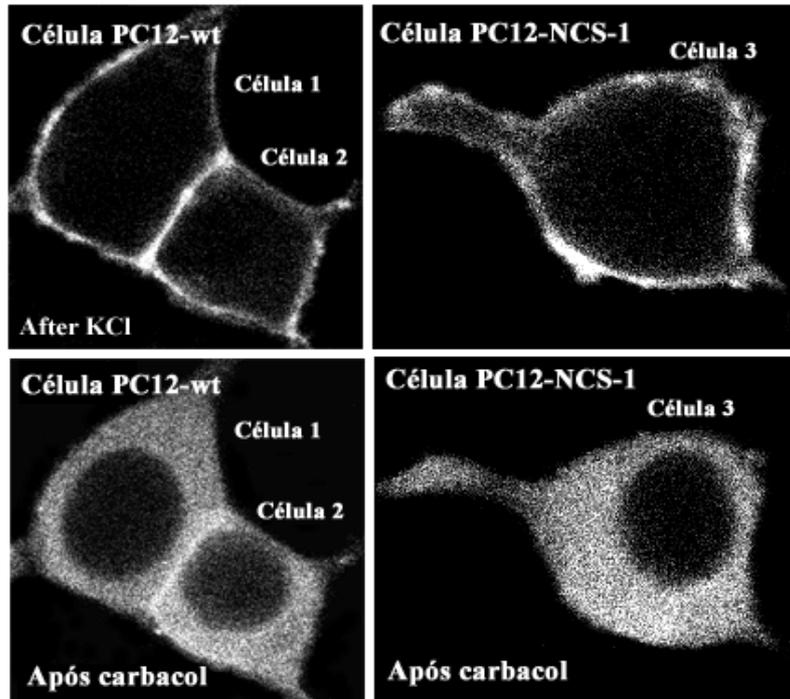


Figura 18: Dinâmica espacial do domínio PH_{PLC δ} EGFP nas células PC12-wt e PC12-NCS-1 após estímulo despolarizante com KCl.

PC12-wt e PC12-NCS-1 diferenciadas e expressando, transitoriamente, o domínio PH_{PLC δ} EGFP, foram estimuladas com KCl (60mM), lavadas com meio de incubação contendo Ca²⁺ (2mM) e, posteriormente, estimuladas com CCH (300 μ M). As imagens foram obtidas por microscopia confocal pela excitação das células à 488nm e o sinal emitido foi detectado por um filtro à 522/35nm. Os painéis superiores e os inferiores mostram, respectivamente, o perfil espacial do domínio PH_{PLC δ} EGFP 60 seg. depois do estímulo com KCl e 60 seg. após o estímulo com CCH. As imagens são representativas de, pelo menos, três experimentos independentes.

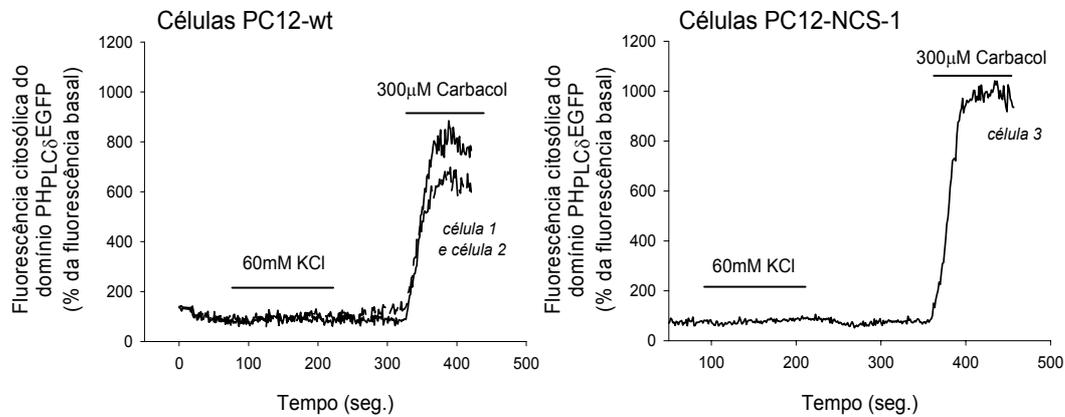


Figura 19: Dinâmica temporal do domínio PH_{PLC δ} EGFP das células PC12-wt PC12-NCS-1 em presença de estímulo despolarizante com KCl.

As curvas acima indicam a respostas ao estímulo com KCl (60mM) e CCH (300 μ M) das células indicadas na figura anterior. Uma R.I. foi selecionada no citoplasma de cada célula a fim de obter os registros da intensidade de fluorescência do domínio PH_{PLC δ} EGFP durante todo o período experimental. As curvas foram obtidas pela razão da intensidade de fluorescência do domínio PH_{PLC δ} -EGFP (F) de cada tempo de coleta pela fluorescência basal (F_0) expressa em % (ver métodos). As análises são representativas de, pelo menos, três experimentos independentes.

Jumblatt e Tixchler (1982) mostraram que CCH foi capaz de ativar tanto receptores muscarínicos quanto receptores nicotínicos células em células PC12. Além disso, foi demonstrado que ativação de receptores nicotínicos em células cromafins é capaz de estimular a hidrólise de fosfoinosítídeos (Terbush e Holz, 1986; Eberhard e Holz, 1987; Furukawa e cols., 1994; Ebihara e cols., 2006). Apesar de ter sido mostrado que a resposta de deslocamento do domínio PH_{PLC δ} EGFP foi específica ao estímulo com CCH e não a estímulos despolarizantes (através do KCl) (**figuras 18 e 19**) avaliou-se a seletividade da via de ativação muscarínica através da análise da resposta do domínio PH_{PLC δ} EGFP ao estímulo com CCH (300 μ M) na presença de atropina (10 μ M), um antagonista muscarínico (**figura 20**). Após o estímulo isolado com CCH (300 μ M) foi observado um maior deslocamento do domínio PH_{PLC δ} EGFP para o citoplasma nas células PC12-NCS-1 comparativamente às células PC12-wt (**figura 20**). Já na presença da atropina (10 μ M) observou-se a redução imediata nos níveis citoplasmáticos do domínio PH_{PLC δ} EGFP nos dois tipos celulares (**figura 20**), indicando que o deslocamento do domínio PH_{PLC δ} EGFP, induzido pelo CCH, nas células PC12-wt e PC12-NCS-1 mobiliza a via muscarínica.

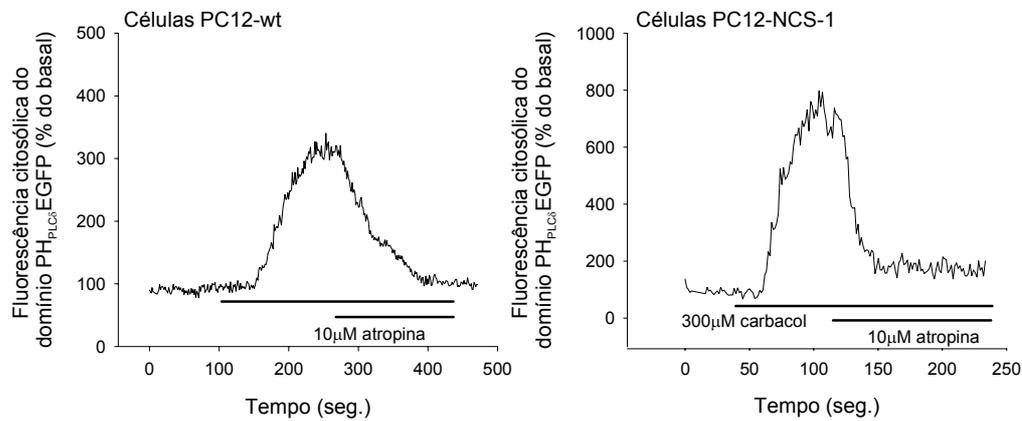


Figura 20: Inibição pela atropina do deslocamento citoplasmático do domínio PH_{PLC8}EGFP induzido por CCH.

PC12-wt e PC12-NCS-1 diferenciadas e expressando, transitoriamente, o domínio PH_{PLC8}EGFP, foram acopladas ao sistema de perfusão, estimuladas com CCH (300 μ M), e posteriormente, perfundidas com atropina (10 μ M) na presença contínua de CCH (300 μ M). Uma R.I. foi selecionada no citoplasma das células a fim de se obter os registros da intensidade de fluorescência do domínio PH_{PLC8}EGFP durante todo o período experimental. Os registros coletados foram analisados a partir da razão da intensidade de fluorescência do domínio PH_{PLC8}-EGFP (F) em cada tempo de coleta pela fluorescência basal (F_0) expressa em % (ver métodos). As curvas são representativas de, pelo menos, três experimentos independentes.

Uma vez que o aumento do deslocamento do domínio PH_{PLC δ} EGFP nas células PC12-NCS-1 respondeu de forma dependente da ativação de receptores muscarínicos, foi verificado se o deslocamento correspondente à produção de InsP3 seria originado a partir da ativação da fosfolipase C. Desse modo, células PC12-NCS-1 e PC12-wt foram pré-incubadas com U73122 (10 μ M), inibidor não seletivo da PLC e, posteriormente, estimuladas com CCH (300 μ M) em presença concomitante de U73122 (10 μ M) (**figura 21**). Observou-se, tanto nas células PC12-wt quanto nas células PC12-NCS-1, uma redução significativa dos níveis citoplasmáticos do domínio PH_{PLC δ} EGFP comparado à resposta do domínio PH_{PLC δ} EGFP induzida pelo CCH isoladamente (**figura 21**). A análise entre o máximo de fluorescência do domínio PH_{PLC δ} EGFP citoplasmático encontrado nas células PC12-wt (221,0 \pm 16,4 em % da fluorescência basal) (n: 21) e PC12-NCS-1 (314,6 \pm 34,8 em % da fluorescência basal) (n: 11) demonstrou uma maior eficácia no bloqueio da resposta induzido por U73122 nas células PC12-NCS-1 (**inset figura 21**). Esse resultado indicou uma maior participação da PLC na resposta do domínio PH_{PLC δ} EGFP nas células PC12-NCS-1.

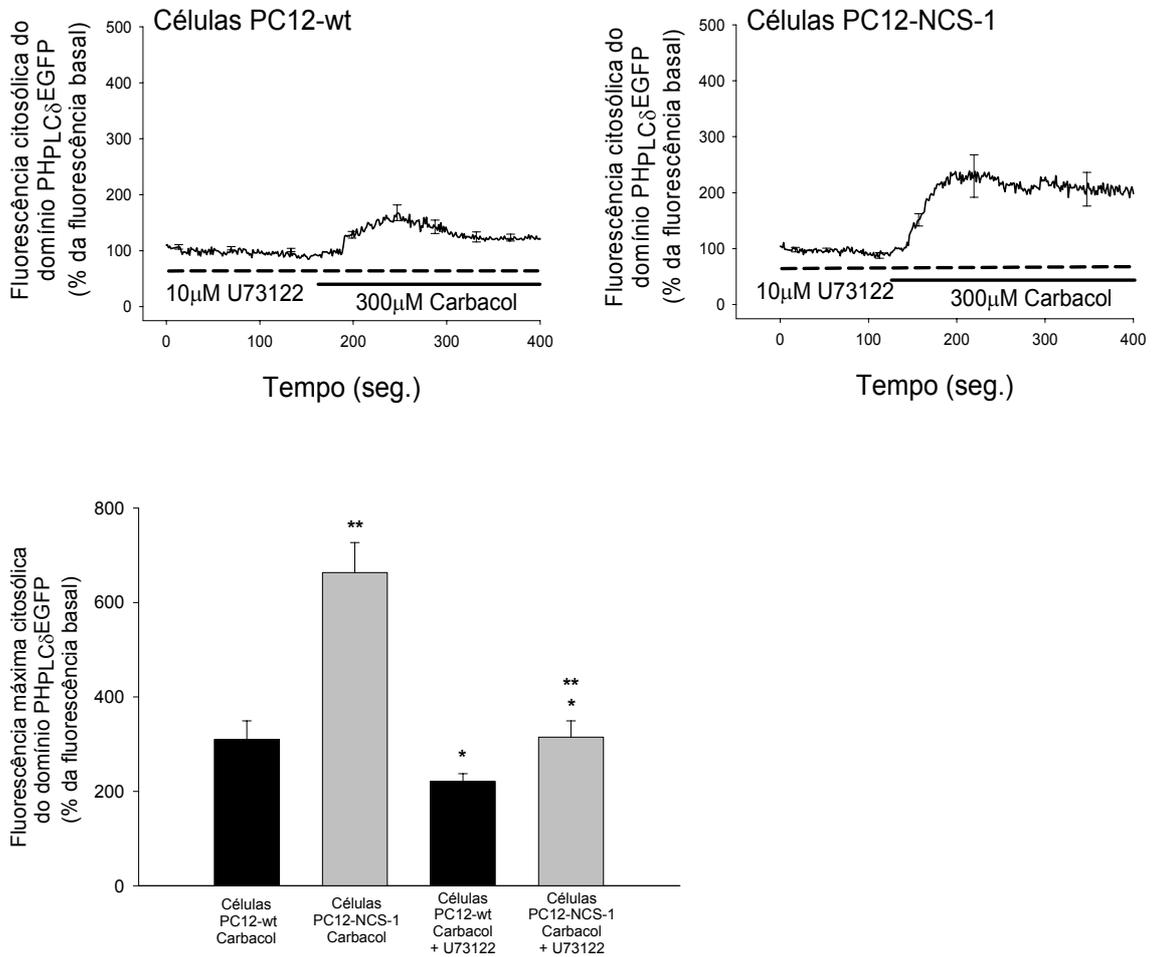


Figura 21: Curso temporal do deslocamento do domínio PH_{PLCδ}EGFP pelo U73122, um inibidor não seletivo da PLC nas células PC12-wt e PC12-NCS-1 estimuladas com CCH.

As células PC12 transfectadas transitoriamente com o domínio PH_{PLCδ1}-EGFP foram pré-incubadas durante 30 min/37°C com U73122 (10μM) em solução HBSS contendo Ca²⁺ (2mM). As células foram então estimuladas com CCH (300μM) na presença contínua de

U73122. Uma R.I. foi selecionada no citoplasma das células a fim de se obter os registros da intensidade de fluorescência do domínio PH_{PLCδ}EGFP durante todo o período experimental. As curvas representam o cálculo da média da R.I. (F/F_0 em % \pm EPM) das células analisadas em pelo menos, três experimentos independentes.

Inset: As barras representam os valores do máximo da intensidade de fluorescência citoplasmática (F/F_0 em % \pm EPM) após o estímulo das células PC12-wt e PC12-NCS-1 com CCH (300 μ M) isoladamente, ou com CCH (300 μ M) na presença de U73122 (10 μ M). Pelo menos, três experimentos independentes realizados em duplicatas. Significância estatística foi considerada para $P < 0,01$ onde * comparação com o estímulo isolado de CCH; ** comparação com as células PC12-wt.

A partir dos resultados obtidos com o perfil de hidrólise/formação de PIP₂/InsP₃ e o conseqüente envolvimento dos altos níveis de expressão de NCS-1 na regulação da sinalização muscarínica, avaliou-se a dinâmica e os níveis intracelulares de Ca²⁺ nas células PC12-wt e PC12-NCS-1 submetidas ao estímulo com CCH (300µM).

Os experimentos, inicialmente, foram realizados utilizando o Fluo4-AM (**figura 22**), fluoróforo específico para o Ca²⁺ e, posteriormente, utilizou-se INDO1-AM a fim de fazer a análise quantitativa das [Ca²⁺]_i das células submetidas ao estímulo com CCH (300µM) (**figura 23, 24 e 25**) (ver métodos).

A **figura 22** mostra que tanto as células PC12-wt quanto as células PC12-NCS-1 estimuladas com CCH (300µM) apresentaram aumento dos níveis intracelulares de Ca²⁺. Nas células PC12-NCS-1 houve aumento dos níveis intracelulares de Ca²⁺ seguido de decaimento rápido dos mesmos (**figura 22, painel à direita**). Já o padrão identificado nas células PC12-wt apresentou aumento dos níveis intracelulares de Ca²⁺ atingindo um pico menor quando comparado àquele observado nas células PC12-NCS-1. Houve decaimento lento dos níveis de Ca²⁺ observado, na curva das células PC12-wt, caracterizado por um perfil de decaimento em forma de *platô* (**figura 22, painel à esquerda**).

Para quantificação da [Ca²⁺]_i, as células PC12-NCS-1 e PC12-wt foram previamente incubadas com Indo1-AM e submetidas ao estímulo com CCH (300µM) (ver métodos). Na **figura 23** fica evidente o padrão de resposta encontrado nos dois tipos celulares. Foi observada grande semelhança entre os sinais intracelulares de Ca²⁺ observados a partir da marcação das células com o Fluo4-AM e com o Indo-AM (**figura 22 e 23**). A quantificação dos picos máximos da [Ca²⁺]_i em resposta a CCH (300µM) mostrou aumento significativo nas células PC12-NCS-1 (766,35 ± 35,0 nM) (n: 142) em

comparação às células PC12-wt ($687,8 \pm 37,0$ nM) (n: 115) (**figura 24**) onde $P < 0,05$. Já os experimentos realizados em células marcadas com Indo1 e submetidas ao estímulo com CCH ($300\mu\text{M}$), desta vez, na presença concomitante de EGTA (2mM), identificaram dinâmicas idênticas e níveis semelhantes de Ca^{2+} para as células wt e PC12-NCS-1 (**figura 25**).

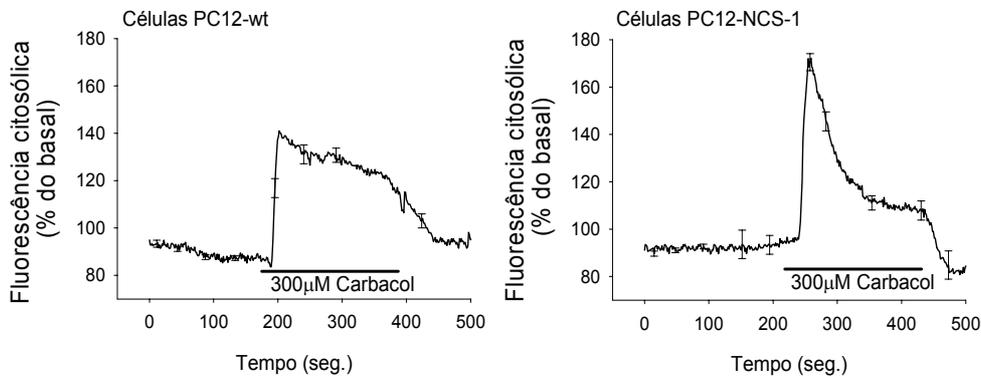


Figura 22: Alterações na dinâmica do Ca^{2+} intracelular observadas nas células PC12-wt e PC12-NCS-1 marcadas com Fluo4 e estimuladas com CCH.

As células foram incubadas com Fluo4-AM em solução de marcação por 45 min à 37°C. Após marcação, as lamínulas foram acopladas ao sistema de perfusão e microscopia confocal e submetidas ao estímulo com CCH (300µM) (ver métodos). As células foram excitadas à 488nm e a fluorescência emitida foi detectada por um filtro à 522/35nm. Uma R.I. foi selecionada no citoplasma das células a fim de se obter a intensidade de fluorescência referente às alterações do Ca^{2+} intracelular durante todo o período experimental. As curvas médias foram obtidas pelo cálculo da média dos registros das células PC12-wt e PC12-NCS-1 ao longo do tempo experimental. As curvas são representativas de, pelo menos, cinco experimentos independentes.

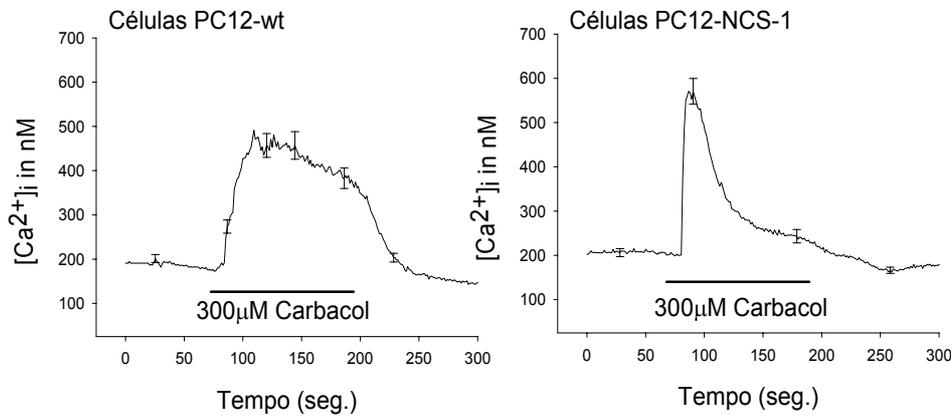


Figura 23: Alterações na dinâmica temporal do Ca^{2+} intracelular observadas nas células PC12-wt e PC12-NCS-1 marcadas com Indo1 e estimuladas com CCH.

As células PC12-wt e PC12-NCS-1 foram incubadas com Indo1-AM em solução de marcação por 45 min à 37°C. As células marcadas foram acopladas à câmara de perfusão juntamente ao sistema de microscopia confocal e submetidas ao estímulo de CCH (300µM). As células foram excitadas à 351nm + 363nm e as fluorescências de emissão foram coletadas pelos filtros 460LP e 405/35. Uma R.I. foi selecionada no citoplasma das células a fim de se obter os registros da intensidade de fluorescência referente às alterações do Ca^{2+} intracelular durante todo o período experimental. As razões das fluorescências ($R=F_{405}/F_{485}$) dentro da RI selecionada no citoplasma celular foram usadas para calcular as $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de acordo com a equação de Grynkiewicz (ver métodos). As curvas médias foram calculadas a partir da média dos valores de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ das células PC12-wt (n:115) e PC12-NCS-1 (n:142) ao longo do tempo experimental. Os dados apresentados são representativos de, pelo menos, cinco experimentos independentes.

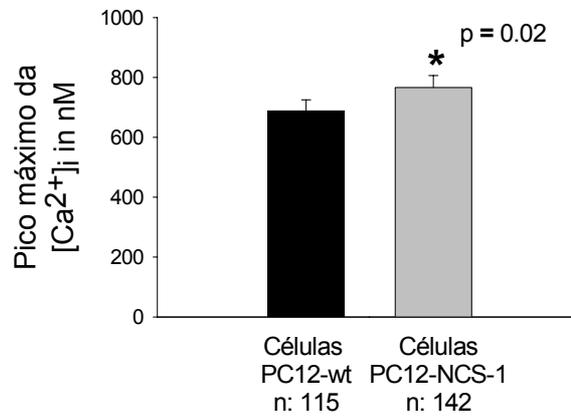


Figura 24: Pico máximo da $[Ca^{2+}]_i$ verificado nas células PC12-wt e PC12-NCS-1 estimuladas com CCH.

As barras acima representam o pico máximo de Ca^{2+} obtido a partir da $[Ca^{2+}]_i$ máxima (\pm EPM) das células PC12-wt ($687,8 \pm 37,0$ nM) (n: 115) e PC12-NCS-1 ($766,35 \pm 35,0$ nM) (n: 142) analisadas. Considera-se diferença significativa (*) entre os valores para *t-student* (não pareado) apresentando $P < 0,05$.

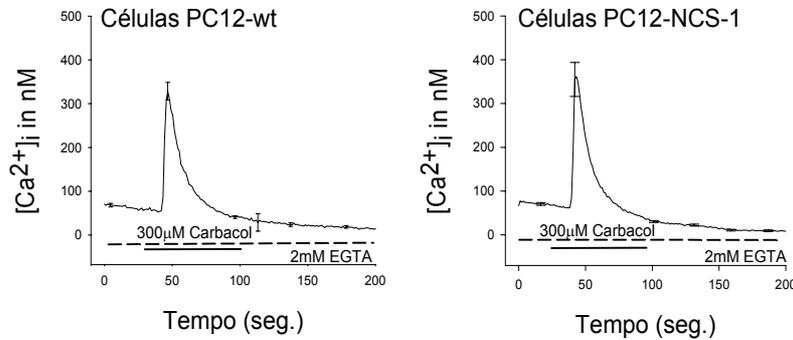


Figura 25: Dinâmica temporal das $[Ca^{2+}]_i$ das células PC12-wt e PC12-NCS-1 marcadas com Indo1 e estimuladas com CCH na ausência de Ca^{2+} extracelular.

As células PC12-wt e PC12-NCS-1 foram incubadas por 45min/37°C com Indo1-AM em solução de marcação (ver métodos). As lamínulas foram acopladas à câmara de perfusão juntamente ao sistema de microscopia confocal e submetidas ao estímulo de CCH (300 μ M) em meio de perfusão contendo EGTA (2mM). As células foram excitadas à 351nm + 363nm e os registros referente à fluorescência do Indo foram coletados pelos filtros 460 LP e 405/35. Uma R.I. foi selecionada no citoplasma das células a fim de se obter os registros da intensidade de fluorescência referente às alterações do Ca^{2+} intracelular durante todo o período experimental. As razões das fluorescências ($R=F_{405}/F_{485}$) dentro da RI selecionada no citoplasma celular foram usadas para calcular as $[Ca^{2+}]_i$ de acordo com a equação de Grynkiewicz (ver métodos). As curvas médias foram calculadas a partir da média dos valores de $[Ca^{2+}]_i$ das células PC12-wt (n:115) e PC12-NCS-1 (n:142) ao longo do tempo experimental. Os dados apresentados são representativos de, pelo menos, cinco experimentos independentes.

Com a finalidade de se investigar a relação entre as alterações nas $[Ca^{2+}]_i$ e a dinâmica de deslocamento do domínio PH_{PLC δ} EGFP induzida por CCH, as células PC12-wt e PC12-NCS-1 transfectadas transitoriamente com o domínio PH_{PLC δ} EGFP foram submetidas ao estímulo com CCH (300 μ M), na presença de agentes capazes de interferir com os níveis intracelulares de Ca^{2+} como, por exemplo, EGTA (2mM), Bapta-AM (10 μ M) ou 2APB (100 μ M). A **figura 26** mostra a dinâmica temporal de deslocamento do domínio PH_{PLC δ} EGFP induzida por CCH (300 μ M) na presença de EGTA (2mM). O domínio PH_{PLC δ} EGFP manteve o deslocamento para o citoplasma após o estímulo com CCH (300 μ M) na ausência do Ca^{2+} extracelular, embora tenham sido observados perfis distintos de deslocamento do domínio PH_{PLC δ} EGFP em comparação ao estímulo isolado com CCH (300 μ M) (**figura 26 e figura 7**). Na presença concomitante de EGTA (2mM) e CCH (300 μ M), houve rápido decaimento dos níveis citoplasmáticos de fluorescência nos dois tipos celulares, indicando aceleração do retorno do domínio para a membrana plasmática nessas condições experimentais (**figura 26**). A análise do pico de fluorescência máxima citoplasmática do domínio PH_{PLC δ} EGFP nas células PC12-NCS-1 e PC12-wt respectivamente ($599,51 \pm 20,45$ e $467,08 \pm 87,00$ % da fluorescência basal) (**figura 27**) em resposta ao estímulo com CCH (300 μ M) na ausência de Ca^{2+} extracelular mostra uma redução da facilitação observada nas células PC12-NCS-1 estimuladas isoladamente com CCH (300 μ M) (ver pico máximo na **figura 8**).

Na ausência de Ca^{2+} intracelular, pela pré-incubação das células PC12-wt e PC12-NCS-1 com BAPTA-AM (10 μ M) (um quelante intracelular de Ca^{2+}) e estímulo posterior com CCH (300 μ M) na presença de EGTA (2mM) foi possível identificar bloqueio da

translocação do domínio PH_{PLC δ} EGFP para o citoplasma nos dois tipos celulares (**figura 28**). Esse resultado indica que ausência total do Ca²⁺, extracelular e intracelular, impede a facilitação da hidrólise/formação de PIP2/InsP3 observado nas células PC12-NCS-1 (**figura 7**).

Diante do resultado prévio, mostrando que a translocação do domínio PH_{PLC δ} EGFP depende do aumento do Ca²⁺ intracelular, investigou-se a participação dos estoques intracelulares de Ca²⁺ dependentes de InsP₃ neste processo. Para isso, células PC12-wt e PC12-NCS-1 transitoriamente transfectadas com o domínio PH_{PLC δ} EGFP, foram pré-incubadas com 2APB (100 μ M), bloqueador não seletivo dos estoques intracelulares de Ca²⁺ sensíveis à InsP₃ (Maruyama et al., 1997; Missiaen et al., 2001) e depois estimuladas com CCH (300 μ M) em presença de EGTA (2mM). A **figura 29** mostra que houve bloqueio do deslocamento do domínio PH_{PLC δ} EGFP nas células PC12-wt e PC12-NCS-1. Este resultado fica evidente através da análise do pico de fluorescência máxima citoplasmática dos dois tipos celulares submetidos ao estímulo com CCH (300 μ M) na presença do 2-APB (100 μ M) (**figura 30**). Tanto nas células PC12-wt quanto nas células PC12-NCS-1 submetidas ao estímulo com CCH (300 μ M), na presença do bloqueador 2-APB (100 μ M), o pico máximo de fluorescência citoplasmática do domínio PH_{PLC δ} EGFP foi menor (respectivamente, 252,0 \pm 43,0 % da fluorescência basal, n:11; 212,0 \pm 24,0 % da fluorescência basal, n:13) em comparação aos valores alcançados com o estímulo isolado com CCH (respectivamente, 310,0 \pm 39,0 % da fluorescência basal, n:21; 663,0 \pm 63,0 % da fluorescência basal, n:14).

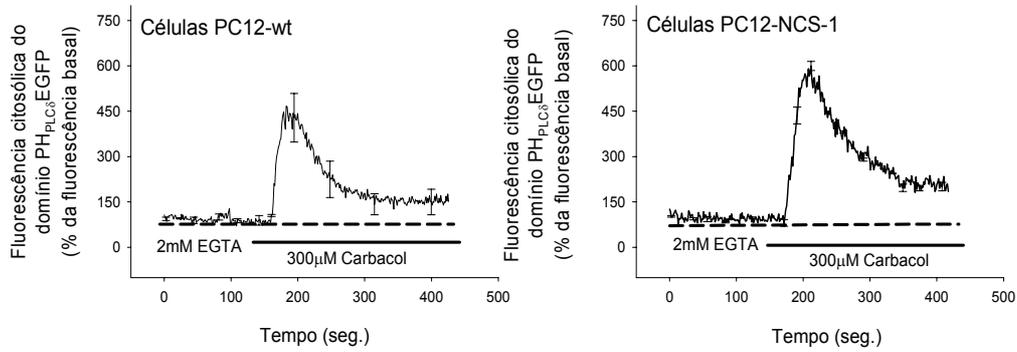


Figura 26: Dinâmica temporal de resposta do domínio PH_{PLCδ1}-EGFP das células PC12-wt e PC12-NCS-1 submetidas ao estímulo com CCH na ausência do Ca²⁺ extracelular.

As células PC12 transfectadas transitoriamente com o domínio PH_{PLCδ}-EGFP foram perfundidas com EGTA (2mM) e posteriormente estimuladas com CCH (300μM) na presença concomitante de EGTA. Uma R.I. foi selecionada no citoplasma das células a fim de se obter os registros da intensidade de fluorescência do domínio PH_{PLCδ}EGFP durante todo o período experimental. As curvas representam o cálculo da média da R.I. (F/F_o em % \pm EPM) das células analisadas. Pelo menos três experimentos independentes foram realizados.

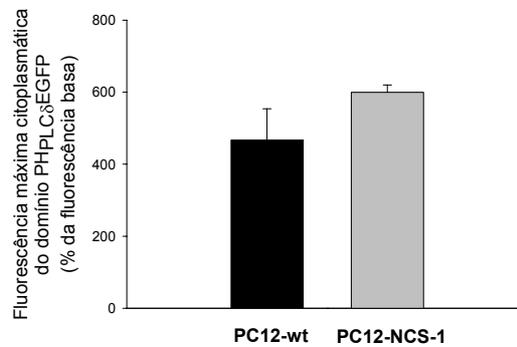


Figura 27: Pico máximo de fluorescência do domínio PH_{PLC8}-EGFP após estímulo das células PC12-wt e PC12-NCS-1 com CCH na ausência do Ca²⁺ extracelular.

As barras representam a média da intensidade máxima de fluorescência citoplasmática alcançada pelo domínio PH_{PLC8}-EGFP após estímulo das células com CCH (300µM). Foi calculada a média da R.I (a partir de F/F_o em % ± EPM) no tempo da resposta máxima do domínio PH_{PLC8}-EGFP das células representativas de, pelo menos, três experimentos independentes. Não foi encontrada diferença significativa utilizando-se *t student* (não pareado) para as células PC12-wt e PC12-NCS-1 (respectivamente 467,08 ± 87,00; 599,51 ± 20,45 em % da fluorescência basal ± EPM).

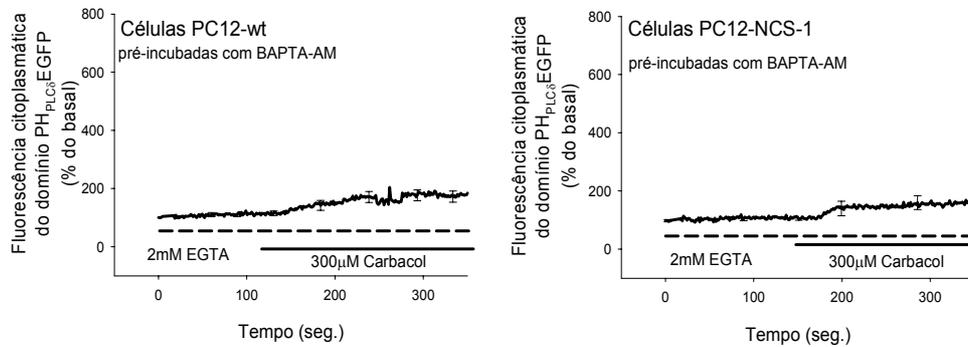


Figura 28: Inibição da dinâmica do domínio PH_{PLCδ1}-EGFP observado nas células PC12-wt e PC12-NCS-1 pela ausência de Ca²⁺.

As células PC12 transfectadas transitoriamente com o domínio PH_{PLCδ1}-EGFP foram pré-incubadas durante 20min/37°C com BAPTA-AM (10μM) e após serem acopladas à câmara de perfusão e ao sistema de microscopia confocal foram estimuladas com CCH (300μM) na presença contínua de EGTA (2mM). Os registros da fluorescência do domínio PH_{PLCδ1}-EGFP foram obtidos pela excitação das células transfectadas à 488nm e o sinal emitido foi detectado por um filtro à 522/35. As curvas indicam os valores médios da intensidade de fluorescência do domínio PH_{PLCδ1}-EGFP de uma R.I. citoplasmática (calculada a partir de F/F_o em % \pm EPM) ao longo do período experimental. Pelo menos, três experimentos independentes foram realizados.

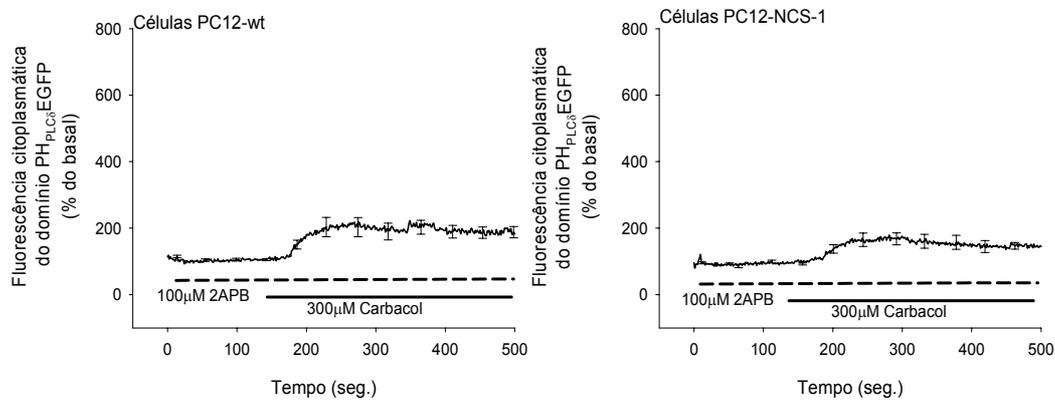


Figura 29: Inibição da dinâmica do domínio PH_{PLCδ1}-EGFP observada nas células PC12-wt e PC12-NCS-1 estimuladas com CCH na presença de antagonista dos estoques intracelulares de Ca²⁺ sensíveis a InsP3.

As células PC12 transfectadas transitoriamente com o domínio PH_{PLCδ1}-EGFP foram pré-incubadas durante 20min/37°C com 2APB (100μM). Após serem transferidas para a câmara de perfusão, as células foram estimuladas com CCH (300μM) em presença de EGTA (2mM) e 2APB (100μM). Os registros da fluorescência do domínio PH_{PLCδ1}-EGFP foram obtidos pela excitação das células à 488nm e o sinal emitido foi detectado por um filtro à 522/35nm. As curvas indicam os valores médios da intensidade de fluorescência do domínio PH_{PLCδ1}-EGFP de uma R.I. citoplasmática (calculada a partir de F/F_0 em % \pm EPM) registrada ao longo do período experimental. Pelo menos, três experimentos independentes foram realizados.

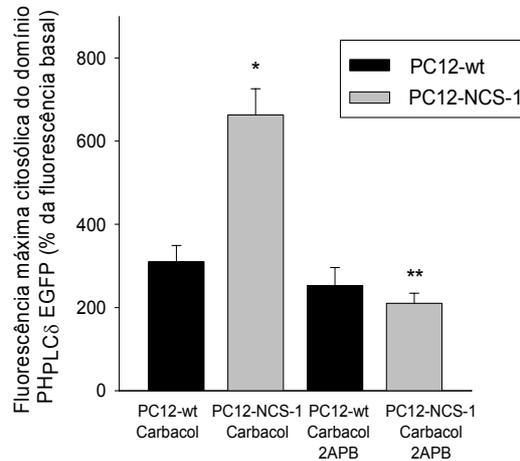


Figura 30: Análise da fluorescência máxima do domínio PH_{PLC8}-EGFP induzido pelo CCH isoladamente após o bloqueio dos estoques intracelulares de Ca²⁺ sensíveis a InsP3.

As barras mostram a média da fluorescência máxima citoplasmática referente à translocação do domínio PH_{PLC8}-EGFP após o estímulo das células com CCH em presença ou não de 2APB (100µM). Os valores foram obtidos de cada uma das curvas de *time-course* representativas de pelo menos, três experimentos independentes. Foi considerada diferença estatística valores encontrados no test *t-student* (não pareado) com $P < 0,05$. * considera diferença estatística entre PC12-NCS-1 carbacol e PC12-wt carbacol, ** considera diferença estatística entre PC12-NCS-1 carbacol 2APB e PC12-NCS-1 carbacol.

Sabe-se que em vários modelos celulares, a superexpressão de NCS-1 está associada ao aumento da liberação de mediadores químicos hormonais e neurotransmissores (Scalettar e cols., 2002; Kapp-Barnea e cols., 2003; Hilfiker, 2003; Gromada e cols., 2005; Zheng e cols., 2005; Taverna e cols., 2007). Em células PC12 a ativação da via purinérgica provocou potenciação da liberação de dopamina e hormônio de crescimento associado a superexpressão de NCS-1 (McFerran e cols., 1998; Koizume e cols., 2002; Taverna e cols., 2002; De Barry e cols., 2006). No presente trabalho, foi avaliado o envolvimento da superexpressão de NCS-1 na liberação de glutamato induzida pela ativação da via colinérgica. Células PC12-NCS-1 e PC12-wt foram estimuladas com CCH (300 μ M) em presença ou não de EGTA, BAPTA e/ou atropina. O sobrenadante foi recolhido e o glutamato liberado foi quantificado em fluorímetro a partir da reação luminescente de transformação do glutamato em α -cetoglutarato e NADPH pela glutamato desidrogenase em presença de NADP⁺ (**ver métodos**). Na ausência do estímulo, houve liberação basal de glutamato nas células PC12-wt e PC12-NCS-1, respectivamente (1,39 \pm 0,30; 2,22 \pm 0,41 nmol/mg de proteína com P= 0,49) (**figura 31, 1^o par de barras**). Foi observado aumento na liberação de glutamato nas células PC12-NCS-1 em comparação às células PC12-wt tanto para o estímulo isolado das células com CCH (300 μ M) (respectivamente, 14,4 \pm 1,8 nmol/mg de proteína; 8,3 \pm 0,9 nmol/mg de proteína), quanto para o estímulo de CCH na presença de EGTA (2mM) (respectivamente, 10,1 \pm 0,5 nmol/mg de proteína; 5,7 \pm 0,4 nmol/mg de proteína) (**figura 31, 2^o e 3^o pares de barras**). No entanto, na ausência completa do Ca²⁺, extracelular e intracelular, ocorre bloqueio da liberação de glutamato nos dois tipos

celulares (**figura 31, 4^o par de barras**), alcançando os níveis basais de liberação. Com a finalidade de verificar se o aumento da liberação de glutamato observado nas células PC12-NCS-1 era dependente da via muscarínica, o estímulo dos dois tipos celulares foi realizado na presença de atropina (10 μ M) e o glutamato liberado foi quantificado. Foi observado bloqueio pela atropina da liberação de glutamato nas células PC12-NCS-1 em comparação ao estímulo isolado com CCH (respectivamente, $4,2 \pm 0,3$ nmol/mg de proteína; $14,4 \pm 1,8$ nmol/mg de proteína). No entanto, nas células PC12-wt o bloqueio da liberação de glutamato pela atropina em comparação ao estímulo isolado com CCH não apresentou diferença estatística (respectivamente, $6,2 \pm 0,1$ nmol/mg de proteína; $8,3 \pm 0,9$ nmol/mg de proteína) (**figura 31, 2^o e 5^o pares de barras**).

Sabendo que a célula PC12 é um modelo celular clássico de liberação de dopamina (Lang e cols., 2001) e que pouco se conhece a respeito da liberação de glutamato nessas células, foi realizado um experimento controle em células, previamente permeabilizadas com digitonina (10 μ M) durante 6 min, com a finalidade de eliminar o glutamato citoplasmático e assim testar se a liberação de glutamato observada seria de origem vesicular (Romero e cols., 2003), uma vez que foi mostrado nesse trabalho a dependência do Ca²⁺ intracelular na liberação induzida pelo CCH (**figura 31, 3^o e 4^o par de barras**). Na ausência do estímulo, a liberação basal de glutamato das células PC12-wt e PC12-NCS-1 permeabilizadas (respectivamente $2,08 \pm 0,25$; $2,19 \pm 0,20$ nmol/mg de proteína, $P = 0,813$) (**figura 32, 1^o par de barras**) foi semelhante à liberação basal das células não permeabilizadas (respectivamente $1,39 \pm 0,30$; $2,22 \pm 0,41$ nmol/mg de proteína). Houve aumento significativo dos níveis de liberação de glutamato nas células PC12-wt e PC12-NCS-1 permeabilizadas (respectivamente $5,84 \pm 0,40$; $6,76 \pm 0,41$)

(**figura 32, 2^o par de barras**) em comparação à liberação basal (**figura 32, 1^o par de barras**), embora esse aumento tenha sido estatisticamente menor que aquele induzido pelo CCH nas células não permeabilizadas (**figura 32, 4^o par de barras**). Na ausência do Ca^{2+} extracelular, a liberação de glutamato foi significativamente reduzida nas células PC12-wt e PC12-NCS-1 (respectivamente $3,14 \pm 0,45$; $3,41 \pm 0,31$) (**figura 32, 3^o par de barras**), mas ainda se manteve maior que a liberação basal (**figura 32, 1^o par de barras**).

Na tentativa de caracterizar a origem da liberação de glutamato nas células PC12-wt e PC12-NCS-1, verificou-se a expressão e distribuição do transportador vesicular de glutamato do tipo II (VGLUT2) por meio de experimentos de *western blot* e imunofluorescência. Houve expressão de VGLUT2 tanto nas células PC12-wt, quanto nas células PC12-NCS-1 (**figuras 33, 34, 35 e 36**). Nas figuras 33, 35 e 36 foi observada distribuição espacial do VGLUT2 nos dois tipos celulares. A distribuição de VGLUT2 nas células PC12-NCS-1 foi preferencialmente vesicular. Por outro lado, nas células PC12-wt a distribuição se apresentou difusa (**figura 33**). O VGLUT2 também foi identificado no extrato total dessas células utilizando a técnica de *western blot* (**figura 34**). Houve a tentativa de identificar em que tipo de vesícula intracelular estaria localizado o VGLUT2 e quais seriam as diferenças na distribuição de VGLUT2 que poderiam corroborar com o padrão de liberação de glutamato observado entre as células PC12-wt e PC12-NCS-1 (**figuras 35 e 36**). Para esta análise foram escolhidos dois tipos de vesículas encontradas nas células PC12 como possíveis localizações de VGLUT2. As **figuras 35 e 36** mostram, respectivamente, a distribuição espacial de VGLUT2 juntamente com a expressão transitória do vetor codificador da proteína vesicular

sinaptobrevina (VAMP) em fusão com a proteína GFP (VAMP-GFP) encontrada em vesículas pequenas (*small vesicles*) e com o transportador vesicular de monoaminas (VMAT-1) presente, classicamente, em vesículas de núcleo denso (*dense core*). Não foi observada co-localização entre o VGLUT2 e a proteína VAMP-GFP superexpressa transitoriamente, (**figura 35**). Em relação à proteína VMAT-1 não foi encontrada co-localização entre as duas proteínas nos neuritos e varicosidades, apesar de ter sido observada co-localização entre VMAT-1 e VGLUT2 no corpo das células PC12-NCS-1 (**figura 36**). A análise qualitativa das imagens (ver imagens representativas, **figuras 35 e 36**) indica que o VGLUT2, em células PC12-wt e PC12-NCS-1 está localizado em vesículas diferentes daquelas de núcleo denso e das vesículas pequenas.

Foi realizado experimento controle com a finalidade de mostrar que a liberação de glutamato nas células PC12 pode ser controlada por estímulo despolarizante de maneira dependente de Ca^{2+} (**figura 37**). As células PC12-wt e PC12-NCS-1 foram estimuladas durante 15min/37°C com KCl (60mM) na presença ou não de outros agentes como EGTA (2mM) e BAPTA (20 μ M). Na ausência do estímulo com KCl (60mM), foi observada liberação basal de glutamato (**figura 37, 1^o par de barras**). Em contrapartida, na presença do estímulo despolarizante, houve aumento significativo da liberação de glutamato em ambas as células (**figura 37, 2^o par de barras**). Foi observada facilitação na liberação de glutamato nas células PC12-NCS-1 em comparação às células PC12-wt (respectivamente, $19,7 \pm 1,0$ nmol/mg de proteína; $15,3 \pm 1,0$ nmol/mg de proteína) (**figura 37, 2^o par de barras**). Na ausência de Ca^{2+} extracelular houve redução significativa na liberação de glutamato nas células PC12-NCS-1 e PC12-wt (respectivamente, $8,6 \pm 1,1$ nmol/mg de proteína; $8,9 \pm 0,5$ nmol/mg de proteína) em

comparação ao estímulo isolado com KCl (respectivamente, $19,7 \pm 1,0$ nmol/mg de proteína; $15,3 \pm 1,0$ nmol/mg de proteína) (**figura 37, 2º e 3º pares de barras**). Entretanto, a comparação da liberação de glutamato induzida pelo KCl (60mM) na ausência de Ca^{2+} extracelular entre as células PC12-NCS-1 e PC12-wt mostrou índices estatisticamente semelhantes (respectivamente, $8,6 \pm 1,1$ nmol/mg de proteína; $8,9 \pm 0,5$ nmol/mg de proteína) (**figura 37, 3º par de barras**). Na ausência de Ca^{2+} houve redução ainda maior na liberação de glutamato em comparação ao estímulo isolado com KCl (60mM) (**figura 37, 4º par de barras**).

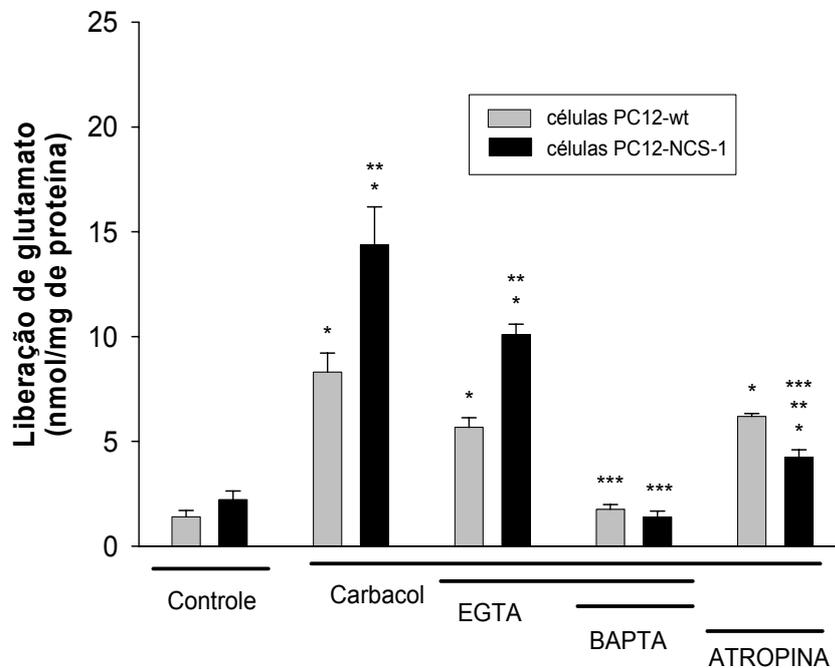


Figura 31: Liberação de glutamato por células PC12-wt e PC12-NCS-1 estimuladas com CCH.

As células não estimuladas foram utilizadas para quantificação da liberação basal de glutamato (controle). Células PC12 diferenciadas foram estimuladas durante 15 min à 37°C com CCH (300µM), CCH em presença de EGTA (2mM), CCH e EGTA nas células previamente incubadas com BAPTA-AM (10µM) por 20min, CCH em presença de atropina (10µM). A liberação de glutamato foi expressa pela média dos valores registrados em nmol/mg de proteína. Pelo menos três experimentos independentes foram realizados em duplicatas. Diferença estatística para test *t-student* (não pareado) com $P < 0,05$. * comparação com as condições basais; ** comparação da liberação de glutamato entre as células PC12-wt e PC12-NCS-1, *** comparação com estímulo isolado de CCH.

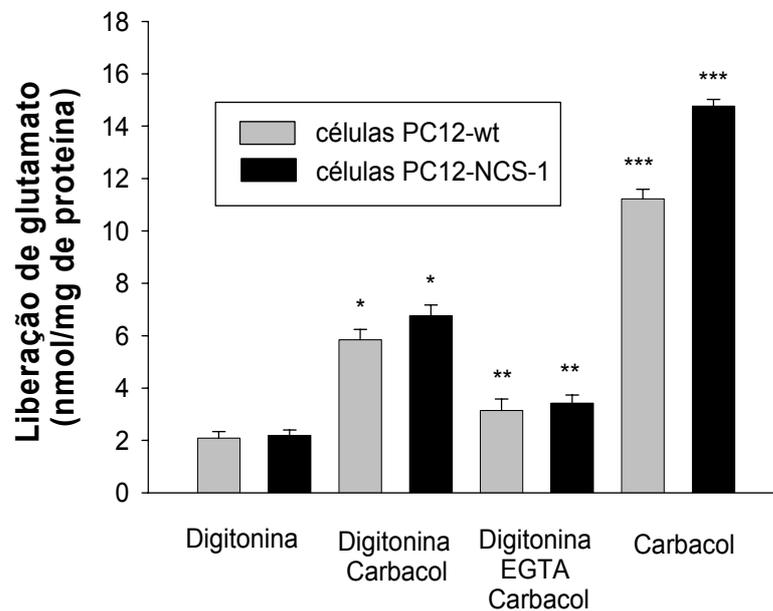


Figura 32: Liberação de glutamato em células PC12-wt e PC12-NCS-1 permeabilizadas com digitonina.

Células PC12 diferenciadas foram permeabilizadas durante 6min com digitonina (6 μ M) e, posteriormente, estimuladas por 15 min à 37°C com CCH (300 μ M) (2^o par de barras), CCH em presença de EGTA (2mM). Células permeabilizadas e não estimuladas foram utilizadas para quantificação da liberação basal de glutamato (1^o par de barras). Células não permeabilizadas foram estimuladas por 15 min à 37°C com CCH (300 μ M) (4^o par de barras). A liberação de glutamato foi expressa como média dos valores em nmol/mg de proteína. Pelo menos, três experimentos independentes foram realizados em duplicatas. Diferença estatística para test *t-student* (não pareado) com $P < 0,001$. * comparação com as condições basais; ** comparação com o estímulo de CCH em condições permeabilizantes. *** $P < 0,0001$ comparação com o estímulo de CCH em condições permeabilizantes

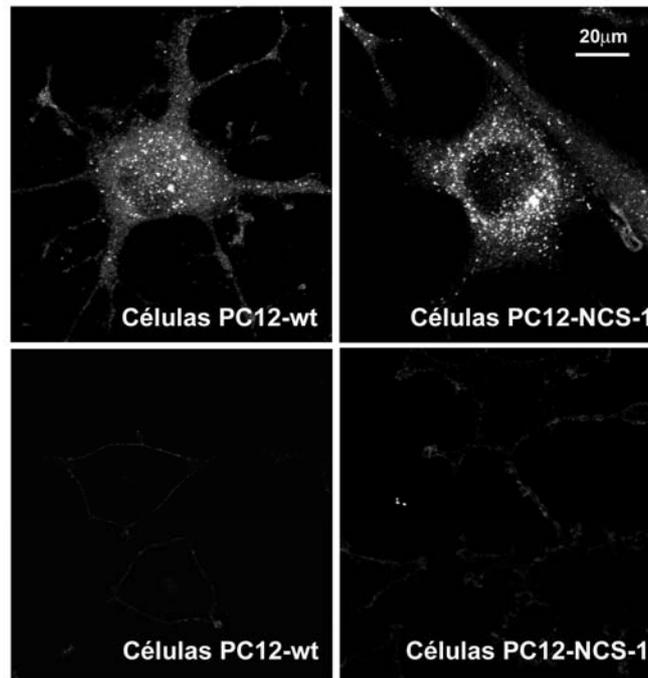


Figura 33: Identificação da expressão endógena e distribuição espacial da proteína VGLUT2 nas células PC12-wt e PC12-NCS-1.

As imagens mostram a expressão endógena do VGLUT2 em células PC12-wt e PC12-NCS-1 através da técnica de imunofluorescência. As células foram incubadas com anticorpo primário anti-VGLUT2 (camundongo) (1:300) e com anticorpo secundário Alexa 488nm conjugado com anti-camundongo (1:300) (painéis superiores). No controle negativo (painéis inferiores), as células foram reveladas apenas com o anticorpo secundário Alexa 488nm conjugado anti-camundongo (1:300). Imagens são representativas de, pelo menos, três experimentos independentes e foram obtidas através da microscopia confocal a partir da excitação à 488nm e coleta da fluorescência de emissão por um filtro à 522/35nm.

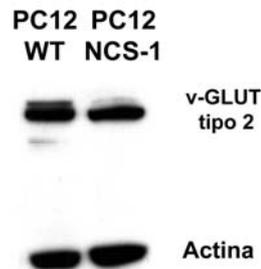


Figura 34: Identificação da proteína VGLUT2 presente no extrato total das células PC12-wt e PC12-NCS-1 através da técnica de *western blot*.

O extrato total das células PC12-wt e PC12-NCS-1 foi submetido às técnicas de eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS e *western blot* (ver métodos). Resumidamente, as membranas foram reveladas com anticorpos primários monoclonais anti-v-GLUT2 (camundongo) (1:1000) e anti-actina (camundongo) (1:1000) e revelada com anticorpo secundário anti-camundongo conjugado à HRP (1:5000) e (1:15000) respectivamente. A detecção das bandas foi obtida pelo processo de quimioluminescência, utilizando o “kit” ECLTM. O mesmo experimento foi repetido utilizando o extrato total de três diferentes lotes das células PC12-wt e PC12-NCS-1.

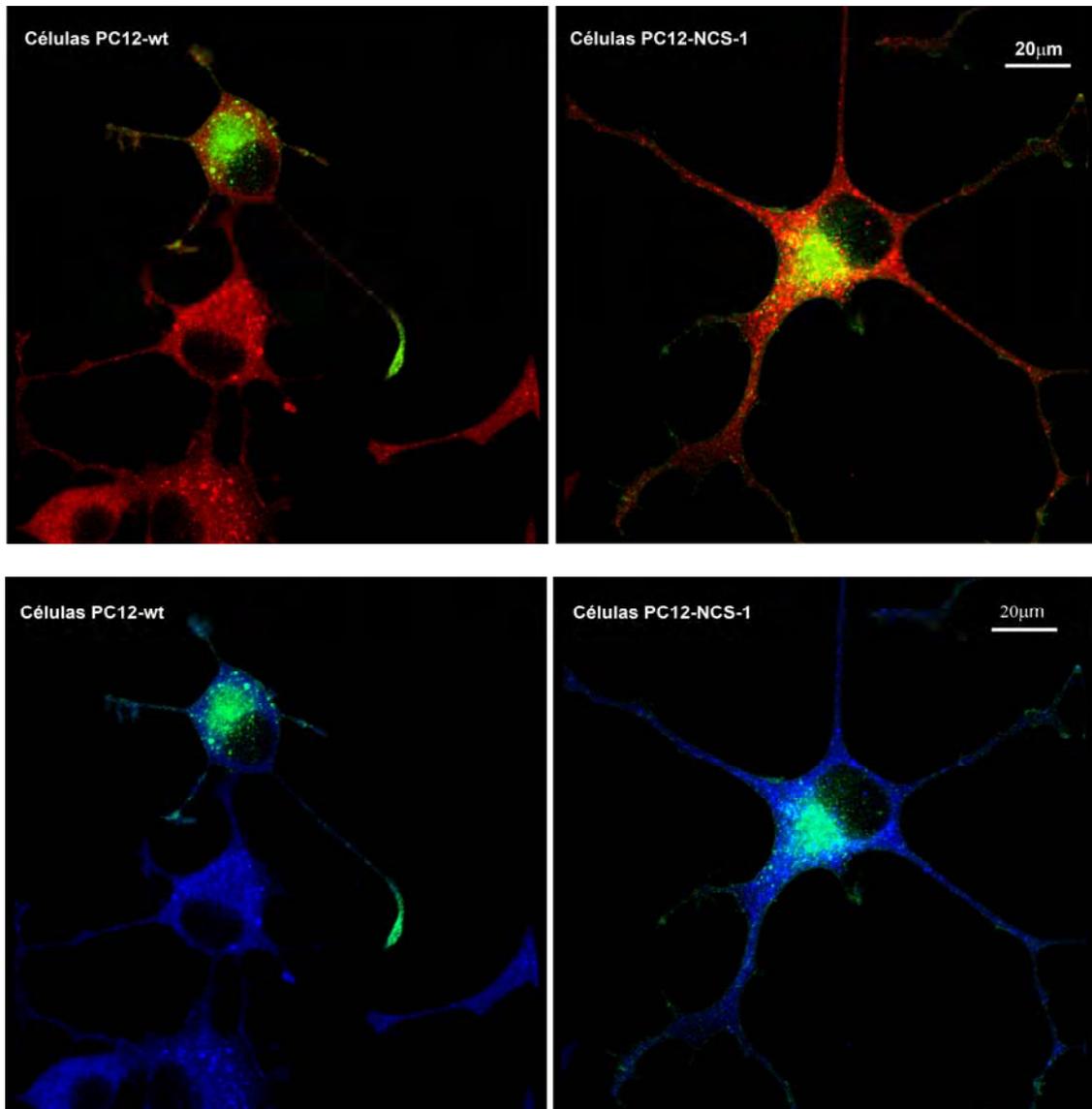


Figura 35: Identificação da proteína VGLUT2 em células PC12-wt e PC12-NCS-1 superexpressando a proteína VAMP-GFP.

Células expressando transitoriamente VAMP-GFP (representada em verde) foram marcadas com anticorpos primários monoclonais anti-VGLUT2 (camundongo) (1:300) (representado em azul ou vermelho) e, posteriormente, reveladas com anticorpo

sencundário anti-camundongo ALEXA 568 (1:200). As imagens foram obtidas por microscopia confocal pela excitação das células à 488 nm e 568 nm e a emissão dos sinais foram coletados por filtros de 522/35 nm e HQ 598/40 nm respectivamente.

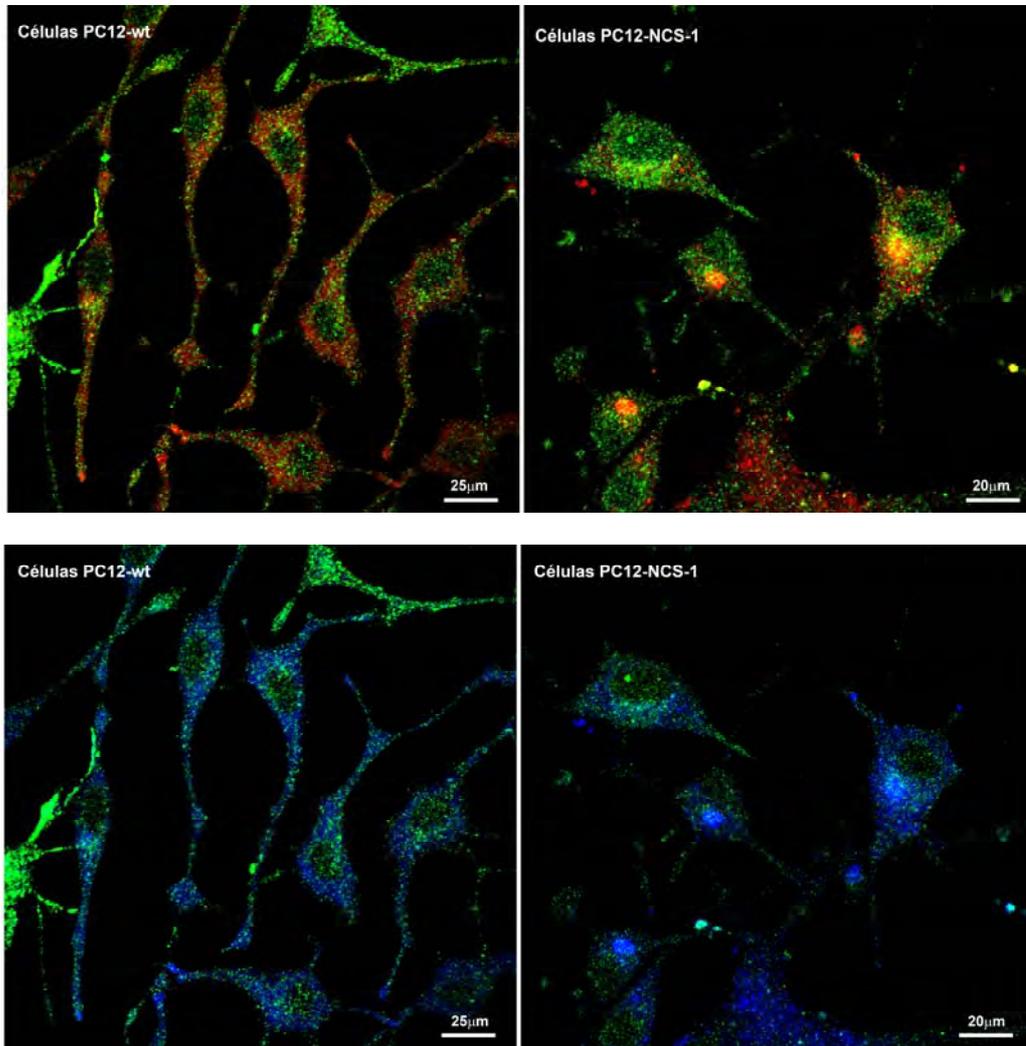


Figura 36: Identificação da expressão e distribuição endógena das proteínas VGLUT2 e VMAT em células PC12-wt e PC12-NCS-1.

As células foram marcadas com anticorpos primários monoclonais anti-VGLUT2 (camundongo) (1:300) (representado em azul ou vermelho) e anti-VMAT tipo 1 (cabra) (1:200) (representado em verde). Posteriormente, foram reveladas com anticorpo secundário anti-camundongo ALEXA 647 (1:200) e anti-cabra ALEXA 488 (1:200),

respectivamente. As imagens foram obtidas por microscopia confocal pela excitação das células à 488 nm e a emissão dos sinais foram coletados por filtros de 522/35 nm.

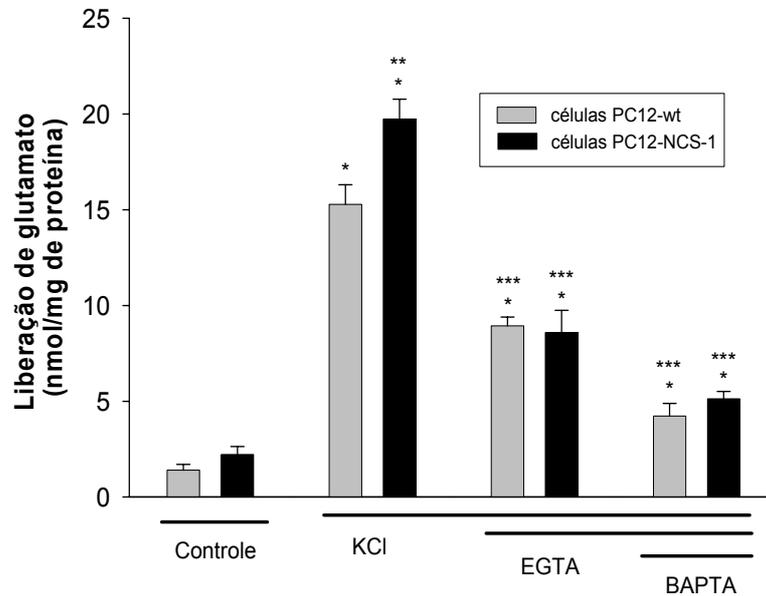


Figura 37: Liberação de glutamato por células PC12-wt e PC12-NCS-1 estimuladas com KCl.

Células PC12 diferenciadas foram estimuladas durante 15 min à 37°C com KCl (60mM) (2º par de barras), KCl em presença de EGTA (2mM) (3º par de barras), KCl e EGTA nas células previamente incubadas com BAPTA-AM (10µM) por 20min (4º par de barras). As células não estimuladas foram utilizadas para quantificação da liberação basal de glutamato (1º par de barras). A liberação de glutamato foi expressa pela média dos valores registrados em nmol/mg de proteína em, pelo menos, três experimentos independentes realizados em duplicatas.* comparação com as condições basais; ** comparação da liberação de glutamato entre as células PC12-wt e PC12-NCS-1, *** comparação com estímulo isolado de KCl. Foi encontrado valor de $P < 0,05$.

Trabalhos sugerem relevância funcional de NCS-1 no controle do tráfego de membranas (Weisz e cols., 2000; Mora e cols., 2002). Embora o nível de NCS-1 em membranas de vesículas sinápticas seja baixo, alguns autores sugerem que esta proteína seja capaz de recrutar um número grande das mesmas, facilitando, conseqüentemente, o processo de exocitose (Zucker, 2003; Taverna et al., 2007). No modelo celular utilizado nesse trabalho, foi verificada diferença significativa na intensidade de fluorescência entre as células PC12-NCS-1 e PC12-wt marcadas com indicador vesicular conhecido como FM4-64 (**figura 39**). Este biossensor, quando interage com estruturas lipídicas presentes na membrana, altera suas propriedades colorimétricas emitindo fluorescência que pode ser detectada por microscopia confocal. Assim, a incubação das células PC12 com FM4-64 permitiu a observação de marcação pontuada no citoplasma, principalmente nos neuritos, varicosidades e regiões perinucleares o que caracteriza alta atividade constitutiva de exo/endocitose presente nas células neuroendócrinas (**figuras 38 e 39**). Na distribuição espacial observada na **figura 38**, nota-se que as células PC12-NCS-1 apresentam forte intensidade de fluorescência referente à marcação com FM4-64 (30 μ M), preferencialmente, em varicosidades e/ou neuritos. Nas células PC12-wt estas regiões se encontram menos marcadas pelo FM4-64 (**figura 38**). Tais resultados indicam maior acúmulo de vesículas endocíticas nos neuritos e varicosidades nas células PC12-NCS-1 em comparação às células PC12-wt. A análise quantitativa da intensidade média de fluorescência referente ao FM4-64 presente nos neuritos e varicosidades das células PC12-wt (n: 111 células e 1419 marcações) e PC12-NCS-1 (n: 131 células e 1460 marcações) em dois experimentos independentes (**ver métodos**), confirmaram a presença

preferencial de vesículas endocíticas marcadas com FM4-64 nas células PC12-NCS-1 (respectivamente $35,26 \pm 0,81$ u.a.; $45,21 \pm 1,08$ u.a.) (**figura 39**).

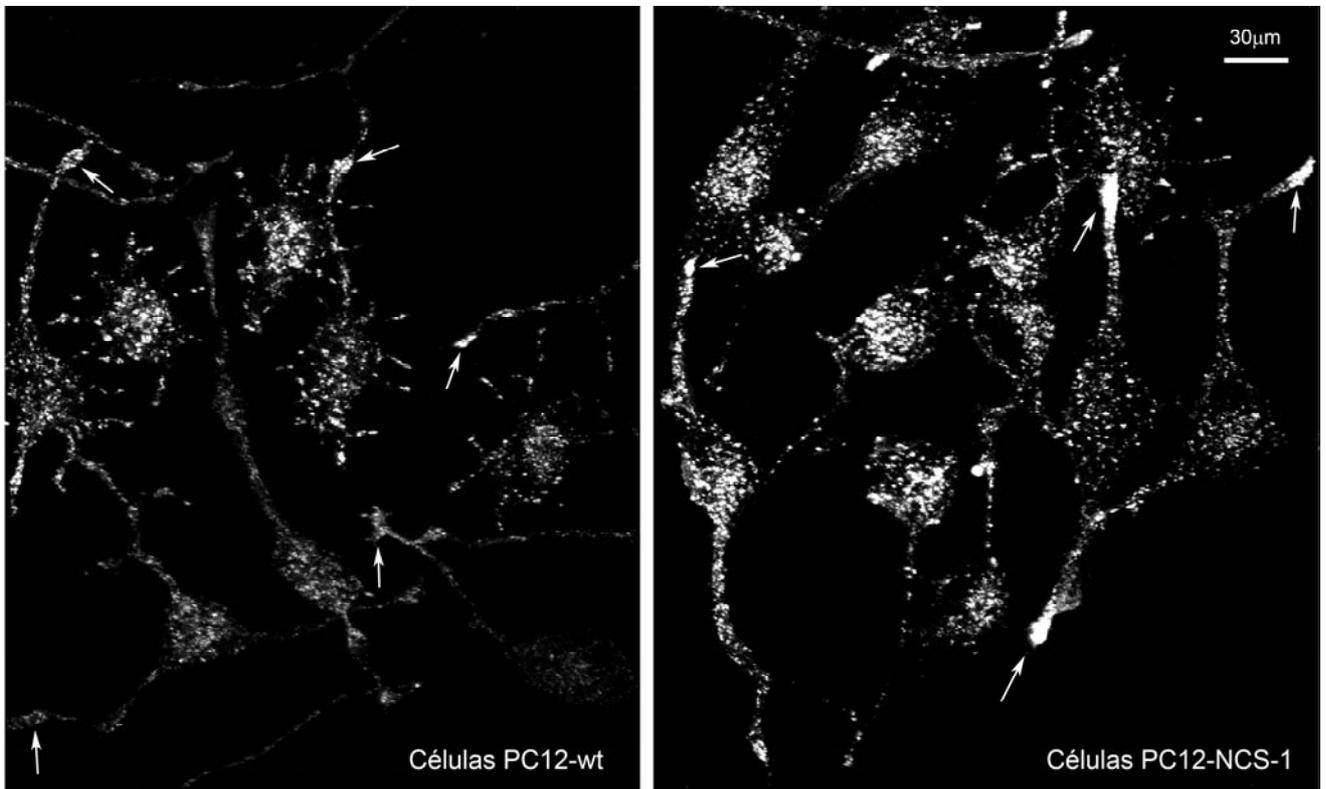


Figura 38: Distribuição das vesículas originadas da endocitose constitutiva nas células PC12-wt e PC12-NCS-1.

As células, diferenciadas durante 7 dias com NGF, foram marcadas com FM4-64 (30µM) 37°C por 12 horas em meio de incubação contendo Ca^{2+} (2mM). Posteriormente, foram analisadas através da microscopia confocal excitando o campo celular à 568 nm. A fluorescência emitida pelo FM4-64 foi coletada através do filtro HQ 598 nm. A imagem representada foi obtida por sobreposição de 5 fatias óticas (z step: 0,54µm, iris de 2,5) por meio de uma série Z. As setas indicam a distribuição de vesículas endocíticas presentes nos neuritos das células PC12-wt e PC12-NCS-1.

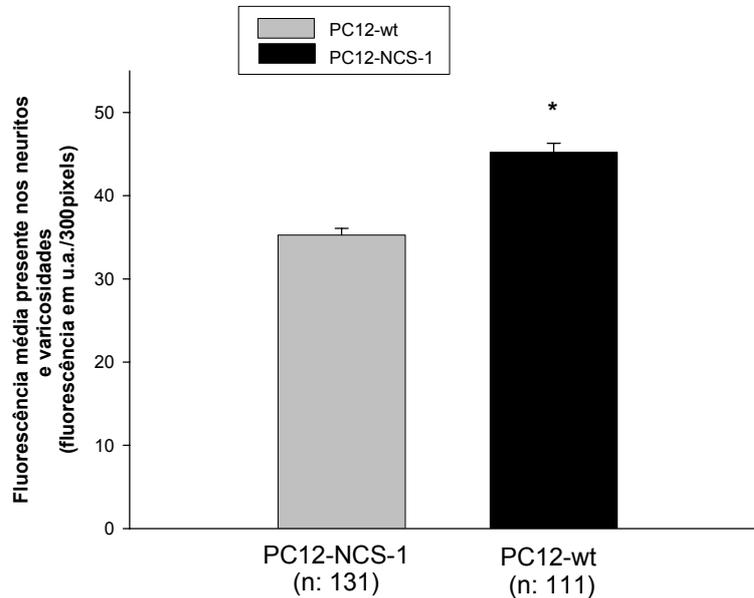


Figura 39: Análise quantitativa da fluorescência presente nos neuritos e varicosidades das células PC12-wt e PC12-NCS-1.

A análise das imagens foi realizada a partir da seleção de regiões de interesse de tamanho constante (300 *pixels*) nos neuritos e varicosidades das células PC12-wt (1419 marcações) e PC12-NCS-1(1460 marcações). Foi utilizado o “software” “Metamorph Image Analysis Program” (Universal Imaging - West Chester, PA, USA) para realização das análises. As barras indicam a fluorescência média das regiões de interesse selecionadas em 111 células PC12-wt e 131 células PC12-NCS-1 distribuídas em experimentos realizados em dois dias independentes. Foi encontrado valor de $P < 0,001$.

Outros trabalhos demonstraram o envolvimento entre NCS-1 e a proteína fosfatidilinositol 4-cinase do tipo β (PI4K- β) (Hendricks e cols., 1999; Weisz e cols., 2000; Zhao e cols., 2001). Em células PC12, NCS-1 interage estruturalmente com PI4K- β , ativando-a. Isto porque quelantes de Ca^{2+} ou construções mutantes de NCS-1 impediram a ativação dos processos dependentes de PI4K (Taverna e cols., 2002; Zheng e cols., 2004; De Barry e cols., 2006). Ações conhecidas desta proteína mostram sua participação na formação de PIP2 de membrana, exocitose e tráfego intracelular (Huijbregts e cols., 2000; Cremona e De Camilli, 2001). Também já foi demonstrado, através de experimentos utilizando [^3H]inositol, que células β -pancreáticas apresentavam maiores índices de produção de PIP2 quando superexpressavam NCS-1 e PI4K- β (Gromada e cols., 2005). Assim, neste trabalho, avaliou-se o envolvimento de PI4K no processo de facilitação do deslocamento do domínio $\text{PH}_{\text{PLC}\delta}\text{EGFP}$ para o citoplasma observado nas células PC12-NCS-1. Para isso, as células PC12-wt e PC12-NCS-1, transfectadas transitoriamente com o domínio $\text{PH}_{\text{PLC}\delta}\text{EGFP}$, foram pré-incubadas durante 15 min com wortmanina (5 μM), inibidor de PI4K. Posteriormente, as células foram estimuladas com CCH (300 μM) em presença da wortmanina (**figura 40**). Houve redução do deslocamento citosólico do domínio $\text{PH}_{\text{PLC}\delta}\text{EGFP}$ tanto nas células PC12-wt quanto nas células PC12-NCS-1 estimuladas com CCH em presença da wortmanina (**figura 40**).

Ao se utilizar outra ferramenta experimental para verificar a participação da PI4K β na facilitação do deslocamento do domínio $\text{PH}_{\text{PLC}\delta}\text{EGFP}$ observado nas células PC12-NCS-1, não foram confirmados os resultados anteriores obtidos com a inibição da PI4K pela wortmanina (**figura 40**). Neste experimento, as células PC12-wt e PC12-NCS-

1 foram co-transfectadas com vetores contendo a sequência de PI4K e do domínio PH_{PLC8}EGFP. Em etapa posterior, as células foram submetidas ao estímulo com CCH (300µM). A análise identificou, nestas condições experimentais, que a superexpressão da PI4K impediu o aumento dos níveis citoplasmáticos de PH_{PLC8}EGFP responsivos nas células PC12-NCS-1 (**figura 41**).

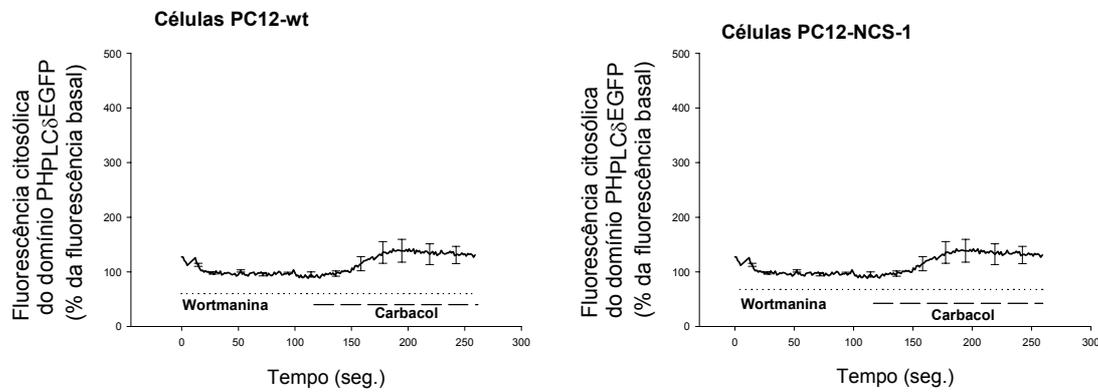


Figura 40: Dinâmica do domínio PH_{PLC8}EGFP em células PC12-wt e PC12-NCS-1 estimuladas com CCH na presença de um agente inibidor da enzima PI4K β .

Células PC12-wt e PC12-NCS-1 transfectadas com o domínio PH_{PLC8}-EGFP foram pré-incubadas com wortmanina (5 μ M) durante 15 minutos e estimuladas com CCH (300 μ M) na presença contínua de wortmanina. Uma R.I. foi selecionada no citoplasma das células a fim de se obter os registros da intensidade de fluorescência do domínio PH_{PLC8}EGFP durante todo o período experimental. As curvas representam o cálculo da média da R.I. (F/F_o em % \pm EPM) das células analisadas em pelo menos, três experimentos independentes.

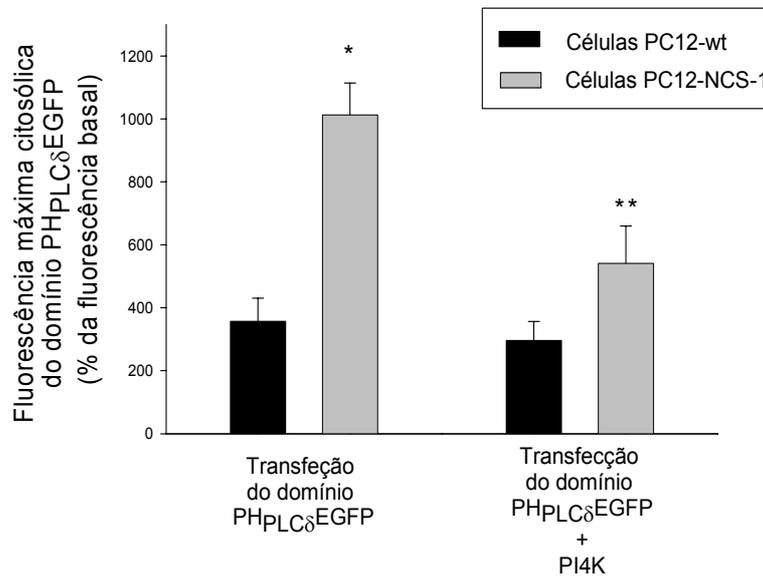


Figura 41: Efeito da superexpressão da PI4K β no deslocamento do domínio PH_{PLCδ}EGFP em células PC12-NCS-1 e PC12-wt.

Células foram co-transfectadas com PI4K β + PH_{PLCδ}EGFP (na razão de 4 μ g do vetor contendo PI4K para 1 μ g de vetor contendo a sequência do domínio PH_{PLCδ}EGFP) e, dois dias após a transfecção foram estimuladas com CCH (300 μ M). O gráfico de barras representa a média da fluorescência máxima no citoplasma após o estímulo com CCH (300 μ M). A análise estatística foi realizada através do teste *t student* não pareado. Foram encontrados diferença significativa para * $P < 0,001$ e ** $P < 0,0001$ em comparação às células PC12-wt.

5.1 Modelo de células PC12 expressando altos níveis de NCS-1

A superexpressão de NCS-1 em células PC12 foi capaz de provocar a potenciação da liberação de hormônio de crescimento, de dopamina e de outras aminas (McFerran e cols., 1998; Koizume e cols., 2002; Taverna e cols., 2002; Rajebhosale e cols., 2003; Gromada e cols., 2005). Por isso, os mecanismos pelos quais a proteína NCS-1 controla a liberação de neurotransmissores tem sido estudado a partir do modelo de células PC12 ou cromafins. No presente trabalho, controles experimentais foram realizados através de técnicas de imunofluorescência e *western blot* uma vez que foi necessário acompanhar os níveis de expressão de NCS-1 nas células PC12-wt e PC12-NCS-1 à medida que novos lotes celulares eram descongelados para realização dos experimentos (**ver figuras 6 e 7**). Verificou-se que as alíquotas de células descongeladas mantinham níveis aumentados de NCS-1 nas células PC12-NCS-1 até décima quinta passagem, condição esta em que uma nova alíquota deveria ser descongelada para realização dos experimentos necessários. Outras proteínas como o próprio receptor muscarínico do tipo 1 e PLC β também foram identificadas nas células PC12-wt e PC12-NCS-1 através das técnicas de imunofluorescência e *western blot* (**ver figuras 8, 9, 10 e 11**) já que era importante confirmar se o modelo utilizado apresentava proteínas participantes da ativação da via de sinalização muscarínica. Dessa forma, a triagem contínua da expressão de proteínas como NCS-1, receptores muscarínicos e PLC- β permitiu a utilização das células PC12-wt e PC12-NCS-1 como modelo para estudo comparativo do envolvimento de NCS-1 nos diferentes processos celulares (nesse caso, hidrólise/formação PIP2/InsP3 respectivamente, dinâmica do Ca²⁺ intracelular e liberação de mediadores químicos) ativados pela via muscarínica.

5.2 Alterações na dinâmica de hidrólise/formação de PIP₂/InsP₃ em células PC12-wt e PC12-NCS-1 estimuladas com CCH

Este estudo iniciou-se com o objetivo de compreender melhor a dinâmica de hidrólise/formação de PIP₂/InsP₃, induzida pelo CCH, em células expressando estavelmente altos níveis de NCS-1. Os resultados obtidos por Koizume e colaboradores (2002) já haviam demonstrado que células PC12 superexpressando NCS-1 e estimuladas com agonistas purinérgicos apresentaram aumento de [³H]-PIP₂ e [³H]-InsP₃. A técnica utilizada na obtenção desses resultados consistiu na incubação das células com myo-[³H]inositol seguido de estímulo com agonista purinérgico, separação por cromatografia e quantificação dos níveis de [³H]-PIP₂, [³H]-InsP₃ radiativo.

Diversos grupos de pesquisa utilizam o domínio PH_{PLC δ} EGFP como biossensor capaz de detectar, indiretamente, hidrólise e formação PIP₂/InsP₃, respectivamente, em resposta à ativação de receptores acoplados à proteína G (Stauffer e cols., 1998; Varnai e Balla, 1998; Hirose e cols., 1999; Nash e cols., 2001; Nahorski e cols., 2003; Bartlett e cols., 2005). Este domínio apresenta vinte vezes mais afinidade por InsP₃ em comparação à PIP₂, tornando-o uma ferramenta confiável de estudo para determinação da formação de InsP₃ em tempo real e células individualizadas (Hirose e cols., 1999). Em condições basais, o domínio PH_{PLC δ} EGFP se encontra predominantemente na membrana plasmática. À medida que InsP₃ vai sendo formado é possível acompanhar a redistribuição do domínio para o citoplasma e, em algumas situações, para o núcleo. A observação desse biossensor através de um sistema de microscopia confocal e coleta de imagens permitiu-nos tanto a visualização espacial de distribuição de PIP₂ em células individualizadas, quanto o acompanhamento do curso temporal, em uma região de interesse selecionada no citoplasma. Dessa forma, variações de fluorescência do

domínio PH_{PLC δ} EGFP registradas indicaram, indiretamente, flutuações citoplasmáticas de InsP₃ ao longo do experimento (**ver figuras 6 e 7**).

A princípio, foram testadas diferentes concentrações de CCH em células não diferenciadas. Não foi observado deslocamento do domínio PH_{PLC δ} EGFP com as seguintes doses de CCH (10, 50, 100 e 300 μ M) (dados não mostrados). No entanto, após a diferenciação com NGF (**ver métodos**) o estímulo com 300 μ M foi capaz de induzir resposta em 70-80% das células PC12-wt e PC12-NCS-1. Dessa maneira, o tratamento das células com NGF induziu diferenciação celular com alterações de expressão e distribuição de proteína, tornando-as responsivas ao estímulo com CCH. No entanto, análise do extrato protéico das células PC12-wt e PC12-NCS-1 pela técnica do *western blot* mostrou que mesmo aquelas não diferenciadas também expressavam receptores muscarínicos (**figura 9**). De modo que não é pela ausência dos mesmos que as células não diferenciadas foram incapazes de responder ao estímulo com CCH, mas provavelmente porque estes não se encontravam na superfície celular.

Sabe-se que fatores de crescimento como o NGF, recrutam cinases de fosfoinositídeos (PIK) para regiões celulares específicas, normalmente estruturas membranosas. Como as PIK se tratam de enzimas responsáveis pelo metabolismo de fosfoinositídeos, elas contribuem para o aumento da formação de PIP2 em sítios localizados da membrana plasmática (Doughman e cols., 2003; Oude Weernink e cols., 2004; Santarius e cols., 2006). Os fosfoinositídeos, como PIP2, são importantes peças reguladoras da localização e função protéica, uma vez que apresentam domínios de ligação a proteínas adaptadoras. Estas formam, junto com fosfolípidos, microdomínios especializados na regulação da atividade enzimática, da afinidade e estados conformacionais de diferentes proteínas integrais (revisado por Di Paolo e De Camilli, 2006; Polo e Di Fiore, 2006; Varnai e cols., 2006; Krauss e Haucke, 2007).

A distribuição intracelular do domínio PH_{PLC δ} EGF nas células PC12-wt e PC12-NCS-1 diferenciadas com NGF apresentou-se alterada em comparação as células não diferenciadas. Nestas, a distribuição do domínio PH_{PLC δ} EGF foi homogênea ao longo da membrana plasmática (dados não mostrados). Já nas primeiras, apesar de o domínio se distribuir ao longo de toda membrana plasmática, houve acúmulo preferencial em regiões correspondentes a junções entre os neuritos e varicosidades (**figura 13**). Nas células tratadas com NGF, tais diferenças na distribuição do domínio PH_{PLC δ} EGFP poderiam sugerir a formação de regiões com acúmulo de PIP2 contendo receptores muscarínicos e PLC β , justificando uma melhor eficiência na resposta do domínio PH_{PLC δ} EGFP ao estímulo com CCH (300 μ M); principalmente nas células PC12-NCS-1. Foi realizada também análise comparativa da distribuição e expressão de PLC- β nas células PC12-wt e PC12-NCS-1 diferenciadas com NGF (**ver métodos e figuras 10 e 12**). PLC- β em células diferenciadas apresentou distribuição não homogênea com acúmulo, principalmente, em regiões correspondentes aos cones de crescimento e formação de neuritos. Análise quantitativa (**figura 12**) mostrou expressão similar de PLC- β nos neuritos tanto das células PC12-wt quanto das células PC12-NCS-1. Embora a facilitação da dinâmica de hidrólise/formação de PIP2/InsP₃ seja dependente da atividade da PLC (**ver figura 21**), os resultados de imunofluorescência e *western blot* indicam que o aumento da expressão da NCS-1 não foi capaz de interferir no perfil de expressão e distribuição dessa proteína.

Na tentativa de quantificação dos níveis de PIP2 e InP₃ induzidas pelo CCH através da técnica de marcação das células PC12-wt e PC12-NCS-1 com o myo-[³H]inositol radioativo e quantificação dos níveis de [³H]-InP₃, os resultados obtidos apresentaram grande variação entre os experimentos independentes. Os resultados foram expressos em porcentagem de [³H]-InsP₃ por uma quantidade fixa de células (2,5

x 10⁵ células) (**ver figura 17**). Provavelmente, a quantificação de [³H]-InsP₃, em % por mg de proteína, resultaria em um erro menor. Novos experimentos quantitativos serão necessários para a determinar com maior precisão as diferenças nos níveis intracelulares de InsP₃ formados nas células PC12-wt e PC12-NCS-1 estimuladas com CCH por meio da técnica utilizando myo-[³H]inositol.

Estudos funcionais a respeito de NCS-1 têm demonstrado que a facilitação da exocitose desencadeada por esta proteína, em muitos modelos celulares, depende de vias associadas à ativação da PI4K β . Esta enzima é umas das responsáveis pela formação de PIP₂ de membrana. Embora Sippy e colaboradores (2003) tenham mostrado que NCS-1 é capaz de facilitar a exocitose em neurônios hipocâmpais de ratos através de uma via independente de PI4K, sabe-se que em células neuroendócrinas e pancreáticas, a facilitação da liberação de neuromoduladores ou hormônios é dependente da PI4K β (Hendricks e cols., 1999; Taverna e cols., 2002; Rajebhosale e cols., 2003; Gromada e cols., 2005; de-Barry e cols., 2006). Em células neuroendócrinas, inibidores da PI4K impediram a facilitação da exocitose induzida pela superexpressão de NCS-1 (Taverna e cols., 2002; Rajebhosale e cols., 2003).

Um dos nossos interesses foi investigar se a ativação muscarínica das células PC12-NCS-1 estaria associada à ativação de PI4K β . Os resultados obtidos por meio da utilização da wortmanina indicaram que PI4K β parece contribuir para a facilitação da dinâmica de fosfoinosítois observada nas células PC12-NCS-1 (**figura 40**). A superexpressão de PI4K β (através da transfecção transitória das células com vetor plasmidial apresentando o sequência codificadora da PI4K β) foi incapaz de aumentar o deslocamento do domínio PH_{PLC δ} EGFP tanto nas células PC12-wt quanto nas células PC12-NCS-1 (**ver figura 41**). Contrariando resultados de análise do deslocamento do domínio PH_{PLC δ} EGFP em presença da wortmanina (**ver figura 40**), a superexpressão

transitória de PI4K β parece ter contribuído para o bloqueio da facilitação do deslocamento do domínio PH_{PLC δ} EGFP, característico das células PC12-NCS-1 (**figura 41**). Em células PC12-wt, a expressão transitória de PI4K β não alterou o deslocamento citoplasmático do domínio PH_{PLC δ} EGFP após o estímulo com CCH (**figura 41**). Resultados publicados Zhao e colaboradores (2001), utilizando ATP marcado com γ -[³²P]-ATP, mostraram que a superexpressão transitória de PI4K β em células COS-7 foi capaz de aumentar a incorporação de [³²P]-fosfato em PI(4)P, mas não em PIP2. Desse modo, é também possível que a superexpressão da PI4K β não tenha sido capaz de ativar a produção adicional de PIP2, além da quantidade induzida pela PI4K β endógena, no modelo das células PC12.

5.3 Diferenças na dinâmica e $[Ca^{2+}]_i$ nas células PC12-NCS-1 e PC12-wt estimuladas com CCH

O estudo dos perfis de controle da $[Ca^{2+}]_i$ não somente tem contribuído para o entendimento dos aspectos básicos sobre a regulação das funções celulares e neuronais, mas também poderá esclarecer alguns dos mecanismos de sinalização celular em condições patológicas como nos processos de isquemia, hiperexcitabilidade neuronal, morte celular etc (LaFerla, 2002; Lidow, 2003; Mattson e Chan, 2003). Além de um grande número de trabalhos mostrando alterações dos níveis de Ca^{2+} livre no citoplasma, a compreensão sobre a transdução de sinais relacionados à $[Ca^{2+}]_i$ em respostas celulares específicas se torna mais clara e detalhada pelo entendimento das interações de tais íons com proteínas sensoras de Ca^{2+} (Burgoyne e cols., 2004; Burgoyne, 2007).

Em nosso trabalho, as variações intracelulares de Ca^{2+} nas células PC12-NCS-1 e PC12-wt estimuladas com CCH mostraram padrões distintos entre os dois grupos. Ficou evidente, que a ativação colinérgica induziu perfis de resposta distintos entre as células PC12-NCS-1 e PC12-wt em comparação aos experimentos realizados por Koizume e cols., 2002 (**comparar figuras 22, 23 e 24 e Koizume e cols., 2002**). Nestes, a entrada de Ca^{2+} induzida por UTP apresentou perfil idêntico de aumento e decaimento na $[Ca^{2+}]_i$ tanto nas células PC12 selvagens quanto nas células PC12-NCS-1. Somente o pico da $[Ca^{2+}]_i$ nas células superexpressando NCS-1 foi maior em comparação às células selvagens. A grande diferença encontrada no presente trabalho, comparada aos resultados de Koizume e colaboradores (2002), pode ser notada ao analisar o perfil de resposta das células PC12-wt submetidas ao estímulo colinérgico (**figuras 22 e 23**), uma vez que essas apresentaram uma fase lenta de decaimento da $[Ca^{2+}]_i$ característica de um platô de Ca^{2+} intracelular.

Provavelmente os mecanismos que explicam distintos perfis na $[Ca^{2+}]_i$ encontrados nos dois tipos celulares podem ser analisados através de alguns resultados já descritos na literatura e que mostraram, em diversos modelos, que NCS-1 é capaz de alterar a atividade de diferentes subtipos de canais de Ca^{2+} (Weiss e cols., 2000; Weiss e Burgoyne, 2001; Tsujimoto e cols., 2002; Hui e cols., 2006). Embora a infusão direta de NCS-1 nas terminações pré-sinápticas do *Calyx of Held* (Tsujimoto e cols., 2002) esteja relacionada ao aumento das correntes de Ca^{2+} pelos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem do tipo P e Q, Weiss e colaboradores (2000) demonstraram, em células cromafins, que a superexpressão de NCS-1 reduziu a atividade de canais de Ca^{2+} ativados de forma independente de voltagem (denominados “*non-L type Ca²⁺ channels*”). Em 2001, Weiss e Burgoyne mostraram em células cromafins que NCS-1 foi capaz de inibir correntes de Ca^{2+} do tipo P e Q através de mecanismos independentes de voltagem. Neste trabalho, tanto o estímulo com ATP como com agonistas opióides induziram inibição desses canais. Comparando tais resultados já descritos com os resultados encontrados pelo nosso grupo, sabe-se que a etapa caracterizada pelo decaimento rápido na $[Ca^{2+}]_i$ observado nas células PC12-NCS-1 estimuladas com CCH (**figuras 22 e 23**), poderia ser explicada pela capacidade de NCS-1 em impedir a atividade de canais de Ca^{2+} presentes nas células PC12. Do mesmo modo, a dinâmica encontrada nas células PC12-wt caracterizada pelo perfil de *platô* corrobora tal hipótese já que, neste caso, o aumento da $[Ca^{2+}]_i$ parece ter origem predominante do meio externo. Interessantemente, os experimentos realizados na ausência de Ca^{2+} extracelular e intracelular, utilizando EGTA e BAPTA, respectivamente, mostraram a abolição do *platô* observado nas células PC12-wt estimuladas com CCH. A diferença marcante entre os dois tipos celulares é que a $[Ca^{2+}]_i$ da fase *platô* nas células PC12-wt tem origem no meio extracelular, já o decaimento rápido na $[Ca^{2+}]_i$ observado nas células

PC12-NCS-1 provavelmente seja resultado da inibição da atividade dos canais de Ca^{2+} presentes na membrana plasmática.

Outra via de entrada de Ca^{2+} nas células PC12 se deve à ativação de receptores TRP (*transient receptor potential*). Em 2004, Ohta e colaboradores demonstraram a expressão endógena desses receptores em células PC12. Estes apresentam estrutura de canais permeáveis a cátions (Ca^{2+} , Na^+) e que podem ser ativados pela via dependente do acoplamento GPCR-Gq-PLC, por mensageiros lipídicos como PIP2 e receptores de InsP_3 (Kiselyov e cols., 1998; Hardie, 2007; Nilius e cols., 2007). Tais receptores foram originalmente descobertos em *Drosophila* e compreendem uma diversidade de subfamílias, dentre elas sete são mais estudadas: TRPC (*Canonical*), TRPV (*Vanilloid*), TRPM (*Melastatin*), TRPML (*mucolipin*), TRPP (*Polycystin-2, PKD2*), TRPA (*ANKTM*), TRPN (*NompC*) (Hardie, 2007). A subfamília TRPC é expressa no sistema nervoso central e está envolvida com o desenvolvimento do cone de crescimento neural. O subtipo TRPC5 é capaz de regular a extensão de neuritos hipocâmpais, além de interferirem no mecanismo do tráfego rápido de vesículas (Strubing e cols., 2001; Greka e cols., 2003; Bezzerides e cols., 2004). Trabalho publicado por Zhu e colaboradores em 2005 demonstrou que a atividade muscarínica está associada à rápida dessensibilização dos receptores TRPC5. Inicialmente, estes foram ativados através da estimulação dos receptores muscarínicos induzida por CCH. Posteriormente as correntes de Ca^{2+} mediadas pelos TRPC5 decaíram rapidamente mesmo na presença de CCH. Sabe-se que em células PC12, a superexpressão dos subtipos TRPC5 está relacionada ao aumento e decaimento rápidos da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ após o estímulo de receptores GPCR como os receptores de bradicinina e purinérgicos (Ohta e cols., 2004). Interessante observar que experimentos de duplo híbrido e imunoprecipitação realizados por Hui e colaboradores (2006) mostraram que NCS-1 é capaz de se associar fisicamente ao receptor TRPC5;

induzindo, através dessa interação, aumento na $[Ca^{2+}]_i$. Observando os resultados do presente trabalho, é também possível supor que NCS-1 nas células PC12-NCS-1 esteja interferindo na dinâmica e na $[Ca^{2+}]_i$ através de uma via não somente dependente de canais de Ca^{2+} regulados por voltagem, como foi explicado anteriormente, mas também através de uma via dependente da ativação de TRP. Neste caso, o trabalho de Ohta e colaboradores (2004) mostrou que a presença endógena de RNAm dos receptores TRPC1 e TRPC3, subtipos estruturalmente homólogos à TRPC5, poderiam estar associados ao decaimento rápido da $[Ca^{2+}]_i$ observado nas células PC12-NCS-1, assim como foi observado por Hui e colaboradores (2006) em relação ao subtipo TRPC5 (**ver figura 42**).

O aumento dos níveis de hidrólise/formação de $PIP_2/InsP_3$ observado pelo aumento na translocação do domínio $PH_{PLC\delta}EGFP$ em células PC12-NCS-1 se correlaciona ao aumento da $[Ca^{2+}]_i$ observado nessas células. No entanto, na ausência de Ca^{2+} de origem extracelular a translocação máxima domínio $PH_{PLC\delta}EGFP$ nas células PC12-NCS-1 se aproxima dos níveis observados nas células PC12-wt, indicando que os níveis de produção de $InsP_3$ nas células PC12-NCS-1 está reduzido na ausência do Ca^{2+} de origem extracelular (**comparar figuras 14-inset e 27**). Nos experimentos de análise da dinâmica e $[Ca^{2+}]_i$, sob a ativação muscarínica, na ausência do Ca^{2+} de origem extracelular, demonstrou-se perfis e picos similares de Ca^{2+} nas células PC12-wt e PC12-NCS-1 ($328,34 \pm 21,4$; $361,58 \pm 38,31$ nM de Ca^{2+} , respectivamente) (**ver figura 25**), indicando uma predominância da interferência de NCS-1 sobre a produção de $InsP_3$ através de mecanismos associados à facilitação da entrada de Ca^{2+} através dos canais presentes na membrana plasmática.

Diferente do que foi mostrado por Schlecker e colaboradores (2006) e de acordo com os resultados descritos anteriormente (**ver figura 25**), o pico máximo na $[Ca^{2+}]_i$

alcançado nas células PC12-NCS-1 não parece ter origem na ação direta de NCS-1 sobre os receptores de InsP_3 . De acordo com o trabalho do Schlecker e colaboradores (2006), NCS-1 é capaz de interagir diretamente com receptores de InsP_3 induzindo aumento das correntes de Ca^{2+} originadas dos mesmos. No entanto, como os picos máximos da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nas células PC12-wt e PC12-NCS-1 estimuladas com CCH na ausência do Ca^{2+} extracelular foram similares (**ver figura 25**), não é provável, no modelo de células PC12-NCS-1, que o estímulo da via muscarínica induza a associação entre NCS-1 e os receptores InsP_3 , como mostrado no trabalho de Schlecker e colaboradores (2006). Caso o seja, é possível que a entrada de Ca^{2+} a partir do meio extracelular seja necessária para ativação de NCS-1 e sua consequente interação funcional com os receptores de InsP_3 .

Outra evidência que apoia fortemente a interferência de NCS-1 na atividade dos receptores TRP, foi demonstrada por meio de experimentos realizados em células PC12-NCS-1 e PC12-wt expressando transitoriamente domínio $\text{PH}_{\text{PLC}_\delta}$ EGFP e submetidas ao estímulo com CCH na presença de 2APB (**ver figuras 29 e 30**). Sabe-se que essa substância é um bloqueador inespecífico tanto dos estoques intracelulares sensíveis à InsP_3 quanto dos receptores TRP (Maruyama e cols., 1997; Missiaen e cols., 2001; Lievremont e cols., 2005). Lievremont e colaboradores (2005) sugerem que em células não permeabilizadas o bloqueador 2APB é incapaz de inibir os receptores de InsP_3 , sendo assim mais efetivo no bloqueio de receptores TRPC, especialmente TRPC3. Provavelmente o bloqueio significativo da facilitação da translocação do domínio $\text{PH}_{\text{PLC}_\delta}$ EGFP nas células PC12-NCS-1 submetidas ao estímulo com CCH na presença de 2APB esteja associado à inibição da entrada de Ca^{2+} através dos canais TRP e não necessariamente aos receptores de InsP_3 (**figuras 29 e 30**). Além disso, foi demonstrado que receptores TRPC3 expressos estavelmente em células HEK293,

apresentam interação funcional com os receptores InsP3 após estímulo das células com CCH (Kiselyov e cols., 1998). Considerando estas evidências, uma vez expressos endogenamente em células PC12, os receptores TRPC3 parecem realmente contribuir com os mecanismos de facilitação da produção de InsP3 e entrada de Ca^{2+} nas células PC12-NCS-1.

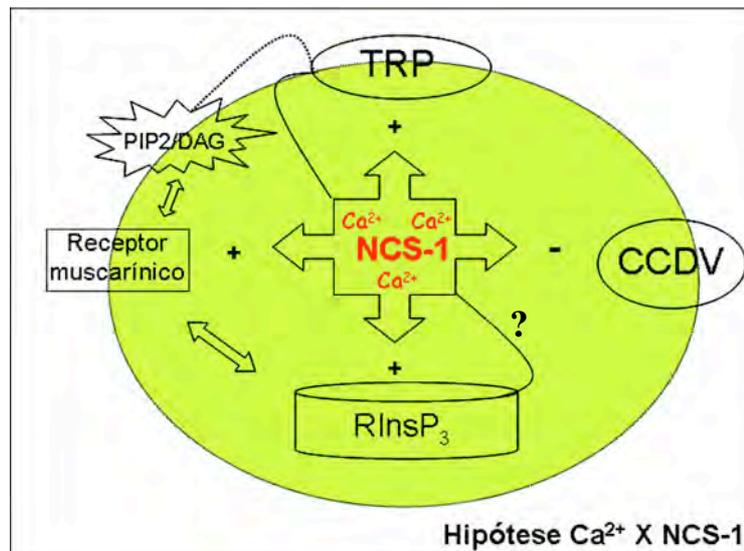


Figura 42: Hipótese Ca²⁺ X NCS-1

Hipótese sugerida da interação funcional e estrutural de NCS-1 com a maquinaria de regulação dos níveis intracelulares de Ca²⁺ em células PC12. Níveis aumentados de NCS-1 parecem estar associados à facilitação da via sinalizatória muscarínica capaz de gerar potenciação de hidrólise/formação de PIP2/InsP₃. NCS-1, capaz de interagir estruturalmente com os receptores TRP, poderia facilitar correntes de Ca²⁺ provindas desses canais. Além disso, o aumento dos níveis de InsP₃ contribui para um *feedback* positivo da [Ca²⁺]_i através de sua interação com os receptores de InsP₃. Por outro lado, em células PC12, NCS-1 é capaz de reduzir correntes de Ca²⁺ originadas dos CCDV e ainda poderia reduzir os níveis de Ca²⁺ livre pela sua própria estrutura apresentando afinidade ao Ca²⁺.

Abreviaturas: TRP, receptores de potencial transitório, CCDV, canais de Ca²⁺ dependentes de voltagem; RInsP₃, receptor sensível à InsP₃.

5.4 Alterações na liberação de glutamato nas células PC12-NCS-1 e PC12-wt estimuladas com CCH

Neste trabalho foi demonstrado, pela primeira vez, que células PC12 expressando altos níveis de NCS-1 apresentam facilitação da liberação de glutamato sob estímulo com CCH. O papel de NCS-1 na liberação de neurotransmissores e outros mediadores químicos já havia sido demonstrado em outros modelos (McFerran e cols., 1998; Koizume e cols., 2002; Taverna e cols., 2002; Rajebhosale e cols., 2003; Gromada e cols., 2005). Um dos primeiros trabalhos sobre as funções exercidas pela frequenina, proteína ortóloga à NCS-1 em *Drosophila melanogaster*, demonstrou sua participação na modulação sináptica em junções neuromusculares (Pongs e cols., 1993). Outro trabalho demonstrou que a superexpressão de NCS-1 em junções neuromusculares de *Xenopus laevis* induziu aumento da eficácia da neurotransmissão por meio da quantificação dos potenciais sinápticos pós-excitatórios utilizando experimentos de eletrofisiologia (Olafsson e cols., 1995). Já em cultura primária de neurônios hipocâmpais de ratos, experimentos de *voltage-clamp* utilizando pulso-pareado demonstraram que a superexpressão de NCS-1 induziu à facilitação da plasticidade de curta duração (“*short-term plasticity*”) das correntes pós-sinápticas excitatórias, sugerindo que NCS-1 tenha recrutado vesículas sinápticas latentes (Sippy e cols., 2003). Em células PC12 e cromafins, a superexpressão de NCS-1 associou-se ao aumento da liberação de dopamina e hormônio de crescimento. Sendo que este aumento foi dependente de fatores como: ativação de GPCR, aumento do influxo de Ca^{2+} para o citoplasma e fusão de vesículas de núcleo denso (*dense core*) (McFerran e cols., 1998; Koizume e cols., 2002; Taverna e cols., 2002; Rajebhosale e cols., 2003).

Quando se compara a liberação de glutamato nas células PC12-NCS-1, induzida por KCl ou CCH, a facilitação correlacionou-se tanto à despolarização das células, quanto

ao estímulo da via dependente de GPCR (**comparar figuras 31 e 37**). Comparando-se o Δ referente ao aumento da liberação de glutamato observado nas células PC12-NCS-1 em relação aos dois estímulos foi verificado que houve aumento de $84,2 \pm 25,6\%$ (n: 7) na liberação de glutamato induzido por CCH nas células PC12-NCS-1 em comparação às células PC12-wt. Já para o estímulo com KCl, o aumento da liberação nas células PC12-NCS-1 foi apenas $35,9 \pm 10,3\%$ (n: 14) maior em comparação às células PC12-wt. Embora a potenciação da liberação de glutamato pareça estar associada principalmente à ativação da via dependente de GPCR, ela também está associada a ativação com KCl. É provável que em células PC12-NCS-1 esteja ocorrendo facilitação do acesso entre esse processo de liberação de mediadores químicos e a sinalização muscarínica sob a dinâmica dos níveis formados de InsP_3 e Ca^{2+} após estímulo das células com CCH, como foi mostrado nas seções anteriores.

Em terminais nervosos sabe-se que a liberação de glutamato induzida por agentes despolarizantes é produzida por dois mecanismos complementares: um excitotóxico, dependente de Ca^{2+} , e uma via independente de Ca^{2+} , mediada pela reversão do transportador de glutamato (Sánchez-Prieto e cols., 1987). No caso das células PC12 e cromafins, a liberação de vesículas de núcleo denso (*dense core*) foi dependente da entrada de Ca^{2+} do meio extracelular para o meio intracelular, uma vez que, na presença de EGTA não foi observada a facilitação associada aos altos níveis de NCS-1 (ver McFerran e cols., 1998; Koizume e cols., 2002; Rajebhosale e cols., 2002). No entanto, a facilitação da liberação de glutamato observada nas células PC12 não apresentou o mesmo padrão em comparação à liberação de monoaminas e neuropeptídeos induzida por outras vias de sinalização, como a purinérgica e bradicinérgica neste mesmo modelo. Neste caso, a facilitação observada nas células PC12-NCS-1 em resposta ao estímulo muscarínico ocorreu tanto na presença quanto ausência de Ca^{2+} extracelular

(**figura 31**). Esses dados sugerem que embora a facilitação da hidrólise/formação de PIP2/InsP₃ e do aumento na $[Ca^{2+}]_i$ observado nas células PC12-NCS-1 sejam dependentes da entrada de Ca^{2+} do meio extra para o meio intracelular, não se pode afirmar o mesmo para o processo de facilitação da liberação de glutamato (**comparar figuras 31, 14-inset e 24**). Neste caso os mecanismos moleculares de facilitação da liberação de glutamato em células PC12-NCS-1 submetidas ao estímulo muscarínico parecem ser independentes dos efeitos de NCS-1 sobre a atividade dos canais iônicos de Ca^{2+} presentes na membrana plasmática.

Para o estímulo com KCl, o efeito facilitador da liberação de glutamato desaparece na ausência de Ca^{2+} extracelular indicando que NCS-1 pode participar de mecanismos distintos de acordo com a via estimulada. Neste caso, NCS-1 embora não interfira com a produção de InsP₃ mediada pelo estímulo com KCl (**ver figuras 18 e 19**) parece regular a liberação de glutamato via abertura dos canais de Ca^{2+} presentes na membrana plasmática, corroborando a hipótese de liberação mediada por interferência direta nos canais iônicos.

Em células PC12-wt a via que provavelmente está relacionada à liberação de glutamato induzida por CCH é a via dependente de receptores nicotínicos (**ver figura 31**). Esta hipótese se baseia na análise da liberação de glutamato na presença de atropina, antagonista muscarínico (**ver figura 31**). Na presença de atropina o bloqueio da liberação de glutamato induzido pelo CCH nas células PC12-wt foi pequeno e significativamente similar à liberação de glutamato na presença do estímulo com CCH isoladamente.

Trabalhos têm demonstrado que a liberação de glutamato não se restringe somente às células nervosas, mas também ocorreu em células neuroendócrinas e não neuronais (Skerry e Genever, 2001; Romero e cols., 2003). Em um desses trabalhos, que apóia a

hipótese de liberação de glutamato pelas células PC12-wt e PC12-NCS-1 foram analisados mecanismos distintos de liberação de glutamato em cultura primária de células cromafins (Romero e cols., 2003). A metodologia utilizada foi a mesma dos experimentos realizados neste trabalho em células PC12-wt e PC12-NCS-1. A caracterização da liberação de glutamato nas células cromafins partiu de resultados mostrando que este transmissor provocava o aumento da secreção de catecolaminas através de interações específicas com receptores. Quatro subtipos de receptores de glutamato foram identificados na medula da adrenal: N-metil-D-aspartato (NMDA), ácido propiônico α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazola (AMPA) e receptores cainato o que indica um papel fisiológico desempenhado pelo glutamato nessas células (González e cols., 1998). Como já demonstrado em células nervosas, foram encontrados dois mecanismos de liberação de glutamato nas células cromafins: um dependente de Ca^{2+} e outro mecanismo independente da entrada de Ca^{2+} do meio extracelular, corroborando com os dados encontrados aqui, neste trabalho, a partir do modelo de células PC12 submetidas tanto ao estímulo despolarizante quanto dependente da ativação de GPCR (ver figuras 31 e 37).

As alterações, observadas em células PC12-NCS-1, da hidrólise/formação de $\text{PIP}_2/\text{InsP}_3$, $[\text{Ca}^{2+}]_i$, liberação de glutamato e distribuição de vesículas endocíticas, indicam que NCS-1 pode ser entendida como pivô modulador de múltiplas funções celulares. Ela parece interagir de forma diferente em cada um desses sistemas dependendo de como as vias de sinalização funcionam em cada tipo de modelo estudado. Como os resultados apresentados neste trabalho parecem ocorrer de forma coordenada é possível que haja um acoplamento direto entre a sinalização muscarínica e a liberação de glutamato. Tal acoplamento parece ser facilitado pelo aumento dos níveis de expressão de NCS-1. As células PC12-NCS-1 apresentam maquinaria de sinalização

onde NCS-1 desempenha um papel de pivô controlador de um complexo sistema que envolve diversas vias de sinalização. Não somente observamos alterações da via de sinalização dependente da atividade muscarínica, como também, observamos através dos estudos do padrão de distribuição de proteínas vesiculares (VAMP-GFP, VGLUT2 e VMAT1), que células PC12-NCS-1 também apresentam sistema vesicular distinto das células PC12-wt (**ver figuras 33, 34, 35 e 36**).

5.4.1 Origem do glutamato liberado por células PC12

Neste trabalho caracterizamos a liberação de glutamato no modelo de células neuroendócrinas a fim de verificar possíveis papéis desempenhados por NCS-1 neste processo. Apesar das células PC12-NCS-1 e PC12-wt apresentarem aumento da liberação de glutamato em resposta ao estímulo com CCH e esta liberação ter sido facilitada nas células PC12-NCS-1, não era claro se esta liberação era regulada por Ca^{2+} e/ou dependente de fusão vesicular. Um grande número de exemplos na literatura tem demonstrado que neurônios podem liberar mais de um neurotransmissor e sob diferentes condições de estímulo como por exemplo, fatores neurotróficos, apresentam seu fenótipo de liberação alterado (Reis e cols., 2000; Manns e cols., 2001, Yang e cols., 2002). Nas últimas décadas, alguns estudos foram direcionados para a investigação da co-liberação de glutamato, 5-hidroxitriptamina (5-HT) e dopamina *in vivo* e *in vitro* (Ottersen e Storm-Mathisen, 1984; Nicholas e cols., 1992; Johnson, 1994; Fung e cols., 1994; Sulzer e cols., 1998).

Sugere-se que a expressão do transportador vesicular de glutamato seja uma das principais variáveis para determinação da liberação de glutamato de um tipo celular. Os subtipos de transportadores vesiculares de glutamato já caracterizados na literatura, VGLUT1, VGLUT2 e VGLUT3, variam de acordo com o tipo do neurônio e suas condições de desenvolvimento (Boulland e cols., 2004; Fremeau e cols., 2004, Trudeau, 2004, Wojcik, Rhee e cols., 2004; Takamori, 2006). Algumas evidências mostraram diferenças na expressão desses subtipos. Em cultura primária de neurônios mesencefálicos neonatos, experimentos de imunocitoquímica mostraram aproximadamente 80% de neurônios imunopositivos para a tirosina hidroxilase e VGLUT2, mas nenhuma marcação para os subtipos VGLUT1 e VGLUT3 (Dal e col., 2004). Do mesmo modo as células PC12-wt e PC12-NCS-1 analisadas no presente

trabalho, através da técnica de *western blot* e imunofluorescência, mostraram a expressão de VGLUT2 e sua distribuição pontuada no corpo, neuritos e varicosidades (**ver figuras 33, 34, 35 e 36**) mas não de VGLUT1 (dados não mostrados). Embora os resultados aqui apresentados não tenham mostrado co-localização de VGLUT2 e VMAT (**figura 36**) nas células PC12-wt e PC12-NCS-1, é interessante ressaltar que a co-expressão desses transportadores pelo modelo de células neuroendócrinas é compatível com os resultados de Dal e colaboradores (2004). Além deles, outros autores também sugerem que neurônios dopaminérgicos poderiam desenvolver distintos subtipos de terminais nervosos, onde uma proporção dos mesmos teria a habilidade de co-liberar glutamato (Hayashi e cols., 2001; Gras e cols., 2002; Schafer e cols., 2002). Sugerimos, também, que a co-liberação de glutamato e monoaminas pela células PC12-wt e PC12-NCS-1 possa ser originada de compartimentos vesiculares distintos, uma vez que não houve co-localização entre VMAT e VGLUT-2 na maioria das imagens obtidas nos experimentos de imunofluorescência dos dois tipos celulares (**figura 36**). Uma provável explicação poderia ser sugerida pela presença de VGLUT2, não em vesículas de núcleo denso como se imaginava, mas em vesículas pequenas presentes em células PC12 e que expressam constitutivamente a VAMP. No entanto, nesse caso também, não foi observada co-localização entre VGLUT2 e VAMP, sugerindo que o VGLUT2 esteja expresso também em microvesículas. Vale ressaltar que esses experimentos foram realizados em condições em que a proteína VAMP foi identificada a partir da expressão transitória da sequência codificadora para VAMP-GFP. Por isso todas as imagens analisadas apresentaram forte distribuição perinuclear de VAMP, sendo esta uma variável a ser considerada já que as vesículas contendo VAMP, expressa endogenamente, não foram identificadas a partir da utilização de anticorpos específicos.

Embora neste trabalho não tenham sido realizados experimentos de co-localização entre VGLUT2 e sinaptotagmina, é importante ressaltar que esta última, dependendo do seu subtipo expresso em células PC12, se encontra não somente em vesículas de núcleo denso ou vesículas pequenas, mas também em vesículas endocíticas e lisossomos (Saegusa e cols., 2002; Monerrat e cols., 2007, Tsuboi e Fukuda, 2007). Sabe-se que sinaptotagminas são proteínas sensoras de Ca^{2+} classicamente relacionadas ao controle da exocitose, do tráfego e reciclagem vesicular (Geppert e cols., 1994; Chapman, 2002; Llinás e cols., 2004; Fukuda, 2006). Uma vez que células PC12 apresentam diferentes subtipos de sinaptotagminas, principalmente I, VII e IX, (Sugita e cols., 2001; Fukuda e cols., 2002 e 2004; Wang e cols., 2005) com sua distribuição em diferentes compartimentos, seria útil para identificação de vesículas glutamatérgicas em células PC12-wt e PC12-NCS-1. Estudos posteriores fazem-se necessários a fim de caracterizar o tipo vesicular onde o VGLUT2 se encontra predominantemente expresso nas células PC12-wt e PC12-NCS-1.

Em relação à liberação de glutamato observada em células PC12, seria possível que o perfil de distribuição vesicular, além do aumento da hidrólise/formação PIP2/InsP3 e $[\text{Ca}^{2+}]_i$, também contribuisse para a facilitação da liberação de glutamato em células PC12-NCS-1? Esse questionamento partiu dos resultados mostrando que mesmo na ausência de Ca^{2+} houve um aumento da liberação de glutamato pelas células PC12-NCS-1. Uma das evidências que poderia esclarecer um pouco mais a respeito da facilitação da liberação de glutamato observada nas células PC12-NCS-1 foi demonstrada por estudos realizados por Bourque e Trudeau em 2000. Nestes, cultura de neurônios dopaminérgicos submetidos ao estímulo da via dependente de GDNF (fator neurotrófico derivado de células gliais) desenvolviam terminais glutamatérgicos funcionais. Sabe-se também que a frequenina, proteína homóloga à NCS-1, está

envolvida na facilitação da via de sinalização promovida pelo GDNF em junções neuromusculares (Wang e cols., 2001). Dessa forma, seria possível que a facilitação da via de sinalização mediada pelo GDNF fosse responsável pela promoção ou desenvolvimento de um número aumentado de sinapses glutamatérgicas em células PC12 superexpressando NCS-1? Curiosamente, a análise quantitativa da fluorescência presente nas terminações de células PC12 marcadas com FM4-64 (**ver figura 39**) mostrou aumento estatístico na intensidade de fluorescência referente à marcação de vesículas endocíticas presentes nos terminais das células PC12-NCS-1. Outra evidência que sugere alteração no perfil vesicular de liberação de glutamato nas células PC12-NCS-1 decorreu das análises de distribuição de VGLUT2 nas mesmas. Em células PC12-NCS-1 foi possível observar que a distribuição das vesículas contendo VGLUT2 apresentou-se acumulada em algumas células e restrita a regiões perinucleares, diferente da distribuição mais difusa característica das células PC12-wt (**ver figuras 33 e 36**). Esses dados indicam, possivelmente, o envolvimento de NCS-1 na redistribuição de VGLUT2, e/ou vesicular, corroborando com dados da literatura que sugerem a participação de NCS-1 no aumento do tráfego de vesículas originadas da rede trans-golgi (Zhao e cols., 2001; Hilfiker, 2003; Kapp-Barnea e cols., 2006).

5.5 Participação da NCS-1 na via colinérgica

Vários autores vêm mostrando o envolvimento da proteína NCS-1 em algumas vias de sinalização como, por exemplo, as vias dopaminérgicas, purinérgicas, mediadas por GDNF e bradicinina (McFerran e cols., 1998; Wang e cols., 2001; Kabbani e cols., 2002, Koizume e cols., 2002; Nakamura e cols., 2006; Taverna e cols., 2007). No entanto, o estudo funcional sobre sua participação na via colinérgica partiu de dados da literatura sugerindo a complexidade do envolvimento de NCS-1 em diferentes redes de transmissão de sinais. Algumas evidências já descritas podem ser citadas como a distribuição de NCS-1 em áreas como o hipocampo, estriado e córtex pré-frontal de ratos, em macacos e humanos (Kabbani e cols., 2002; Sippy e cols., 2003; Negyessy e Goldman-Rakic, 2005). Assim também sua participação em processos de aprendizado, memória, síndrome de abstinência e distúrbios psiquiátricos deram apoio teórico para realização do presente estudo (Koh e cols., 2003; Bai e cols., 2004; Dahl e cols., 2005). Alguns resultados apresentados pelo nosso grupo corroboram a hipótese do envolvimento de NCS-1 como proteína reguladora na via muscarínica. Estas evidências incluem: i) facilitação da hidrólise/formação de PIP₂/InsP₃ dependente da via de ativação muscarínica nas células PC12-NCS-1 submetidas ao estímulo com CCH (**ver figuras 8 e 14**); ii) diferenças nas dinâmicas de controle dos níveis citoplasmáticos de Ca²⁺ (**ver figuras 22 e 23**) e no pico máximo [Ca²⁺]_i atingido nas células (**figura 24**); iii) aumento da liberação de glutamato induzido pelo CCH nas células PC12-NCS-1 (**figura 31**). A utilização de atropina no primeiro e último exemplos (**ver figuras 14 e 31**) foi capaz de impedir a resposta induzida pelo CCH. Juntas, tais evidências indicam que os níveis aumentados de NCS-1 nas células PC12-NCS-1

facilitem o acoplamento entre a sinalização celular dependente da transmissão muscarínica e a liberação de glutamato.

A sinalização muscarínica é distribuída em regiões como neocórtex (*neocortium*), córtex cerebral e hipocampo (Van der Zee e Luiten, 1993; Alcantara e cols., 2001; van Koppen e Kaiser, 2003; Hasselmo, 2006). Funcionalmente, tem sido sugerida a participação dos receptores M1 no hipocampo em processos de memória, plasticidade neural e potenciação de longa duração (Mrzljak e cols., 1993; Marino e cols., 1998). Um modelo proposto por nosso grupo de pesquisa (**ver figura 43**) e que será descrito com mais detalhes a seguir, tenta fazer um paralelo entre os dados encontrados sobre facilitação da transmissão muscarínica nas células PC12-NCS-1 com algumas evidências da literatura, mostrando o envolvimento de NCS-1 em outras vias de sinalização (McFerran e cols., 1998; Wang e cols., 2001; Kabbani e cols., 2002; Koizume e cols., 2002; Nakamura e cols., 2006; Taverna e cols., 2007).

Alguns membros da família das proteínas sensoras de Ca^{2+} têm sido descritos como proteínas capazes de interagir estruturalmente e funcionalmente com proteínas cinases de receptores acoplados a proteína G (GRK), que por sua vez regulam o funcionamento dos receptores GPCR e, conseqüentemente, a sinalização desencadeada pelos mesmos receptores (Pronin e cols., 1997; Sallese e cols., 2000; Burgoyne e cols., 2001). A recoverina é um exemplo de proteína da família NCS que, quando ativada, é capaz de inibir especificamente a rodopsina cinase, um subtipo de GRK presente em fotorreceptores (Chen e cols., 1995). Outro exemplo é a calmodulina que interfere com a regulação de GPCR, uma vez que é um potente inibidor da GRK5 (Pronin e cols., 1997). Em relação a NCS-1, uma situação semelhante acontece uma vez que esta é capaz de inibir GRK2 e interferir com a

atividade dos receptores D2 (Kabbani e cols., 2002). Experimentos de co-
imunoprecipitação em células HEK 293 e neurônios do estriado identificaram
associação estrutural dependente de Ca^{2+} e AMPc entre NCS-1 e GRK2. Esta
interação foi capaz de inibir a atividade de GRK2 e assim impedir a internalização
de receptores D2 (Kabbani e cols., 2002). Sabe-se que GRK2 não só é capaz de
dessensibilizar receptores dopaminérgicos como também receptores muscarínicos
M1 em neurônios do hipocampo (Schlador e Nathanson, 1997; Hamilton e cols.,
1998; Kabbani e cols., 2002; Willets e cols., 2005). Desse modo, sugere-se que
NCS-1 poderia inibir a dessensibilização de receptores muscarínicos, o que levaria a
maior exposição dos mesmos na membrana plasmática contribuindo para a
facilitação da formação de InsP_3 observada nas células PC12-NCS-1 estimuladas
com CCH (ver figura 43).

Um outro fator que poderia contribuir para a exposição e a manutenção da
atividade dos receptores muscarínicos na membrana plasmática é o nível intracelular
de PIP2. A presença deste fosfolípídeo atua cooperativamente interferindo na
internalização dos receptores muscarínicos. Altas concentrações destes
fosfoinosítídeos aumentam o número de grupamentos com polaridade negativa nas
microrregiões próximas a estes receptores, favorecendo a curvatura da membrana,
formação das vesículas endocíticas (*vesicle budding*) e do sítio de ação da dinamina
(Sorensen e cols., 1997; Sorensen e cols., 1999a-b; Kobrinsky e cols., 2000,
Werbonat e cols., 2000). É o caso dos experimentos realizados em células SH-SY5Y
de neuroblastoma em que o estímulo de receptores muscarínicos M3 aumentou a
internalização destes e da PI4K por meio de uma via dependente da síntese de PIP2
(Sorensen e cols., 1997; Sorensen e cols., 1999a-b). Além disso, a perda de PIP2 nos
microdomínios de membrana dificulta a estimulação das subunidades $\beta\gamma$ da proteína

G. Mecanismo este necessário ao processo de manutenção da atividade dos canais de K^+ retificadores de entrada controlados por proteína G (*G protein-gated inwardly rectifying K^+* , GIRK) em células cardíacas (Kobrinisky e cols., 2000). No caso das células PC12-NCS-1 é provável que a internalização de receptores muscarínicos esteja realmente alterada uma vez que os resultados mostraram facilitação da dinâmica do domínio $PH_{PLC\delta}$ EGFP, indicando maiores índices de degradação de PIP2. Sugerimos uma hipótese correspondente entre a interferência de NCS-1 na via muscarínica e os resultados já descritos para sua interferência na via dopaminérgica (Kabbani e cols., 2002). Seria possível a formação de um complexo estrutural e/ou funcional entre NCS-1, GRK2 e receptores muscarínicos? Um dos interesses do nosso grupo é analisar o perfil de exposição dos receptores muscarínicos na membrana plasmática de células PC12-NCS-1 e PC12-wt através de experimentos de biotinylation e co-localização *in vitro* e *in vivo* de NCS-1 com receptores muscarínicos. Experimentos de co-immunoprecipitação dos receptores muscarínicos (neste caso, M1 e M4) e NCS-1 juntamente às *beads* de agarose associadas a anticorpos anti-NCS-1 não mostraram a formação do complexo nas células PC12-wt e PC12-NCS-1 (dados não mostrados). No entanto, resultados de co-immunoprecipitação verificados por Kabbani e colaboradores (2002) sugerem a necessidade do estímulo dos receptores dopaminérgicos para a observação da formação do complexo entre os receptores dopaminérgicos D2, NCS-1 e GRK2. De tal forma que novos experimentos de imunoprecipitação entre receptores muscarínicos e NCS-1 após o estímulo das células com CCH serão necessários a fim de testar a hipótese de formação do complexo desencadeado por estímulo colinérgico.

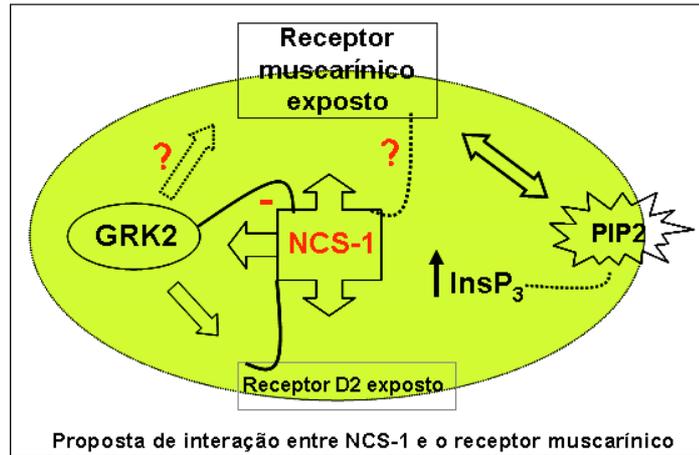


Figura 43: Modelo proposto da interação funcional entre a proteína NCS-1 e os receptores muscarínicos.

NCS-1 interage molecularmente com a proteína GRK2, inibindo-a. Desta forma, impede a dessensibilização dos receptores D2 além de interagir com os mesmos (Kabbani e cols., 2002). A hipótese desse trabalho sugere que NCS-1 poderia afetar a dinâmica da sinalização muscarínica através de uma maior exposição dos receptores muscarínicos, assim como já foi demonstrado para os receptores D2, uma vez que GRK2 também é capaz de dessensibilizar aqueles. De tal forma que os receptores muscarínicos, assim como os receptores D2 poderiam estar mais expostos na membrana plasmática podendo assim facilitar sua via de sinalização intracelular.

5.6 Sinalização de Ca^{2+} , proteínas sensoras de cálcio e sua participação nos transtornos neuropsiquiátricos

O conhecimento de doenças neuropsiquiátricas vem sendo construído através de associações que tentam correlacionar os aspectos clínicos aos aspectos biológicos subjacentes. Um delicado balanço entre crescimento e eliminação das conexões sinápticas parece ocorrer em resposta às experiências de vida e ao aprendizado a fim de refinar a performance cerebral. No entanto, uma combinação de fatores ambientais, genéticos e alterações moleculares desequilibram o funcionamento neuronal e danifica a comunicação entre os circuitos neurais (Waddington, 1993 a e b; Selemon e Rajkowska, 1995; Buxhoeveden e cols., 2000; Thompson e cols., 2001; Selemon, 2004). A combinação dessas mudanças estruturais e moleculares, embora não seja totalmente esclarecida, pode ser responsável pelo aparecimento de sintomas psíquicos determinados clinicamente, incluindo déficits emocional, sensorial, cognitivo, comportamental, do aprendizado e memória.

Uma série de alterações estruturais parece estar diretamente associada aos diferentes tipos de transtornos neuropsiquiátricos. Na esquizofrenia, por exemplo, tem sido observada perda de neurônios das regiões límbicas e corticais do prosencéfalo, neurodegeneração sináptica e dendrítica, diminuição do número de neurônios mielinizados, aumento no volume ventricular e redução do volume cortical e hipocampal (Van Horn e McManus, 1992; Nelson e cols., 1998; Woods e cols., 2005). No entanto, o entendimento dessas alterações não pode ser considerado de forma isolada. Evidências experimentais vêm correlacionando uma série de alterações biomoleculares e adaptativas que acompanham a evolução fenotípica dos distúrbios mentais. Dentre elas, podem ser citadas alterações na dinâmica espaço-temporal de

segundos mensageiros e liberação de neurotransmissores; alterações do estado ativado/inativado de receptores, canais iônicos e enzimas intracelulares, alterações no metabolismo de fosfolípidos estruturais e do tráfego de membranas, modulação da expressão gênica (revisado por Lidow, 2003; Mattson e Chan, 2003; Ogden e cols., 2004; Halstead e cols., 2005; Di Paolo e De Camilli, 2006; Krauss e Haucke, 2007; Stone e cols., 2007). De forma que a complexidade dos aspectos que envolvem a etiologia e o desenvolvimento de plasticidade implicados no desequilíbrio dos circuitos neurais deve ser compreendida por meio de um conhecimento integrado.

Atualmente o estudo de mecanismos fisiopatológicos dos transtornos neuropsiquiátricos tem dado relevância aos desequilíbrios nos níveis intracelulares de Ca^{2+} , uma vez que este participa dos processos de multiplicação, morte, diferenciação celular além do seu grande envolvimento nos processos de plasticidade neural (Jimerson, e cols., 1979; Mattson e cols., 2000, Lautermilch e Spitzer, 2000; LaFerla 2002, Gomez e Zheng, 2006). Dessa forma, tanto os desequilíbrios nos níveis intracelulares de Ca^{2+} poderiam afetar a atividade de proteínas sensoras de Ca^{2+} assim como a dinâmica intracelular de Ca^{2+} poderia sofrer interferências por meio de alterações funcionais dessas proteínas (Lidow, 2003; Burgoyne 2007). Qualquer alteração na sua expressão intracelular ou na sua capacidade de interação com outros alvos moleculares seria suficiente para interferir na transdução dos sinais de Ca^{2+} em resposta celulares específicas.

Baseado nesta premissa, atualmente uma série de proteínas ligantes e sensoras de Ca^{2+} têm sido descritas como participantes da fisiopatologia das doenças neuropsiquiátricas, como na esquizofrenia, transtorno bipolar, doença de Alzheimer e outras demências (Novak e cols., 2000; Reynolds e cols., 2001; Bernstein e cols 2002; Koh e cols 2003 a-b; Braunewell, 2005, Blazejczyk e cols., 2006; Souza e cols., 2006).

Dentro do contexto do envolvimento de proteínas sensoras de Ca^{2+} nos distúrbios neuropsiquiátricos, trabalhos publicados por grupos de pesquisa independentes mostraram aumento significativo dos níveis de NCS-1 no córtex pré-frontal de pacientes *post mortem* que apresentaram esquizofrenia e transtorno bipolar (Koh e cols., 2003; Bai e cols., 2004). A partir desses trabalhos alguns grupos de pesquisa, incluindo a nossa equipe, vêm identificando fatores que dão apoio à hipótese da participação de NCS-1 na fisiopatologia dos distúrbios neuropsiquiátricos (Kabbabi e cols., 2002, Koh e cols., 2003, Bai e cols., 2004; Negyessy e Goldman-Rakic, 2005; Braunewell 2005; Souza e cols., 2006). Como foi descrito o aumento dos níveis de NCS-1 no córtex pré-frontal de pacientes *post-mortem* esquizofrênicos e com distúrbios bipolar, tais evidências sugerem que NCS-1 possa facilitar a via dopaminérgica nessa região, uma vez que foi capaz de facilitar a exposição dos receptores D2 e aumentar a liberação de dopamina e outras aminas em células PC12 e outros modelos *in vitro* (ver seções anteriores) (McFerran e cols., 1998; Kabbani e cols., 2002). No entanto, alguns autores associam os sintomas negativos característicos da esquizofrenia a hipofunção da neurotransmissão dopaminérgica no córtex pré-frontal (Andreasen, 1999; bi-Dargham e Moore, 2003). Dessa forma, o aumento dos níveis de NCS-1 encontrado nessa região parece estar relacionado à modulação do sistema no sentido de equilibrar o déficit dopaminérgico característico.

Juntamente a tais hipóteses, está crescendo o número de evidências experimentais mostrando forte correlação entre esquizofrenia e déficit na via de sinalização muscarínica. Neste caso, não só foi encontrada hipofunção muscarínica no córtex pré-frontal como também no hipocampo e núcleos da base (caudado e putâmem) (Dean e cols., 1996; Crook e cols., 1999; Crook e cols., 2001; Dean e cols., 2002; Mancama e cols., 2003). Esses achados não foram identificados em estudos *post-*

mortem de pacientes que apresentavam transtorno bipolar ou depressão maior, mostrando se tratar de alterações específicas da esquizofrenia. Relação semelhante à que foi sugerida para o funcionamento de NCS-1 versus via dopaminérgica na fisiopatologia da esquizofrenia poderia ser correspondente para a sinalização muscarínica. O aumento dos níveis de NCS-1 expressos no córtex pré-frontal de pacientes esquizofrênicos, em estudos *post-mortem*, poderia estar associado a um *feedback* de compensação à hipofunção muscarínica característico do quadro patológico. Como demonstrado nos resultados deste trabalho, NCS-1 também parece ser um amplificador dos sinais intracelulares associados à ativação da transmissão muscarínica, considerando, nesse caso, os seguintes perfis analisados: metabolismo de fosfoinosítídeos e dinâmica e níveis intracelulares de Ca^{2+} . A partir dos resultados do nosso grupo, a facilitação da liberação de glutamato dependente da ativação muscarínica em células superexpressando NCS-1 poderia ser correlacionada a algumas evidências recentemente descritas na literatura que têm proposto a participação de anormalidades da transmissão glutamatérgica na fisiopatologia da esquizofrenia (Stone e cols., 2007). Evidências têm mostrado hipofunção dos receptores glutamatérgicos (NMDA) e elevação da liberação de glutamato no córtex frontal e hipocampo de pacientes esquizofrênicos em estudos *post-mortem* (Olney e Farber, 1995; Olney e Farber, 1999; Theberge e cols., 2002; Theberge e cols., 2003; Gallinat e cols., 2004; Schubert e cols., 2004; Krystal e cols., 2005). Em concordância a tais evidências a superexpressão de NCS-1 identificada no córtex pré-frontal dos pacientes esquizofrênicos poderia afetar os níveis de glutamato liberado nessa região, levando em consideração os resultados identificados por nossa equipe (**ver figura 31**). Além disso, os resultados mostrados por Sippy e colaboradores (2003), em cultura primária de células hipocampais, sugerem que a superexpressão de NCS-1 também está associada ao aumento da transmissão glutamatérgica nesse modelo

uma vez que provocou facilitação das correntes pós-sinápticas excitatórias. Todas as evidências descritas acima indicam que altos níveis de NCS-1 no córtex pré-frontal de pacientes esquizofrênicos contribuem para adaptação e plasticidade entre vias dopaminérgica, muscarínica e/ou glutamatérgica através de mecanismos associados à amplificação da sinalização celular. Além disso, dados demonstrados na literatura sugerem que apoptose não parece estar super ativada na fase crônica esquizofrenia (Jarskog e cols., 2005; Glantz e cols., 2006), corroborando com recente trabalho de Nakamura e colaboradores (2006) mostrando o papel anti-apoptótico da superexpressão de NCS-1 em cultura primária de neurônios corticais. De modo que a hipótese do nosso grupo de pesquisa sugere que o aumento da expressão de NCS-1, associados aos transtornos psiquiátricos como na esquizofrenia, poderia ser compreendido não como elemento causador do desequilíbrio patofisiológico, mas como uma via celular alternativa para controle da hipofunção das vias de sinalização e injúria celular correlacionadas às disfunções neuro-patológicas. Muito ainda deve ser realizado em prol de uma integração do conhecimento entre as alterações no córtex pré-frontal de pacientes esquizofrênicos e as evidências alcançadas nos modelos *in vitro*.

5.7 Considerações finais e perspectivas

O presente trabalho pode esclarecer a relação entre o aumento da expressão de NCS-1 e a dinâmica de fosfoinosítídeos, Ca^{2+} e liberação de glutamato no modelo de células neuroendócrinas. Foi mostrado, por meio da utilização do domínio $PH_{PLC\delta}$ EGFP como marcador de fosfoinosítídeos e da visualização em tempo real de células individualizadas, que o aumento da expressão de NCS-1 se correlacionou ao aumento da dinâmica de degradação de PIP2 e formação de $InsP_3$ induzidos pela atividade muscarínica. Houve também diferenças significativas na dinâmica e pico máximo da $[Ca^{2+}]_i$ nas células estimuladas com CCH. Além disso, níveis aumentados de NCS-1 se correlacionaram ao aumento da liberação de glutamato dependente de Ca^{2+} e através de mecanismos dependentes ativação muscarínica. Neste mesmo modelo, as diferenças no padrão vesicular entre os dois grupos celulares sugerem fortemente que NCS-1 está associada ao controle e/ou formação de vesículas endocíticas e que parte da liberação de glutamato observada nesse modelo possa ter origem vesicular uma vez que a permeabilização das células com digitonina foi incapaz de impedir a liberação induzida pela ativação muscarínica. A expressão aumentada de NCS-1 em células PC12 pode fazer parte da adaptação da sinalização muscarínica no sentido de facilitar os processos de ativação associados a ela. Indicando assim, uma possível associação entre as alterações observadas na dinâmica de fosfoinosítídeos, Ca^{2+} e liberação de glutamato. A confirmação dessa integração entre NCS-1 e a via muscarínica assim como dos mecanismos específicos associados a ela poderá contribuir para compreensão do envolvimento de NCS-1 nos processos de plasticidade associados ao desequilíbrio funcional das vias de sinalização correlacionados a patofisiologia dos distúrbios neurais.

Apesar das células PC12 serem modelo de cultura isolada, elas são consideradas ferramentas úteis para o aprofundamento de perguntas específicas, uma vez que

restringe o número de variáveis experimentais. O ideal é que a hipótese de regulação da via muscarínica pela NCS-1, realizada em células PC12, seja testada em um modelo animal a fim de correlacionar os resultados obtidos *in vitro* e confirmar a hipótese em um modelo mais complexo. A obtenção de células PC12 contendo níveis reduzidos de NCS-1 a partir de experimentos realizados com ferramentas genéticas utilizando RNA de interferência (siRNA) para diferentes sítios da NCS-1, assim como experimentos utilizando camundongos nocautes, ambos fornecidos gentilmente pelo Dr. Andreas Jeromin (Center for Learning and Memory, Univ. Texas, USA) a nosso grupo de pesquisa, abrem novas perspectivas a fim de avaliar o envolvimento de NCS-1 na via de sinalização muscarínica a partir desses novos modelos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alcantara, A.A., Mrzljak, L., Jakab, R.L., Levey, A.I., Hersch, S.M., and Goldman-Rakic, P.S., 2001. Muscarinic m1 and m2 receptor proteins in local circuit and projection neurons of the primate striatum: anatomical evidence for cholinergic modulation of glutamatergic prefronto-striatal pathways. *J. Comp Neurol.* 434, 445-460.

Ames, J.B., Ishima, R., Tanaka, T., Gordon, J.I., Stryer, L., and Ikura, M., 1997. Molecular mechanics of calcium-myristoyl switches. *Nature* 389, 198-202.

Ames, J.B., Hendricks, K.B., Strahl, T., Huttner, I.G., Hamasaki, N., and Thorner, J., 2000. Structure and calcium-binding properties of Frq1, a novel calcium sensor in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* 39, 12149-12161.

Andreasen, N.C., 1999. Understanding the causes of schizophrenia. *N. Engl. J. Med.* 340, 645-647

Aoyagi, K., Sugaya, T., Umeda, M., Yamamoto, S., Terakawa, S., and Takahashi, M., 2005. The activation of exocytotic sites by the formation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate microdomains at syntaxin clusters. *J. Biol. Chem.* 280, 17346-17352.

Atlas, D., 2001. Functional and physical coupling of voltage-sensitive calcium channels with exocytotic proteins: ramifications for the secretion mechanism. *J. Neurochem.* 77, 972-985.

Augustine, G.J., Santamaria, F., and Tanaka, K., 2003. Local calcium signaling in neurons. *Neuron* 40, 331-346.

Bahi, N., Friocourt, G., Carrie, A., Graham, M.E., Weiss, J.L., Chafey, P., Fauchereau, F., Burgoyne, R.D., and Chelly, J., 2003. IL1 receptor accessory protein like, a protein involved in X-linked mental retardation, interacts with Neuronal Calcium Sensor-1 and regulates exocytosis. *Hum. Mol. Genet.* 12, 1415-1425.

Bai, J., He, F., Novikova, S.I., Undie, A.S., Dracheva, S., Haroutunian, V., and Lidow, M.S., 2004. Abnormalities in the dopamine system in schizophrenia may lie in altered levels of dopamine receptor-interacting proteins. *Biol. Psychiatry* 56, 427-440.

Bartlett, P.J., Young, K.W., Nahorski, S.R., and Challiss, R.A., 2005. Single cell analysis and temporal profiling of agonist-mediated inositol 1,4,5-trisphosphate, Ca²⁺, diacylglycerol, and protein kinase C signaling using fluorescent biosensors 1. *J. Biol. Chem.* 280, 21837-21846.

Bartus, R.T., Dean, R.L., III, Beer, B., and Lippa, A.S., 1982. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* 217, 408-414.

Bartus, R.T. and Emerich, D.F., 1999. Cholinergic markers in Alzheimer disease. *JAMA* 282, 2208-2209.

Bassani, J.W., Bassani, R.A., and Bers, D.M., 1995. Calibration of indo-1 and resting intracellular [Ca]_i in intact rabbit cardiac myocytes. *Biophys. J.* 68, 1453-1460.

Bernstein, H.G., Braunewell, K.H., Spilker, C., Danos, P., Baumann, B., Funke, S., Diekmann, S., Gundelfinger, E.D., and Bogerts, B., 2002. Hippocampal expression of the

calcium sensor protein visinin-like protein-1 in schizophrenia. *Neuroreport* 13, 393-396.

Berridge, M.J., Lipp, P., and Bootman, M.D., 2000. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1, 11-21.

Berridge, M.J., 2006. Calcium microdomains: organization and function. *Cell Calcium* 40, 405-412.

Bezzierides, V.J., Ramsey, I.S., Kotecha, S., Greka, A., and Clapham, D.E., 2004. Rapid vesicular translocation and insertion of TRP channels. *Nat. Cell Biol.* 6, 709-720

bi-Dargham, A. and Moore, H., 2003. Prefrontal DA transmission at D1 receptors and the pathology of schizophrenia. *Neuroscientist.* 9, 404-416.

Blasiolo, B., Kabbani, N., Boehmler, W., Thisse, B., Thisse, C., Canfield, V., and Levenson, R., 2005. Neuronal calcium sensor-1 gene *ncs-1a* is essential for semicircular canal formation in zebrafish inner ear. *J. Neurobiol.* 64, 285-297.

Blazejczyk, M., Wojda, U., Sobczak, A., Spilker, C., Bernstein, H.G., Gundelfinger, E.D., Kreutz, M.R., and Kuznicki, J., 2006. Ca²⁺-independent binding and cellular expression profiles question a significant role of calmyrin in transduction of Ca²⁺-signals to Alzheimer's disease-related presenilin 2 in forebrain. *Biochim. Biophys. Acta* 1762, 66-72.

Bootman, M.D. and Lipp, P., 1999. Ringing changes to the 'bell-shaped curve'. *Curr. Biol.* 9, R876-R878.

Boulland, J.L., Qureshi, T., Seal, R.P., Rafiki, A., Gundersen, V., Bergersen, L.H., Fremieu, R.T., Jr., Edwards, R.H., Storm-Mathisen, J., and Chaudhry, F.A., 2004. Expression of the vesicular glutamate transporters during development indicates the widespread corelease of multiple neurotransmitters. *J. Comp Neurol.* 480, 264-280

Bourque, M.J. and Trudeau, L.E., 2000. GDNF enhances the synaptic efficacy of dopaminergic neurons in culture. *Eur. J. Neurosci.* 12, 3172-3180.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

Braunewell, K.H. and Gundelfinger, E.D., 1999. Intracellular neuronal calcium sensor proteins: a family of EF-hand calcium-binding proteins in search of a function. *Cell Tissue Res.* 295, 1-12.

Braunewell, K.H., 2005. The darker side of Ca²⁺ signaling by neuronal Ca²⁺-sensor proteins: from Alzheimer's disease to cancer. *Trends Pharmacol. Sci.* 26, 345-351.

Burgoyne, R.D. and Weiss, J.L., 2001. The neuronal calcium sensor family of Ca²⁺-binding proteins. *Biochem. J.* 353, 1-12.

Burgoyne, R.D., O'Callaghan, D.W., Hasdemir, B., Haynes, L.P., and Tepikin, A.V., 2004. Neuronal Ca²⁺-sensor proteins: multitalented regulators of neuronal function. *Trends Neurosci.* 27, 203-209.

Burgoyne, R.D., 2007. Neuronal calcium sensor proteins: generating diversity in neuronal Ca²⁺ signalling. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 182-193.\

Buxhoeveden, D., Roy, E., Switala, A., and Casanova, M.F., 2000. Reduced interneuronal space in schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 47, 681-683.\

Catterall, W.A., 1999. Interactions of presynaptic Ca²⁺ channels and snare proteins in neurotransmitter release. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 868, 144-159.

Chapman, E.R., 2002. Synaptotagmin: a Ca(2+) sensor that triggers exocytosis? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 498-508.

Chen, C.K., Inglese, J., Lefkowitz, R.J., and Hurley, J.B., 1995. Ca(2+)-dependent interaction of recoverin with rhodopsin kinase. *J. Biol. Chem.* 270, 18060-18066.

Chin, D. and Means, A.R., 2000. Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Trends Cell Biol.* 10, 322-328.

Coukell, B., Cameron, A., Perusini, S., and Shim, K., 2004. Disruption of the NCS-1/frequenin-related ncsA gene in *Dictyostelium discoideum* accelerates development. *Dev. Growth Differ.* 46, 449-458.

Cramer, A., Whitehorn, E.A., Tate, E., and Stemmer, W.P., 1996. Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling. *Nat. Biotechnol.* 14, 315-319.

Cremona, O. and De, C.P., 2001. Phosphoinositides in membrane traffic at the synapse. *J. Cell Sci.* 114, 1041-1052

Crook, J.M., Dean, B., Pavey, G., and Copolov, D., 1999. The binding of [3H]AF-DX 384 is reduced in the caudate-putamen of subjects with schizophrenia. *Life Sci.* 64, 1761-1771.

Crook, J.M., Tomaskovic-Crook, E., Copolov, D.L., and Dean, B., 2001. Low muscarinic receptor binding in prefrontal cortex from subjects with schizophrenia: a study of Brodmann's areas 8, 9, 10, and 46 and the effects of neuroleptic drug treatment. *Am. J. Psychiatry* 158, 918-925.

Dahl, J.P., Jepson, C., Levenson, R., Wileyto, E.P., Patterson, F., Berrettini, W.H., and Lerman, C., 2006. Interaction between variation in the D2 dopamine receptor (DRD2) and the neuronal calcium sensor-1 (FREQ) genes in predicting response to nicotine replacement therapy for tobacco dependence. *Pharmacogenomics. J.* 6, 194-199.

Dal, B.G., St-Gelais, F., Danik, M., Williams, S., Cotton, M., and Trudeau, L.E., 2004. Dopamine neurons in culture express VGLUT2 explaining their capacity to release glutamate at synapses in addition to dopamine. *J. Neurochem.* 88, 1398-1405.

de, B.J., Janoshazi, A., Dupont, J.L., Procksch, O., Chasserot-Golaz, S., Jeromin, A., and Vitale, N., 2006. Functional implication of neuronal calcium sensor-1 and phosphoinositol 4-kinase-beta interaction in regulated exocytosis of PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 281, 18098-18111.

Dean, B., Crook, J.M., Opekin, K., Hill, C., Keks, N., and Copolov, D.L., 1996. The density of muscarinic M1 receptors is decreased in the caudate-putamen of subjects with schizophrenia. *Mol. Psychiatry* 1, 54-58

Dean, B., McLeod, M., Keriakous, D., McKenzie, J., and Scarr, E., 2002. Decreased muscarinic1 receptors in the dorsolateral prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. *Mol. Psychiatry* 7, 1083-1091.

Di, P.G. and De, C.P., 2006. Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* 443, 651-657.

Dichter, M.A., Tischler, A.S., and Greene, L.A., 1977. Nerve growth factor-induced increase in electrical excitability and acetylcholine sensitivity of a rat pheochromocytoma cell line. *Nature* 268, 501-504.

Doughman, R.L., Firestone, A.J., and Anderson, R.A., 2003. Phosphatidylinositol phosphate kinases put PI4,5P(2) in its place. *J. Membr. Biol.* 194, 77-89.

Eberhard, D.A. and Holz, R.W., 1987. Cholinergic stimulation of inositol phosphate formation in bovine adrenal chromaffin cells: distinct nicotinic and muscarinic mechanisms. *J. Neurochem.* 49, 1634-1643.

Ebihara, T., Guo, F., Zhang, L., Kim, J.Y., and Saffen, D., 2006. Muscarinic acetylcholine receptors stimulate Ca²⁺ influx in PC12D cells predominantly via activation of Ca²⁺ store-operated channels. *J. Biochem. (Tokyo)* 139, 449-458.

Freneau, R.T., Jr., Voglmaier, S., Seal, R.P., and Edwards, R.H., 2004. VGLUTs define subsets of excitatory neurons and suggest novel roles for glutamate. *Trends Neurosci.* 27, 98-103.

Fukuda, M., Kowalchuk, J.A., Zhang, X., Martin, T.F., and Mikoshiba, K., 2002. Synaptotagmin IX regulates Ca²⁺-dependent secretion in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 277, 4601-4604.

Fukuda, M., Kanno, E., Satoh, M., Saegusa, C., and Yamamoto, A., 2004. Synaptotagmin VII is targeted to dense-core vesicles and regulates their Ca²⁺-dependent exocytosis in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 279, 52677-52684.

Fukuda, M., 2006. Rab27 and its effectors in secretory granule exocytosis: a novel docking machinery composed of a Rab27-effector complex. *Biochem. Soc. Trans.* 34, 691-695.

Fung, S.J., Reddy, V.K., Liu, R.H., Wang, Z., and Barnes, C.D., 1994. Existence of glutamate in noradrenergic locus coeruleus neurons of rodents. *Brain Res. Bull.* 35, 505-512.

Furukawa, K., Sugimoto, A., Onodera, H., Kogure, K., and Akaike, N., 1991. Effects of nerve growth factor and cAMP on expression of acetylcholine receptor in PC12 cells. *Neurosci. Res.* 12, 459-462.

Furukawa, K., Onodera, H., Kogure, K., and Akaike, N., 1993. Time-dependent expression of Na and Ca channels in PC12 cells by nerve growth factor and cAMP. *Neurosci. Res.* 16, 143-147.

Furukawa, K., Nabekura, J., and Akaike, N., 1994. Nicotinic and muscarinic acetylcholine responses in differentiated PC12 cells. *Brain Res.* 638, 302-310.

Gallinat, J., Winterer, G., Herrmann, C.S., and Senkowski, D., 2004. Reduced oscillatory gamma-band responses in unmedicated schizophrenic patients indicate impaired frontal network processing. *Clin. Neurophysiol.* 115, 1863-1874.

Geppert, M., Goda, Y., Hammer, R.E., Li, C., Rosahl, T.W., Stevens, C.F., and Sudhof, T.C., 1994. Synaptotagmin I: a major Ca^{2+} sensor for transmitter release at a central synapse. *Cell* 79, 717-727.

Glantz, L.A., Gilmore, J.H., Lieberman, J.A., and Jarskog, L.F., 2006. Apoptotic mechanisms and the synaptic pathology of schizophrenia. *Schizophr. Res.* 81, 47-63.

Godi, A., Pertile, P., Meyers, R., Marra, P., Di, T.G., Iurisci, C., Luini, A., Corda, D., and De Matteis, M.A., 1999. ARF mediates recruitment of PtdIns-4-OH kinase-beta and stimulates synthesis of PtdIns(4,5)P₂ on the Golgi complex. *Nat. Cell Biol.* 1, 280-287.

Godi, A., Santone, I., Pertile, P., Marra, P., Di, T.G., Luini, A., Corda, D., and De Matteis, M.A., 1999. ADP-ribosylation factor regulates spectrin skeleton assembly on the Golgi complex by stimulating phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synthesis. *Biochem. Soc. Trans.* 27, 638-642.

Gomez, M., De, C.E., Guarin, E., Sasakura, H., Kuhara, A., Mori, I., Bartfai, T., Bargmann, C.I., and Nef, P., 2001. Ca^{2+} signaling via the neuronal calcium sensor-1 regulates

associative learning and memory in *C. elegans*. *Neuron* 30, 241-248.

Gomez, T.M. and Zheng, J.Q., 2006. The molecular basis for calcium-dependent axon pathfinding. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 115-125.

Gonzalez, M.P., Herrero, M.T., Vicente, S., and Oset-Gasque, M.J., 1998. Effect of glutamate receptor agonists on catecholamine secretion in bovine chromaffin cells. *Neuroendocrinology* 67, 181-189.

Gras, C., Herzog, E., Bellenchi, G.C., Bernard, V., Ravassard, P., Pohl, M., Gasnier, B., Giros, B., and El, M.S., 2002. A third vesicular glutamate transporter expressed by cholinergic and serotonergic neurons. *J. Neurosci.* 22, 5442-5451.

Greene, L.A. and Tischler, A.S., 1976. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 73, 2424-2428.

Greene, L.A. and Tischler, A.S., 1976. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 73, 2424-2428.

Greka, A., Navarro, B., Oancea, E., Duggan, A., and Clapham, D.E., 2003. TRPC5 is a regulator of hippocampal neurite length and growth cone morphology. *Nat. Neurosci.* 6, 837-845.

Gromada, J., Bark, C., Smidt, K., Efanov, A.M., Janson, J., Mandic, S.A., Webb, D.L.,

Zhang, W., Meister, B., Jeromin, A., and Berggren, P.O., 2005. Neuronal calcium sensor-1 potentiates glucose-dependent exocytosis in pancreatic beta cells through activation of phosphatidylinositol 4-kinase beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102, 10303-10308.

Grynkiewicz, G., Poenie, M., and Tsien, R.Y., 1985. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260, 3440-3450.

Guo, W., Malin, S.A., Johns, D.C., Jeromin, A., and Nerbonne, J.M., 2002. Modulation of Kv4-encoded K(+) currents in the mammalian myocardium by neuronal calcium sensor-1. *J. Biol. Chem.* 277, 26436-26443.

Halstead, J.R., Jalink, K., and Divecha, N., 2005. An emerging role for PtdIns(4,5)P₂-mediated signalling in human disease. *Trends Pharmacol. Sci.* 26, 654-660.

Hamilton, S.E., Schlador, M.L., McKinnon, L.A., Chmelar, R.S., and Nathanson, N.M., 1998. Molecular mechanisms for the regulation of the expression and function of muscarinic acetylcholine receptors. *J. Physiol Paris* 92, 275-278.

Hardie, R.C., 2007. TRP channels and lipids: from *Drosophila* to mammalian physiology. *J. Physiol* 578, 9-24.

Hasselmo, M.E., 2006. The role of acetylcholine in learning and memory. *Curr. Opin. Neurobiol.* 16, 710-715.

Hayashi, M., Otsuka, M., Morimoto, R., Hirota, S., Yatsushiro, S., Takeda, J., Yamamoto, A., and Moriyama, Y., 2001. Differentiation-associated Na⁺-dependent inorganic

phosphate cotransporter (DNPI) is a vesicular glutamate transporter in endocrine glutamatergic systems. *J. Biol. Chem.* 276, 43400-43406.

Haynes, L.P., Thomas, G.M., and Burgoyne, R.D., 2005. Interaction of neuronal calcium sensor-1 and ADP-ribosylation factor 1 allows bidirectional control of phosphatidylinositol 4-kinase beta and trans-Golgi network-plasma membrane traffic. *J. Biol. Chem.* 280, 6047-6054.

Haynes, L.P., Fitzgerald, D.J., Wareing, B., O'Callaghan, D.W., Morgan, A., and Burgoyne, R.D., 2006. Analysis of the interacting partners of the neuronal calcium-binding proteins L-CaBP1, hippocalcin, NCS-1 and neurocalcin delta. *Proteomics.* 6, 1822-1832.

Hendricks, K.B., Wang, B.Q., Schnieders, E.A., and Thorner, J., 1999. Yeast homologue of neuronal frequenin is a regulator of phosphatidylinositol-4-OH kinase. *Nat. Cell Biol.* 1, 234-241.

Hilfiker, S., 2003. Neuronal calcium sensor-1: a multifunctional regulator of secretion. *Biochem. Soc. Trans.* 31, 828-832.

Hirose, K., Kadowaki, S., Tanabe, M., Takeshima, H., and Iino, M., 1999. Spatiotemporal dynamics of inositol 1,4,5-trisphosphate that underlies complex Ca²⁺ mobilization patterns. *Science* 284, 1527-1530.

Howes, K.A., Pennesi, M.E., Sokal, I., Church-Kopish, J., Schmidt, B., Margolis, D., Frederick, J.M., Rieke, F., Palczewski, K., Wu, S.M., Detwiler, P.B., and Baehr, W., 2002.

GCAP1 rescues rod photoreceptor response in GCAP1/GCAP2 knockout mice. *EMBO J.* 21, 1545-1554.

Hui, H., McHugh, D., Hannan, M., Zeng, F., Xu, S.Z., Khan, S.U., Levenson, R., Beech, D.J., and Weiss, J.L., 2006. Calcium-sensing mechanism in TRPC5 channels contributing to retardation of neurite outgrowth. *J. Physiol* 572, 165-172.

Huijbregts, R.P., Topalof, L., and Bankaitis, V.A., 2000. Lipid metabolism and regulation of membrane trafficking. *Traffic.* 1, 195-202.

Isacson, O., Seo, H., Lin, L., Albeck, D., and Granholm, A.C., 2002. Alzheimer's disease and Down's syndrome: roles of APP, trophic factors and ACh. *Trends Neurosci.* 25, 79-84.

Jahn, R., Lang, T., and Sudhof, T.C., 2003. Membrane fusion. *Cell* 112, 519-533.

Jarskog, L.F., Glantz, L.A., Gilmore, J.H., and Lieberman, J.A., 2005. Apoptotic mechanisms in the pathophysiology of schizophrenia. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 29, 846-858.

Jimerson, D.C., Post, R.M., Carman, J.S., van Kammen, D.P., Wood, J.H., Goodwin, F.K., and Bunney, W.E., Jr., 1979. CSF calcium: clinical correlates in affective illness and schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 14, 37-51.

Johnson, M.D., 1994. Synaptic glutamate release by postnatal rat serotonergic neurons in microculture. *Neuron* 12, 433-442.

Jumblatt, J.E. and Tischler, A.S., 1982. Regulation of muscarinic ligand binding sites by nerve growth factor in PC12 pheochromocytoma cells. *Nature* 297, 152-154.

Kabbani, N., Negyessy, L., Lin, R., Goldman-Rakic, P., and Levenson, R., 2002. Interaction with neuronal calcium sensor NCS-1 mediates desensitization of the D2 dopamine receptor. *J. Neurosci.* 22, 8476-8486.

Kapp-Barnea, Y., Melnikov, S., Shefler, I., Jeromin, A., and Sagi-Eisenberg, R., 2003. Neuronal calcium sensor-1 and phosphatidylinositol 4-kinase beta regulate IgE receptor-triggered exocytosis in cultured mast cells. *J. Immunol.* 171, 5320-5327.

Kapp-Barnea, Y., Ninio-Many, L., Hirschberg, K., Fukuda, M., Jeromin, A., and Sagi-Eisenberg, R., 2006. Neuronal calcium sensor-1 and phosphatidylinositol 4-kinase beta stimulate extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling by accelerating recycling through the endocytic recycling compartment. *Mol. Biol. Cell* 17, 4130-4141.

Kiselyov, K., Xu, X., Mozhayeva, G., Kuo, T., Pessah, I., Mignery, G., Zhu, X., Birnbaumer, L., and Muallem, S., 1998. Functional interaction between InsP3 receptors and store-operated Htrp3 channels. *Nature* 396, 478-482.

Klenchin, V.A., Kowalchuk, J.A., and Martin, T.F., 1998. Large dense-core vesicle exocytosis in PC12 cells. *Methods* 16, 204-208.

Kobayashi, M., Masaki, T., Hori, K., Masuo, Y., Miyamoto, M., Tsubokawa, H., Noguchi, H., Nomura, M., and Takamatsu, K., 2005. Hippocalcin-deficient mice display a

defect in cAMP response element-binding protein activation associated with impaired spatial and associative memory. *Neuroscience* 133, 471-484.

Kobrinisky, E., Mirshahi, T., Zhang, H., Jin, T., and Logothetis, D.E., 2000. Receptor-mediated hydrolysis of plasma membrane messenger PIP2 leads to K⁺-current desensitization. *Nat. Cell Biol.* 2, 507-514.

Koh, P.O., Undie, A.S., Kabbani, N., Levenson, R., Goldman-Rakic, P.S., and Lidow, M.S., 2003. Up-regulation of neuronal calcium sensor-1 (NCS-1) in the prefrontal cortex of schizophrenic and bipolar patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 313-317.

Koh, P.O., Bergson, C., Undie, A.S., Goldman-Rakic, P.S., and Lidow, M.S., 2003. Up-regulation of the D1 dopamine receptor-interacting protein, calcyon, in patients with schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry* 60, 311-319.

Koh, T.W. and Bellen, H.J., 2003. Synaptotagmin I, a Ca²⁺ sensor for neurotransmitter release. *Trends Neurosci.* 26, 413-422.

Koizumi, S., Rosa, P., Willars, G.B., Challiss, R.A., Taverna, E., Francolini, M., Bootman, M.D., Lipp, P., Inoue, K., Roder, J., and Jeromin, A., 2002. Mechanisms underlying the neuronal calcium sensor-1-evoked enhancement of exocytosis in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 277, 30315-30324.

Krauss, M. and Haucke, V., 2007. Phosphoinositides: Regulators of membrane traffic and protein function. *FEBS Lett.* 581, 2105-2111.

Krystal, J.H., Perry, E.B., Jr., Gueorguieva, R., Belger, A., Madonick, S.H., bi-Dargham, A., Cooper, T.B., Macdougall, L., bi-Saab, W., and D'Souza, D.C., 2005. Comparative and interactive human psychopharmacologic effects of ketamine and amphetamine: implications for glutamatergic and dopaminergic model psychoses and cognitive function. *Arch. Gen. Psychiatry* 62, 985-994.

Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

LaFerla, F.M., 2002. Calcium dyshomeostasis and intracellular signalling in Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 862-872.

Lang, T., Bruns, D., Wenzel, D., Riedel, D., Holroyd, P., Thiele, C., and Jahn, R., 2001. SNAREs are concentrated in cholesterol-dependent clusters that define docking and fusion sites for exocytosis. *EMBO J.* 20, 2202-2213.

Lautermilch, N.J. and Spitzer, N.C., 2000. Regulation of calcineurin by growth cone calcium waves controls neurite extension. *J. Neurosci.* 20, 315-325.

Levey, A.I., Edmunds, S.M., Koliatsos, V., Wiley, R.G., and Heilman, C.J., 1995. Expression of m1-m4 muscarinic acetylcholine receptor proteins in rat hippocampus and regulation by cholinergic innervation. *J. Neurosci.* 15, 4077-4092.

Levey, A.I., 1996. Muscarinic acetylcholine receptor expression in memory circuits: implications for treatment of Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 13541-

13546.

Lidow, M.S., 2003. Calcium signaling dysfunction in schizophrenia: a unifying approach.

Brain Res. Brain Res. Rev. 43, 70-84.

Lievremont, J.P., Bird, G.S., and Putney, J.W., Jr., 2005. Mechanism of inhibition of TRPC

cation channels by 2-aminoethoxydiphenylborane. Mol. Pharmacol. 68, 758-762.

Lisman, J., Schulman, H., and Cline, H., 2002. The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. Nat. Rev. Neurosci. 3, 175-190.

Llinas, R.R., Sugimori, M., Moran, K.A., Moreira, J.E., and Fukuda, M., 2004. Vesicular reuptake inhibition by a synaptotagmin I C2B domain antibody at the squid giant synapse.

Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 101, 17855-17860.

Lohmann, C. and Wong, R.O., 2005. Regulation of dendritic growth and plasticity by local and global calcium dynamics. Cell Calcium 37, 403-409.

Mancama, D., Arranz, M.J., Landau, S., and Kerwin, R., 2003. Reduced expression of the muscarinic 1 receptor cortical subtype in schizophrenia. Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet. 119, 2-6.

Manns, I.D., Mainville, L., and Jones, B.E., 2001. Evidence for glutamate, in addition to acetylcholine and GABA, neurotransmitter synthesis in basal forebrain neurons projecting to the entorhinal cortex. Neuroscience 107, 249-263.

Marino, M.J., Rouse, S.T., Levey, A.I., Potter, L.T., and Conn, P.J., 1998. Activation of the genetically defined m1 muscarinic receptor potentiates N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor currents in hippocampal pyramidal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 11465-11470.

Martin, T.F. and Grishanin, R.N., 2003. PC12 cells as a model for studies of regulated secretion in neuronal and endocrine cells. *Methods Cell Biol.* 71, 267-286.

Maruyama, T., Kanaji, T., Nakade, S., Kanno, T., and Mikoshiba, K., 1997. 2APB, 2-aminoethoxydiphenyl borate, a membrane-penetrable modulator of Ins(1,4,5)P₃-induced Ca²⁺ release. *J. Biochem. (Tokyo)* 122, 498-505.

Mattson, M.P., LaFerla, F.M., Chan, S.L., Leissring, M.A., Shepel, P.N., and Geiger, J.D., 2000. Calcium signaling in the ER: its role in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci.* 23, 222-229.

Mattson, M.P. and Chan, S.L., 2003. Neuronal and glial calcium signaling in Alzheimer's disease. *Cell Calcium* 34, 385-397.

Mattson, M.P. and Chan, S.L., 2003. Calcium orchestrates apoptosis. *Nat. Cell Biol.* 5, 1041-1043.

McFerran, B.W., Graham, M.E., and Burgoyne, R.D., 1998. Neuronal Ca²⁺ sensor 1, the mammalian homologue of frequenin, is expressed in chromaffin and PC12 cells and regulates neurosecretion from dense-core granules. *J. Biol. Chem.* 273, 22768-22772.

Meyers, R. and Cantley, L.C., 1997. Cloning and characterization of a wortmannin-sensitive human phosphatidylinositol 4-kinase. *J. Biol. Chem.* 272, 4384-4390.

Mikhaylova, M., Sharma, Y., Reissner, C., Nagel, F., Aravind, P., Rajini, B., Smalla, K.H., Gundelfinger, E.D., and Kreutz, M.R., 2006. Neuronal Ca²⁺ signaling via caldendrin and calneurons. *Biochim. Biophys. Acta* 1763, 1229-1237.

Missiaen, L., Callewaert, G., De, S.H., and Parys, J.B., 2001. 2-Aminoethoxydiphenyl borate affects the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, the intracellular Ca²⁺ pump and the non-specific Ca²⁺ leak from the non-mitochondrial Ca²⁺ stores in permeabilized A7r5 cells. *Cell Calcium* 29, 111-116.

Missiaen, L., Callewaert, G., De, S.H., and Parys, J.B., 2001. 2-Aminoethoxydiphenyl borate affects the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, the intracellular Ca²⁺ pump and the non-specific Ca²⁺ leak from the non-mitochondrial Ca²⁺ stores in permeabilized A7r5 cells. *Cell Calcium* 29, 111-116.

Monterrat, C., Grise, F., Benassy, M.N., Hemar, A., and Lang, J., 2007. The calcium-sensing protein synaptotagmin 7 is expressed on different endosomal compartments in endocrine, neuroendocrine cells or neurons but not on large dense core vesicles. *Histochem. Cell Biol.*

Mora, S., Durham, P.L., Smith, J.R., Russo, A.F., Jeromin, A., and Pessin, J.E., 2002. NCS-1 inhibits insulin-stimulated GLUT4 translocation in 3T3L1 adipocytes through a phosphatidylinositol 4-kinase-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* 277, 27494-27500.

Mrzljak, L., Levey, A.I., and Goldman-Rakic, P.S., 1993. Association of m1 and m2 muscarinic receptor proteins with asymmetric synapses in the primate cerebral cortex: morphological evidence for cholinergic modulation of excitatory neurotransmission. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90, 5194-5198.

Nahorski, S.R., Young, K.W., John Challiss, R.A., and Nash, M.S., 2003. Visualizing phosphoinositide signalling in single neurons gets a green light. *Trends Neurosci.* 26, 444-452.

Nakamura, T.Y., Pountney, D.J., Ozaita, A., Nandi, S., Ueda, S., Rudy, B., and Coetzee, W.A., 2001. A role for frequenin, a Ca²⁺-binding protein, as a regulator of Kv4 K⁺ currents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 12808-12813.

Nakamura, T.Y., Jeromin, A., Smith, G., Kurushima, H., Koga, H., Nakabeppu, Y., Wakabayashi, S., and Nabekura, J., 2006. Novel role of neuronal Ca²⁺ sensor-1 as a survival factor up-regulated in injured neurons. *J. Cell Biol.* 172, 1081-1091.

Nash, M.S., Young, K.W., Willars, G.B., Challiss, R.A., and Nahorski, S.R., 2001. Single-cell imaging of graded Ins(1,4,5)P₃ production following G-protein-coupled-receptor activation. *Biochem. J.* 356, 137-142.

Nef, S., Fiumelli, H., De, C.E., Raes, M.B., and Nef, P., 1995. Identification of neuronal calcium sensor (NCS-1) possibly involved in the regulation of receptor phosphorylation. *J. Recept. Signal. Transduct. Res.* 15, 365-378.

Negyessy, L. and Goldman-Rakic, P.S., 2005. Subcellular localization of the dopamine D2 receptor and coexistence with the calcium-binding protein neuronal calcium sensor-1 in the primate prefrontal cortex. *J. Comp Neurol.* 488, 464-475.

Nelson, M.D., Saykin, A.J., Flashman, L.A., and Riordan, H.J., 1998. Hippocampal volume reduction in schizophrenia as assessed by magnetic resonance imaging: a meta-analytic study. *Arch. Gen. Psychiatry* 55, 433-440.

Nicholas, A.P., Pieribone, V.A., Arvidsson, U., and Hokfelt, T., 1992. Serotonin-, substance P- and glutamate/aspartate-like immunoreactivities in medullo-spinal pathways of rat and primate. *Neuroscience* 48, 545-559.

Nicholls, D.G., Sihra, T.S., and Sanchez-Prieto, J., 1987. Calcium-dependent and -independent release of glutamate from synaptosomes monitored by continuous fluorometry. *J. Neurochem.* 49, 50-57.

Nilius, B., Owsianik, G., Voets, T., and Peters, J.A., 2007. Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiol Rev.* 87, 165-217.

Novak, G., Seeman, P., and Talerico, T., 2000. Schizophrenia: elevated mRNA for calcium-calmodulin-dependent protein kinase IIbeta in frontal cortex. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 82, 95-100.

O'Callaghan, D.W., Ivings, L., Weiss, J.L., Ashby, M.C., Tepikin, A.V., and Burgoyne, R.D., 2002. Differential use of myristoyl groups on neuronal calcium sensor proteins as a

determinant of spatio-temporal aspects of Ca²⁺ signal transduction. *J. Biol. Chem.* 277, 14227-14237.

O'Callaghan, D.W. and Burgoyne, R.D., 2003. Role of myristoylation in the intracellular targeting of neuronal calcium sensor (NCS) proteins. *Biochem. Soc. Trans.* 31, 963-965.

Ogden, C.A., Rich, M.E., Schork, N.J., Paulus, M.P., Geyer, M.A., Lohr, J.B., Kuczenski, R., and Niculescu, A.B., 2004. Candidate genes, pathways and mechanisms for bipolar (manic-depressive) and related disorders: an expanded convergent functional genomics approach. *Mol. Psychiatry* 9, 1007-1029.

Ohta, T., Morishita, M., Mori, Y., and Ito, S., 2004. Ca²⁺ store-independent augmentation of [Ca²⁺]_i responses to G-protein coupled receptor activation in recombinantly TRPC5-expressed rat pheochromocytoma (PC12) cells. *Neurosci. Lett.* 358, 161-164.

Olafsson, P., Wang, T., and Lu, B., 1995. Molecular cloning and functional characterization of the *Xenopus* Ca(2+)-binding protein frequenin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 8001-8005.

Olney, J.W. and Farber, N.B., 1995. Glutamate receptor dysfunction and schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry* 52, 998-1007.

Olney, J.W., Newcomer, J.W., and Farber, N.B., 1999. NMDA receptor hypofunction model of schizophrenia. *J. Psychiatr. Res.* 33, 523-533.

Ottersen, O.P. and Storm-Mathisen, J., 1984. Glutamate- and GABA-containing neurons in

the mouse and rat brain, as demonstrated with a new immunocytochemical technique. *J. Comp Neurol.* 229, 374-392.

Oude Weernink, P.A., Schmidt, M., and Jakobs, K.H., 2004. Regulation and cellular roles of phosphoinositide 5-kinases. *Eur. J. Pharmacol.* 500, 87-99.

Oude Weernink, P.A., Han, L., Jakobs, K.H., and Schmidt, M., 2007. Dynamic phospholipid signaling by G protein-coupled receptors. *Biochim. Biophys. Acta* 1768, 888-900.

Palczewski, K., Polans, A.S., Baehr, W., and Ames, J.B., 2000. Ca(2+)-binding proteins in the retina: structure, function, and the etiology of human visual diseases. *Bioessays* 22, 337-350.

Pennesi, M.E., Howes, K.A., Baehr, W., and Wu, S.M., 2003. Guanylate cyclase-activating protein (GCAP) 1 rescues cone recovery kinetics in GCAP1/GCAP2 knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 6783-6788.

Polo, S. and Di Fiore, P.P., 2006. Endocytosis conducts the cell signaling orchestra. *Cell* 124, 897-900.

Pongs, O., Lindemeier, J., Zhu, X.R., Theil, T., Engelkamp, D., Krah-Jentgens, I., Lambrecht, H.G., Koch, K.W., Schwemer, J., Rivosecchi, R., and ., 1993. Frequenin--a novel calcium-binding protein that modulates synaptic efficacy in the *Drosophila* nervous system. *Neuron* 11, 15-28.

Porter, A.C., Bymaster, F.P., DeLapp, N.W., Yamada, M., Wess, J., Hamilton, S.E., Nathanson, N.M., and Felder, C.C., 2002. M1 muscarinic receptor signaling in mouse hippocampus and cortex. *Brain Res.* 944, 82-89.

Power, A.E., Vazdarjanova, A., and McGaugh, J.L., 2003. Muscarinic cholinergic influences in memory consolidation. *Neurobiol. Learn. Mem.* 80, 178-193.

Pronin, A.N., Satpaev, D.K., Slepak, V.Z., and Benovic, J.L., 1997. Regulation of G protein-coupled receptor kinases by calmodulin and localization of the calmodulin binding domain. *J. Biol. Chem.* 272, 18273-18280.

Rajebhosale, M., Greenwood, S., Vidugiriene, J., Jeromin, A., and Hilfiker, S., 2003. Phosphatidylinositol 4-OH kinase is a downstream target of neuronal calcium sensor-1 in enhancing exocytosis in neuroendocrine cells. *J. Biol. Chem.* 278, 6075-6084.

Reis, H.J., Massensini, A.R., Prado, M.A., Gomez, R.S., Gomez, M.V., and Romano-Silva, M.A., 2000. Calcium channels coupled to depolarization-evoked glutamate release in the myenteric plexus of guinea-pig ileum. *Neuroscience* 101, 237-242.

Reynolds, G.P., Zhang, Z.J., and Beasley, C.L., 2001. Neurochemical correlates of cortical GABAergic deficits in schizophrenia: selective losses of calcium binding protein immunoreactivity. *Brain Res. Bull.* 55, 579-584.

Romano-Silva, M.A., Ribeiro-Santos, R., Ribeiro, A.M., Gomez, M.V., Diniz, C.R., Cordeiro, M.N., and Brammer, M.J., 1993. Rat cortical synaptosomes have more than one

mechanism for Ca²⁺ entry linked to rapid glutamate release: studies using the Phoneutria nigriventer toxin PhTX2 and potassium depolarization. *Biochem. J.* 296 (Pt 2), 313-319.

Romero, O., Figueroa, S., Vicente, S., Gonzalez, M.P., and Oset-Gasque, M.J., 2003. Molecular mechanisms of glutamate release by bovine chromaffin cells in primary culture. *Neuroscience* 116, 817-829.

Sabatini, B.L. and Regehr, W.G., 1996. Timing of neurotransmission at fast synapses in the mammalian brain. *Nature* 384, 170-172.

Sabatini, B.L., Oertner, T.G., and Svoboda, K., 2002. The life cycle of Ca⁽²⁺⁾ ions in dendritic spines. *Neuron* 33, 439-452.

Saegusa, C., Fukuda, M., and Mikoshiba, K., 2002. Synaptotagmin V is targeted to dense-core vesicles that undergo calcium-dependent exocytosis in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 277, 24499-24505.

Sallese, M., Iacovelli, L., Cumashi, A., Capobianco, L., Cuomo, L., and De, B.A., 2000. Regulation of G protein-coupled receptor kinase subtypes by calcium sensor proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1498, 112-121.

Sampath, A.P., Strissel, K.J., Elias, R., Arshavsky, V.Y., McGinnis, J.F., Chen, J., Kawamura, S., Rieke, F., and Hurley, J.B., 2005. Recoverin improves rod-mediated vision by enhancing signal transmission in the mouse retina. *Neuron* 46, 413-420.

Sanchez-Prieto, J., Sihra, T.S., and Nicholls, D.G., 1987. Characterization of the exocytotic

release of glutamate from guinea-pig cerebral cortical synaptosomes. *J. Neurochem.* 49, 58-64.

Santarius, M., Lee, C.H., and Anderson, R.A., 2006. Supervised membrane swimming: small G-protein lifeguards regulate PIPK signalling and monitor intracellular PtdIns(4,5)P₂ pools. *Biochem. J.* 398, 1-13.

Sarter, M. and Bruno, J.P., 1998. Cortical acetylcholine, reality distortion, schizophrenia, and Lewy Body Dementia: too much or too little cortical acetylcholine? *Brain Cogn* 38, 297-316.

Scalettar, B.A., Rosa, P., Taverna, E., Francolini, M., Tsuboi, T., Terakawa, S., Koizumi, S., Roder, J., and Jeromin, A., 2002. Neuronal calcium sensor-1 binds to regulated secretory organelles and functions in basal and stimulated exocytosis in PC12 cells. *J. Cell Sci.* 115, 2399-2412.

Scarr, E., Sundram, S., Keriakous, D., and Dean, B., 2007. Altered Hippocampal Muscarinic M4, but Not M1, Receptor Expression from Subjects with Schizophrenia. *Biol. Psychiatry.*

Schaad, N.C., De, C.E., Nef, S., Hegi, S., Hinrichsen, R., Martone, M.E., Ellisman, M.H., Sikkink, R., Rusnak, F., Sygush, J., and Nef, P., 1996. Direct modulation of calmodulin targets by the neuronal calcium sensor NCS-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 9253-9258.

Schafer, M.K., Varoqui, H., Defamie, N., Weihe, E., and Erickson, J.D., 2002. Molecular cloning and functional identification of mouse vesicular glutamate transporter 3 and its expression in subsets of novel excitatory neurons. *J. Biol. Chem.* 277, 50734-50748.

Schlador, M.L. and Nathanson, N.M., 1997. Synergistic regulation of m2 muscarinic acetylcholine receptor desensitization and sequestration by G protein-coupled receptor kinase-2 and beta-arrestin-1. *J. Biol. Chem.* 272, 18882-18890.

Schlecker, C., Boehmerle, W., Jeromin, A., DeGray, B., Varshney, A., Sharma, Y., Szigeti-Buck, K., and Ehrlich, B.E., 2006. Neuronal calcium sensor-1 enhancement of InsP3 receptor activity is inhibited by therapeutic levels of lithium. *J. Clin. Invest* 116, 1668-1674.

Schubert, F., Gallinat, J., Seifert, F., and Rinneberg, H., 2004. Glutamate concentrations in human brain using single voxel proton magnetic resonance spectroscopy at 3 Tesla. *Neuroimage.* 21, 1762-1771.

Schwaller, B., Meyer, M., and Schiffmann, S., 2002. 'New' functions for 'old' proteins: the role of the calcium-binding proteins calbindin D-28k, calretinin and parvalbumin, in cerebellar physiology. Studies with knockout mice. *Cerebellum.* 1, 241-258.

Selemon, L.D., Rajkowska, G., and Goldman-Rakic, P.S., 1995. Abnormally high neuronal density in the schizophrenic cortex. A morphometric analysis of prefrontal area 9 and occipital area 17. *Arch. Gen. Psychiatry* 52, 805-818.

Selemon, L.D., 2004. Increased cortical neuronal density in schizophrenia. *Am. J. Psychiatry* 161, 1564.

Shiozaki, K., Iseki, E., Hino, H., and Kosaka, K., 2001. Distribution of m1 muscarinic acetylcholine receptors in the hippocampus of patients with Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies-an immunohistochemical study. *J. Neurol. Sci.* 193, 23-28.

Sippy, T., Cruz-Martin, A., Jeromin, A., and Schweizer, F.E., 2003. Acute changes in short-term plasticity at synapses with elevated levels of neuronal calcium sensor-1. *Nat. Neurosci.* 6, 1031-1038.

Skerry, T.M. and Genever, P.G., 2001. Glutamate signalling in non-neuronal tissues. *Trends Pharmacol. Sci.* 22, 174-181.

Sorensen, S.D., McEwen, E.L., Linseman, D.A., and Fisher, S.K., 1997. Agonist-induced endocytosis of muscarinic cholinergic receptors: relationship to stimulated phosphoinositide turnover. *J. Neurochem.* 68, 1473-1483.

Sorensen, S.D., Linseman, D.A., McEwen, E.L., Heacock, A.M., and Fisher, S.K., 1999. Inhibition of beta(2)-adrenergic and muscarinic cholinergic receptor endocytosis after depletion of phosphatidylinositol bisphosphate. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 290, 603-610.

Sorensen, S.D., Linseman, D.A., and Fisher, S.K., 1999. Distinct mechanisms for the endocytosis of muscarinic receptors and Gq/11. *Eur. J. Pharmacol.* 372, 325-328.

Souza, B.R., Souza, R.P., Rosa, D.V., Guimaraes, M.M., Correa, H., and Romano-Silva,

M.A., 2006. Dopaminergic intracellular signal integrating proteins: relevance to schizophrenia. *Dialogues. Clin. Neurosci.* 8, 95-100.

Spitzer, N.C., Lautermilch, N.J., Smith, R.D., and Gomez, T.M., 2000. Coding of neuronal differentiation by calcium transients. *Bioessays* 22, 811-817.

Stauffer, T.P., Ahn, S., and Meyer, T., 1998. Receptor-induced transient reduction in plasma membrane PtdIns(4,5)P₂ concentration monitored in living cells. *Curr. Biol.* 8, 343-346.

Stone, J.M., Morrison, P., and Pilowsky, L.S., 2007. Glutamate and dopamine dysregulation in schizophrenia - a synthesis and selective review. *J. Psychopharmacol.*

Strubing, C., Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., and Clapham, D.E., 2001. TRPC1 and TRPC5 form a novel cation channel in mammalian brain. *Neuron* 29, 645-655.

Sugita, S., Han, W., Butz, S., Liu, X., Fernandez-Chacon, R., Lao, Y., and Sudhof, T.C., 2001. Synaptotagmin VII as a plasma membrane Ca²⁺ sensor in exocytosis. *Neuron* 30, 459-473.

Sulzer, D., Joyce, M.P., Lin, L., Geldwert, D., Haber, S.N., Hattori, T., and Rayport, S., 1998. Dopamine neurons make glutamatergic synapses in vitro. *J. Neurosci.* 18, 4588-4602.

Takamori, S., 2006. VGLUTs: 'exciting' times for glutamatergic research? *Neurosci. Res.* 55, 343-351.

Taverna, E., Francolini, M., Jeromin, A., Hilfiker, S., Roder, J., and Rosa, P., 2002. Neuronal calcium sensor 1 and phosphatidylinositol 4-OH kinase beta interact in neuronal cells and are translocated to membranes during nucleotide-evoked exocytosis. *J. Cell Sci.* 115, 3909-3922.

Taverna, E., Saba, E., Linetti, A., Longhi, R., Jeromin, A., Righi, M., Clementi, F., and Rosa, P., 2007. Localization of synaptic proteins involved in neurosecretion in different membrane microdomains. *J. Neurochem.* 100, 664-677.

TerBush, D.R. and Holz, R.W., 1986. Effects of phorbol esters, diglyceride, and cholinergic agonists on the subcellular distribution of protein kinase C in intact or digitonin-permeabilized adrenal chromaffin cells. *J. Biol. Chem.* 261, 17099-17106.

Theberge, J., Bartha, R., Drost, D.J., Menon, R.S., Malla, A., Takhar, J., Neufeld, R.W., Rogers, J., Pavlosky, W., Schaefer, B., Densmore, M., Al-Semaan, Y., and Williamson, P.C., 2002. Glutamate and glutamine measured with 4.0 T proton MRS in never-treated patients with schizophrenia and healthy volunteers. *Am. J. Psychiatry* 159, 1944-1946.

Theberge, J., Al-Semaan, Y., Williamson, P.C., Menon, R.S., Neufeld, R.W., Rajakumar, N., Schaefer, B., Densmore, M., and Drost, D.J., 2003. Glutamate and glutamine in the anterior cingulate and thalamus of medicated patients with chronic schizophrenia and healthy comparison subjects measured with 4.0-T proton MRS. *Am. J. Psychiatry* 160, 2231-2233.

Thompson, P.M., Vidal, C., Giedd, J.N., Gochman, P., Blumenthal, J., Nicolson, R., Toga,

A.W., and Rapoport, J.L., 2001. Mapping adolescent brain change reveals dynamic wave of accelerated gray matter loss in very early-onset schizophrenia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 11650-11655.

Tischler, A.S. and Greene, L.A., 1980. Phenotypic plasticity of pheochromocytoma and normal adrenal medullary cells. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* 25, 61-68.

Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 76, 4350-4354.

Trudeau, L.E., 2004. Glutamate co-transmission as an emerging concept in monoamine neuron function. *J. Psychiatry Neurosci.* 29, 296-310.

Tsuboi, T. and Fukuda, M., 2007. Synaptotagmin VII modulates the kinetics of dense-core vesicle exocytosis in PC12 cells. *Genes Cells* 12, 511-519.

Tsujimoto, T., Jeromin, A., Saitoh, N., Roder, J.C., and Takahashi, T., 2002. Neuronal calcium sensor 1 and activity-dependent facilitation of P/Q-type calcium currents at presynaptic nerve terminals. *Science* 295, 2276-2279.

Van Der Zee, E.A. and Luiten, P.G., 1993. GABAergic neurons of the rat dorsal hippocampus express muscarinic acetylcholine receptors. *Brain Res. Bull.* 32, 601-609.

Van Horn, J.D. and McManus, I.C., 1992. Ventricular enlargement in schizophrenia. A meta-analysis of studies of the ventricle:brain ratio (VBR). *Br. J. Psychiatry* 160, 687-697.

van Koppen, C.J. and Kaiser, B., 2003. Regulation of muscarinic acetylcholine receptor signaling. *Pharmacol. Ther.* 98, 197-220.

Varnai, P. and Balla, T., 1998. Visualization of phosphoinositides that bind pleckstrin homology domains: calcium- and agonist-induced dynamic changes and relationship to myo-[3H]inositol-labeled phosphoinositide pools. *J. Cell Biol.* 143, 501-510.

Varnai, P., Thyagarajan, B., Rohacs, T., and Balla, T., 2006. Rapidly inducible changes in phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate levels influence multiple regulatory functions of the lipid in intact living cells. *J. Cell Biol.* 175, 377-382.

Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W., Mural, R.J., Sutton, G.G., Smith, H.O., Yandell, M., Evans, C.A., Holt, R.A., Gocayne, J.D., Amanatides, P., Ballew, R.M., Huson, D.H., Wortman, J.R., Zhang, Q., Kodira, C.D., Zheng, X.H., Chen, L., Skupski, M., Subramanian, G., Thomas, P.D., Zhang, J., Gabor Miklos, G.L., Nelson, C., Broder, S., Clark, A.G., Nadeau, J., McKusick, V.A., Zinder, N., Levine, A.J., Roberts, R.J., Simon, M., Slayman, C., Hunkapiller, M., Bolanos, R., Delcher, A., Dew, I., Fasulo, D., Flanigan, M., Florea, L., Halpern, A., Hannenhalli, S., Kravitz, S., Levy, S., Mobarry, C., Reinert, K., Remington, K., bu-Threideh, J., Beasley, E., Biddick, K., Bonazzi, V., Brandon, R., Cargill, M., Chandramouliswaran, I., Charlab, R., Chaturvedi, K., Deng, Z., Di, F., V, Dunn, P., Eilbeck, K., Evangelista, C., Gabrielian, A.E., Gan, W., Ge, W., Gong, F., Gu, Z., Guan, P., Heiman, T.J., Higgins, M.E., Ji, R.R., Ke, Z., Ketchum, K.A., Lai, Z., Lei, Y., Li, Z., Li, J., Liang, Y., Lin, X., Lu, F., Merkulov, G.V., Milshina, N., Moore, H.M., Naik, A.K.,

Narayan, V.A., Neelam, B., Nusskern, D., Rusch, D.B., Salzberg, S., Shao, W., Shue, B., Sun, J., Wang, Z., Wang, A., Wang, X., Wang, J., Wei, M., Wides, R., Xiao, C., Yan, C., Yao, A., Ye, J., Zhan, M., Zhang, W., Zhang, H., Zhao, Q., Zheng, L., Zhong, F., Zhong, W., Zhu, S., Zhao, S., Gilbert, D., Baumhueter, S., Spier, G., Carter, C., Cravchik, A., Woodage, T., Ali, F., An, H., Awe, A., Baldwin, D., Baden, H., Barnstead, M., Barrow, I., Beeson, K., Busam, D., Carver, A., Center, A., Cheng, M.L., Curry, L., Danaher, S., Davenport, L., Desilets, R., Dietz, S., Dodson, K., Doup, L., Ferriera, S., Garg, N., Gluecksmann, A., Hart, B., Haynes, J., Haynes, C., Heiner, C., Hladun, S., Hostin, D., Houck, J., Howland, T., Ibegwam, C., Johnson, J., Kalush, F., Kline, L., Koduru, S., Love, A., Mann, F., May, D., McCawley, S., McIntosh, T., McMullen, I., Moy, M., Moy, L., Murphy, B., Nelson, K., Pfannkoch, C., Pratts, E., Puri, V., Qureshi, H., Reardon, M., Rodriguez, R., Rogers, Y.H., Romblad, D., Ruhfel, B., Scott, R., Sitter, C., Smallwood, M., Stewart, E., Strong, R., Suh, E., Thomas, R., Tint, N.N., Tse, S., Vech, C., Wang, G., Wetter, J., Williams, S., Williams, M., Windsor, S., Winn-Deen, E., Wolfe, K., Zaveri, J., Zaveri, K., Abril, J.F., Guigo, R., Campbell, M.J., Sjolander, K.V., Karlak, B., Kejariwal, A., Mi, H., Lazareva, B., Hatton, T., Narechania, A., Diemer, K., Muruganujan, A., Guo, N., Sato, S., Bafna, V., Istrail, S., Lippert, R., Schwartz, R., Walenz, B., Yooseph, S., Allen, D., Basu, A., Baxendale, J., Blick, L., Caminha, M., Carnes-Stine, J., Caulk, P., Chiang, Y.H., Coyne, M., Dahlke, C., Mays, A., Dombroski, M., Donnelly, M., Ely, D., Esparham, S., Fosler, C., Gire, H., Glanowski, S., Glasser, K., Glodek, A., Gorokhov, M., Graham, K., Gropman, B., Harris, M., Heil, J., Henderson, S., Hoover, J., Jennings, D., Jordan, C., Jordan, J., Kasha, J., Kagan, L., Kraft, C., Levitsky, A., Lewis, M., Liu, X.,

Lopez, J., Ma, D., Majoros, W., McDaniel, J., Murphy, S., Newman, M., Nguyen, T., Nguyen, N., and Nodell, M., 2001. The sequence of the human genome. *Science* 291, 1304-1351.

Waddington, J.L., 1993. Schizophrenia: developmental neuroscience and pathobiology. *Lancet* 341, 531-536.

Waddington, J.L., 1993. Neurodynamics of abnormalities in cerebral metabolism and structure in schizophrenia. *Schizophr. Bull.* 19, 55-69.

Wang, C.Y., Yang, F., He, X., Chow, A., Du, J., Russell, J.T., and Lu, B., 2001. Ca(2+) binding protein frequenin mediates GDNF-induced potentiation of Ca(2+) channels and transmitter release. *Neuron* 32, 99-112.

Wang, C.Y., Yang, F., He, X., Chow, A., Du, J., Russell, J.T., and Lu, B., 2001. Ca(2+) binding protein frequenin mediates GDNF-induced potentiation of Ca(2+) channels and transmitter release. *Neuron* 32, 99-112.

Wang, P., Chicka, M.C., Bhalla, A., Richards, D.A., and Chapman, E.R., 2005. Synaptotagmin VII is targeted to secretory organelles in PC12 cells, where it functions as a high-affinity calcium sensor. *Mol. Cell Biol.* 25, 8693-8702.

Weiss, J.L., Archer, D.A., and Burgoyne, R.D., 2000. Neuronal Ca²⁺ sensor-1/frequenin functions in an autocrine pathway regulating Ca²⁺ channels in bovine adrenal chromaffin cells. *J. Biol. Chem.* 275, 40082-40087.

Weiss, J.L. and Burgoyne, R.D., 2001. Voltage-independent inhibition of P/Q-type Ca²⁺ channels in adrenal chromaffin cells via a neuronal Ca²⁺ sensor-1-dependent pathway involves Src family tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* 276, 44804-44811.

Weisz, O.A., Gibson, G.A., Leung, S.M., Roder, J., and Jeromin, A., 2000. Overexpression of frequenin, a modulator of phosphatidylinositol 4-kinase, inhibits biosynthetic delivery of an apical protein in polarized madin-darby canine kidney cells. *J. Biol. Chem.* 275, 24341-24347.

Werbonat, Y., Kleutges, N., Jakobs, K.H., and van Koppen, C.J., 2000. Essential role of dynamin in internalization of M2 muscarinic acetylcholine and angiotensin AT1A receptors. *J. Biol. Chem.* 275, 21969-21974.

Willems, J.M., Nash, M.S., Challiss, R.A., and Nahorski, S.R., 2004. Imaging of muscarinic acetylcholine receptor signaling in hippocampal neurons: evidence for phosphorylation-dependent and -independent regulation by G-protein-coupled receptor kinases. *J. Neurosci.* 24, 4157-4162.

Willems, J.M., Nahorski, S.R., and Challiss, R.A., 2005. Roles of phosphorylation-dependent and -independent mechanisms in the regulation of M1 muscarinic acetylcholine receptors by G protein-coupled receptor kinase 2 in hippocampal neurons. *J. Biol. Chem.* 280, 18950-18958.

Wojcik, S.M., Rhee, J.S., Herzog, E., Sigler, A., Jahn, R., Takamori, S., Brose, N., and Rosenmund, C., 2004. An essential role for vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1) in

postnatal development and control of quantal size. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 7158-7163.

Woods, B.T., Ward, K.E., and Johnson, E.H., 2005. Meta-analysis of the time-course of brain volume reduction in schizophrenia: implications for pathogenesis and early treatment. *Schizophr. Res.* 73, 221-228.

Yang, B., Slonimsky, J.D., and Birren, S.J., 2002. A rapid switch in sympathetic neurotransmitter release properties mediated by the p75 receptor. *Nat. Neurosci.* 5, 539-545.

Zhao, X., Varnai, P., Tuymetova, G., Balla, A., Toth, Z.E., Oker-Blom, C., Roder, J., Jeromin, A., and Balla, T., 2001. Interaction of neuronal calcium sensor-1 (NCS-1) with phosphatidylinositol 4-kinase beta stimulates lipid kinase activity and affects membrane trafficking in COS-7 cells. *J. Biol. Chem.* 276, 40183-40189.

Zheng, Q., Bobich, J.A., Vidugiriene, J., McFadden, S.C., Thomas, F., Roder, J., and Jeromin, A., 2005. Neuronal calcium sensor-1 facilitates neuronal exocytosis through phosphatidylinositol 4-kinase. *J. Neurochem.* 92, 442-451.

Zhu, M.H., Chae, M., Kim, H.J., Lee, Y.M., Kim, M.J., Jin, N.G., Yang, D.K., So, I., and Kim, K.W., 2005. Desensitization of canonical transient receptor potential channel 5 by protein kinase C. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 289, C591-C600.

Zozulya, S. and Stryer, L., 1992. Calcium-myristoyl protein switch. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

U. S. A 89, 11569-11573.

Zucker, R.S., 2003. NCS-1 stirs somnolent synapses. *Nat. Neurosci.* 6, 1006-1008.

Facilitation of evoked glutamate release in PC12 cells overexpressing Neuronal Calcium Sensor-1 (NCS-1)

Melissa M. Guimarães^{1,2}, Helton J. Reis^{1,2}, Lívia P. Guimarães^{1,2}, Daniel S. Carneiro^{1,2},
Marcus V. Gomez², Andreas Jeromin³ and Marco A. Romano-Silva^{1,2}

¹Grupo de Pesquisa em Neuropsiquiatria Clínica e Molecular, Universidade Federal de Minas Gerais, Av Antonio Carlos 6627, Belo Horizonte 31270-901 Minas Gerais, Brazil

²Departamento de Farmacologia, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, Av Antonio Carlos 6627, Belo Horizonte 31270-901 Minas Gerais, Brazil

³Division of Neuroscience, Baylor College of Medicine, Vivian Smith Building, One Baylor Plaza, Houston, Texas 77030, USA

Corresponding author:

Marco A. Romano-Silva, MD, PhD

Departamento de Farmacologia – ICB

Universidade Federal de Minas Gerais

Av Antonio Carlos, 6627

31270-901 Belo Horizonte-MG, Brazil

Phone: +5531-3499-2719 Fax: +5531-3499-2983

e-mail: romano-silva@ufmg.br

Keywords: PC12 cells, Neuronal calcium sensor-1, glutamate release, calcium, phosphatidylinositol

ABSTRACT

Neuronal calcium sensor-1 (NCS-1) belongs to the superfamily of EF-hand Ca^{2+} binding protein. Overexpression of NCS-1 was implicated on potentiation of synaptic transmission and plasticity in many experimental models. In this study we investigated the possible involvement of NCS-1 in the facilitation of glutamate release evoked by two distinct stimuli in the neuronal-like pheochromocytoma (PC12) cell: membrane depolarization induced by 60mM KCl and GPCR activation induced by 300 μ M carbachol (CCH). Both KCl depolarization and G-protein coupled receptor activation by CCH evoked glutamate release from PC12 wild type cells (PC12-wt) and PC12 cells stable overexpressing NCS-1 (PC12-NCS-1) compared with control conditions. Both KCl depolarization and CCH stimulation were more efficient to evoke glutamate release from PC12-NCS-1 cells when compared with release evoked from PC12-wt cells. The increased glutamate release induced by CCH from PC12-NCS-1 cells was independent of extracellular calcium entry, however this effect was dependent on extracellular calcium influx when depolarized with KCl. At permeabilizing conditions both PC12-NCS-1 and PC12-wt stimulated with CCH were able to increase glutamate release compared with non-stimulated cells indicating that part of glutamate release could be originated from vesicles source. Thus, our results suggest together that the NCS-1 facilitation of glutamate release could respond to different stimuli and is related to the increase in intracellular calcium originated from the extracellular compartment when associated to depolarization stimuli and from intracellular stores when associated to GPCR activation.

INTRODUCTION

The neuronal Ca^{2+} sensor-1 (NCS-1) is a member of an important family of proteins able to detect and transduce Ca^{2+} signals in several functions such as regulation of ion channels and G-protein coupled receptors (GPCR) (Nef et al., 1995; McFerran et al., 1998; Weiss and Burgoyne, 2001; Guo et al., 2002; Kabbani et al., 2002), phospholipid metabolism, (Hendricks et al., 1999; Zhao et al., 2001; Rajebhosale et al., 2003; Haynes et al., 2005) and learning (Gomez et al., 2001). NCS-1 has four EF-hand motifs, three of which act as intracellular Ca^{2+} sensors capable of differentiating between spatially and temporally distinct Ca^{2+} signals in the submicromolar range (Hilfiker, 2003; Burgoyne, 2007). At its N-terminus, NCS-1 has a myristoyl tail, which can be anchored in membranes as diverse as tubular like structures, plasma membrane, and synaptic-like microvesicles (SLMVs) (Scalettar et al., 2002; Taverna et al., 2002; O'Callaghan e Burgoyne, 2003; Jeromin et al., 2004). This capacity might be important to allow NCS-1 rapid response to localized Ca^{2+} signals.

In cromaffins and pheochromocytoma (PC12) neuroendocrine cells, overexpression of NCS-1 was found to potentiate Ca^{2+} -dependent exocytosis of dense-core granules (Pongs e cols., 1993; McFerran e cols., 1998; Burgoyne e Weiss, 2001; Koizumi et al., 2002; Scarlettar et al., 2002; Kapp-Barnea e cols., 2003,). Although there is a wide range of NCS-1 intracellular effects reported in distinct models, the precise mechanisms of NCS-1 action on the potentiation of neurotransmission remains unknown. Accumulating evidence suggests that NCS-1 can facilitate functional synaptic contacts by recruiting quiescent vesicles, changing the lipid/protein composition of membranes

and/or affecting the efficiency with which a vesicle fuses upon Ca^{2+} influx. In addition, NCS-1 could enhance the amount and/or activity of presynaptic channels like voltage gated Ca^{2+} and K^+ channels and/or postsynaptic receptors (Weiss et al., 2001; Guo et al., 2002; Tsujimoto et al., 2002).

While independent published data indicated that NCS-1 has a pivot role in regulating functions like voltage gated channels, GPCR and phosphoinositide metabolism, there is the possibility that NCS-1 potentiates neurotransmission by integrating different pathways.

In this study we characterized the release of endogenous glutamate from PC12 cells stimulated with KCl or carbachol (CCH), and tested the effect of overexpression of NCS-1. Our results showed that NCS-1 was involved on the facilitation of glutamate release induced by both depolarization and GPCR activation in PC12 cells. This facilitation by NCS-1 occurred in the presence or absence of extracellular Ca^{2+} , depending on the agent used, respectively, GPCR-linked CCH activation or membrane depolarization with KCl.

MATERIAL AND METHODS

Cell culture:

We used PC12 cells stably overexpressing NCS-1 at levels 3-fold above constitutive levels in PC12-wt, as previously described (Koizumi et al, 2002). PC12-wt and PC12-NCS-1 cells were kindly provided by Dr. A. Jeromin (Baylor College of Medicine-Houston Texas, USA). Cells were maintained in high glucose DMEM supplemented with 1% penicillin /streptomycin (P/S), 5% fetal bovine serum (FBS) and

5% horse serum (HS). Every two days the medium was changed and every week cells were moved to a new flask. In order to assure NCS-1 stable overexpression, PC12-NCS-1 cells were maintained in high glucose DMEM supplemented with 1% penicillin/streptomycin (P/S), 5% fetal bovine serum (FBS) and 5% horse serum (HS) supplemented with 100µg/mL G418 (as described by Koizumi et al., 2002).

For glutamate release experiments, PC12-wt and PC12-NCS-1 cells were plated (2×10^5 cells) onto 60mm plates and differentiated during four days with 100ng/mL of NGF-7S in high glucose DMEM supplemented with 2.5% FBS, 2.5% HS and 1% P/S. For PC12-NCS-1 cells, the differentiation medium was supplemented with G418 (100µg/mL).

All cell culture reagents were purchased from Invitrogen Corporation (NY-USA) except for G418 that was purchased from Calbiochem (USA). All other analytical grade chemicals were obtained from reliable commercial sources.

Glutamate release

Differentiated PC12-NCS-1 and PC12-wt cells plated in 60mm culture dishes were incubated with agonists and drugs during 15 minutes at 37°C in atmosphere containing 5% CO₂. CCH (300µM) and CCH plus atropine (10µM) were prepared in Krebs-Ringer-HEPES (KRH) solution (MgSO₄ 1.2mM, NaCl 124mM, KCl 4mM, HEPES 25mM, glucose 10mM, pH 7.4) containing 2mM CaCl₂. To test the effect of extracellular Ca²⁺ on glutamate release CCH (300µM) was prepared in Krebs-Ringer containing 2mM EGTA.

KCl (60mM) was prepared in modified KRH solution consisting of (MgSO₄ 1.2mM, NaCl 68mM, KCl 60mM, HEPES 25mM, glucose 10mM, pH adjusted to 7.4) plus 2mM CaCl₂. To test the effect of extracellular Ca²⁺ on glutamate release evoked by KCl (60mM) we used the modified KRH with 2mM EGTA.

To test the glutamate release dependence on intracellular Ca²⁺ PC12-wt and PC12-NCS-1 cells were 20min pre-incubated with BAPTA-AM (20μM) in KRH containing 2mM CaCl. Then, both PC12 cells were stimulated with CCH (300μM) or KCl (60mM) in KRH containing 2mM EGTA.

The glutamate release originated from vesicle compartments were obtained by previous permeabilization of PC12-wt and PC12-NCS-1 with digitonin during 6min/37°C and then, stimulation of both cells with CCH (300μM).

Glutamate release measurements:

Glutamate release was detected by measuring the increase in fluorescence resultant from the production of NADPH in the presence of NADP and glutamate dehydrogenase by using a fluorimetric assay method described by Nicholls et al. (1987) and modified by Romano-Silva et al.(1993). In brief, 2.0 ml of supernatant containing glutamate released from PC12 cells was added to a cuvet and incubated with NADP (1 mM) and 50 units of glutamate dehydrogenase (EC1.4.1.3.). Fluorescence at 360 nm/450 nm (excitation/emission) was measured (Spectrophotofluorimeter Photon Technology International, Canada). After stabilization of the fluorescence signal at a plateau level, 5 nmol of glutamate was added as internal standard. Data were expressed as nmol of

glutamate per milligram of protein. (Sigma-Stat, Jandel Corporation). Differences were considered significant at $p < 0.05$ using non-paired Student's t-test.

Western blot analysis

Total cellular protein were extracted by incubating PC12-wt and PC12-NCS-1 cells during 1h/ 4°C in lysis buffer (MOPS pH:7,0, 2mM EGTA, 5mM EDTA, 30mM sodium fluoride, 40mM β -glycerophosphate, 20mM pyrophosphate, 1mM sodium orthovanadate, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 3mM benzamidine, 10 μ M leupeptin, 0,5% Nonidet P-40) following by 20min/4°C centrifugation at 14000 rpm. Total cellular proteins present at supernatants of PC12-wt and PC12-NCS-1 cells were quantified by Bradford staining methods. 50 μ g of protein homogenates of PC12-wt and PC12-NCS-1 were fractionated to 10% SDS-PAGE and transferred to the nitrocellulose membrane (Hybond-ECL, Amersham Biosciences, Germany). The membrane were incubated 2hs at room temperature in phosphate-buffered saline (PBS) with 5% non-fat milk containing mouse monoclonal antibody against vesicular glutamate transporter type 2 (v-GLUT2) (Chemicon USA) and mouse monoclonal antibody against actin (Chemicon USA) at concentrations of 1:1000 and 1:3000 respectively. The binding of the primary antibodies were detected by incubating membranes blot for 1h at room temperature with 1:7000 HRP-coupled goat anti-mouse secondary antibody (Molecular Probes, USA) diluted at PBS and performing detection with chemiluminescence ECL-kit system (Amersham Biosciences, Germany).

Immunohistochemistry

Differentiated PC12-wt and PC12-NCS-1 cells were washed one time with PBS/4°C and fixed with 100% methanol/4°C for 5 min, washed three times with 2mL of ice-cold PBS, and blocked using PBS containing 1,0% bovine serum albumine, 1,5% normal goat serum and 0,5% Nonidet P-40 during 20 min at room temperature. Cells were then incubated overnight/4°C with mouse monoclonal antibody against v-GLUT2 (1:500) diluted at PBS blocking solution. Cells were washed three times for 15 min in PBS and incubated for 1h at room temperature with fluorophore-conjugated Alexa fluor-568 goat anti-mouse secondary antibody (1:300) diluted in blocking solution. The cells were washed three times for 15 min in PBS and then used for immunofluorescence microscopy.

Immunofluorescent microscopy

Fluorescence microscopy was accomplished mounting the coverslip in the chamber onto the stage of a inverted microscope (Zeiss Axiovert 100) with a oil immersion objective (100x, 1.3 Plan-NEOFLUAR), coupled to a Bio-Rad MRC 1024 laser scanning confocal system using at confocal argon-krypton laser. Both PC12-wt and PC12-NCS-1 cells were scanned at ~ 0,2 μm steps in the z axis using excitation laser at 560nm and filter emission of HQ-598/40nm, iris: 3 and gain: 1200. The resulting optical z -sections collected were joined in one image and pseudocolored using Adobe Photoshop software.

RESULTS

High KCl and CCH are able to trigger neurotransmitter release via distinct mechanisms. It is well known that high KCl concentration induces membrane depolarization and influx of extracellular Ca^{2+} through voltage-dependent Ca^{2+} channels present at plasma membrane. On the other hand, CCH stimulates muscarinic receptors, inducing production of second messengers via PIP_2 cleavage generating InsP_3 and thus Ca^{2+} mobilization from intracellular stores. In this work we identified differences on glutamate release, between PC12-wt cells and PC12-NCS-1, evoked by depolarization with KCl or by stimulation with CCH. Although KCl stimulation was more efficient than CCH to induce glutamate release in both cell types (figure 1 and 2; table 1 and 2), KCl 60mM or CCH 300 μM , respectively, evoked larger amounts of glutamate release from PC12-NCS-1 cells (19.7 \pm 1.0 or 14.4 \pm 1.8 nmol/mg of protein) than from PC12-wt cells (15.3 \pm 1.0 or 8.3 \pm 0.9 nmol/mg of protein). These data suggested a facilitated response in PC12-NCS-1 cells compared with PC12-wt cells, which was independent of stimulating agent.

In order to investigate if the evoked glutamate release observed in PC12 cells was of vesicular origin, the cytosolic glutamate was depleted by permeabilizing PC12-wt and PC12-NCS-1 cells with 10 μM digitonin. Both digitonin-treated and non-treated PC12-wt and PC12-NCS-1 cells were incubated with 300 μM CCH. In this case, stimulus with 60mM KCl was not tested because it is not possible to depolarize permeabilized cells. We observed reduced levels of glutamate release in permeabilized and not stimulated PC12-wt and PC12-NCS-1 cells (figure 3A). However, a significant increase in evoked glutamate release was observed when compared with basal conditions in PC12-wt and

PC12-NCS-1 cells treated with digitonin. These findings suggest that part of the glutamate release was resultant from vesicular fusion to plasma membrane in both PC12-wt and PC12-NCS-1 cells. Glutamate release observed in permeabilized cells was also significantly dependent on extracellular Ca^{2+} (figure 3A). The effect of NCS-1 overexpression was abolished since it was observed similar levels of glutamate release in both cells, suggesting that the downstream pathways involved in NCS-1-dependent facilitation of glutamate release were disrupted by permeabilization (figure 3A). The idea that glutamate release observed in PC12 cells had a vesicular origin were supported by the detection of vesicular glutamate transporter type 2 (v-GLUT2) expression in PC12-wt and PC12-NCS-1 cells, both by confocal immunofluorescence images (figure 3B, left panel) and western blott analysis (figure 3B, right panel).

In PC12 cells overexpressing NCS-1 increased levels of dopamine and growth hormone release related to stimulation of particular intracellular pathways were shown (Burgoyne et al, 2001; Koizumi et al., 2002). In order to verify the specific involvement of the muscarinic signaling on glutamate release, PC12-wt and PC12-NCS-1 cells were perfused with CCH (300 μM) in the presence of 10 μM atropine, an unspecific antagonist of muscarinic receptor activation. Glutamate release after CCH stimulation in the presence of atropine in PC12-wt cells was not significantly inhibited compared to glutamate release induced by CCH alone (respectively, 6.2 ± 0.1 and 8.2 ± 0.9 nmol/mg of protein) (figure 2 and table 2). However, in PC12-NCS-1 cells atropine inhibited CCH-evoked glutamate release (4.2 ± 0.3 nmol/mg of protein) compared with CCH alone (14.4 ± 1.8 nmol/mg of protein) (figure 2 and table 2). In addition, it was observed a further inhibition of the atropine-sensitive glutamate release in PC12-NCS-1 cells (4.2 ± 0.3

nmol/mg of protein) compared with PC12-wt cells (6.2 ± 0.1 nmol/mg of protein) indicating a major muscarinic component responsible for glutamate facilitation in PC12-NCS-1 cells

In order to assess the influence of extracellular Ca^{2+} on glutamate release induced by KCl or CCH, PC12-wt and PC12-NCS-1 cells were stimulated in the presence of EGTA 2mM. In that condition, KCl effect was not different in both PC12-wt and PC12-NCS-1 cells (8.9 ± 0.5 and 8.6 ± 1.1 nmol/mg of protein, respectively) (figure 1 and table 1).. However, glutamate release induced by CCH ($300 \mu\text{M}$) remained significantly higher in PC12-NCS-1 cells when compared with PC12-wt cells (10.1 ± 0.5 and 5.7 ± 0.4 nmol/mg of protein, respectively) (figure 2 and table 2).

To test the participation of intracellular Ca^{2+} on evoked glutamate release, PC12-wt and PC12-NCS-1 cells were previously loaded with a fast Ca^{2+} chelator (BAPTA), followed by stimulation with KCl (60mM) or CCH ($300 \mu\text{M}$) in the presence of EGTA 2mM. It was observed a further, but not complete, inhibition of KCl-evoked glutamate release in PC12-wt and PC12-NCS-1 cells (figure 1 and table 1) when compared with stimulation in presence of EGTA 2mM alone. In contrast, the CCH effect on glutamate release was inhibited to basal levels in PC12-wt and PC12-NCS-1 cells (figure 2 and table 2).

DISCUSSION

Frequenin, the *Drosophila* homologue of NCS-1, acts as a modulator of synaptic efficacy (Pongs et al, 1993; Rivosecchi et al. 1994; Olafsson et al., 1995). NCS-1 was found to be involved on activity-dependent synaptic facilitation in the calyx of Held (Tsujimoto, 2003) and on increased long-term potentiation in mouse hippocampal glutamatergic synapses (Sippy et al., 2003). NCS-1 was also implicated in the facilitation of neurotransmitter and hormone release from large dense core granules, as observed for growth hormone (GH) release in response to ATP in PC12 cells overexpressing NCS-1 (McFerran BW et al., 1998). In addition, NCS-1 was also able to enhance secretion from small synaptic vesicles (Mc Ferran et al., 1998; Koizumi et al., 2002; Scalettar et al., 2002; Rajebhosale et al., 2003). To the best of our knowledge, this is the first report showing the effects of higher levels of NCS-1 expression on glutamate release by PC12 model upon depolarization or GPCR signaling stimulation. We have demonstrated that PC12 cells were able to release glutamate when stimulated with KCl (60mM) or CCH (300 μ M) via Ca²⁺ dependent and independent manners and that these effects were facilitated by overexpression of NCS-1 (Figures 1 and 2).

Glutamate release induced by KCl was $35.9 \pm 10.3\%$ s.e.m. (n=14) higher in PC12-NCS-1 cells than in PC12-wt cells. However, glutamate release induced by CCH in PC12-NCS-1 cells was $84.2 \pm 25.6\%$ s.e.m. (n=7) higher than in PC12-wt cells, supporting the hypothesis that the NCS-1 effect is also involved with modulation of metabotropic pathways. Remarkably, atropine exhibited a greater inhibitory effect on CCH-evoked glutamate release in PC12-NCS-1 cells than on release from PC12-wt cells (Figure 2), which was greater than that in presence of EGTA, indicating that the

potentiation effect of NCS-1 on glutamate release at PC12-NCS-1 was mainly resulted from metabotropic (muscarinic) origin. These data also suggest that glutamate release induced by CCH at PC12-wt cells seems to be more related to the activity of nicotinic receptor rather to muscarinic receptor activation.

Reported immunofluorescence experiments revealed a substantial co-localization of NCS-1 with the SLMV marker synaptophysin (Mc Ferran et al., 1998). In PC12 cells overexpressing NCS-1, this protein was found not to be associated with membranes of secretory granules but rather with synaptic microvesicle membranes (Koizumi et al., 2002). It was also shown the association of NCS-1 to detergent-resistant membranes isolated from synaptic vesicles of PC12 cells. These data demonstrated the formation of a exocytic machinery microregions containing beyond NCS-1, SNARE complex proteins, voltage dependent Ca^{2+} channel ($Ca_v2.1$), α subunit of G protein ($G\alpha$) and PIP2, corroborating to the idea of NCS-1 participation on vesicular exocytosis plasticity (Taverna et al., 2007). Glutamate is a major neurotransmitter that is released from SLMVs containing vesicular glutamate transporters in their membrane. It was previously shown that PC12 cells transfected with Vglut1 are able to uptake glutamate into SLMVs (Salazar et al., 2005) and we have shown that PC12 cells (wt and NCS-1) express Vglut2 (Figure 3B). By this way it could be possible that a percentage of facilitated glutamate release associated to higher levels of NCS-1 expression in PC12-NCS-1 could be induced throughout vesicular exocytosis. Not only the identification of Vglut2 in the vesicular compartments corroborates to the vesicular hypothesis of glutamate release at PC12 cells but also further evidence showing glutamate release dependent on Ca^{2+} induced by CCH in conditions of permeabilized cells with digitonin, prior to the stimulation (Figure 3).

Our data showed a different relationship with extracellular and intracellular sources of Ca^{2+} depending on the stimulus (KCl or CCH). In the absence of extracellular Ca^{2+} , glutamate release from PC12 cells was reduced when compared with glutamate release evoked by KCl or CCH in control conditions (Figures 1 and 2). However, in PC12-NCS-1 cells, CCH-evoked glutamate release was predominantly independent of extracellular Ca^{2+} influx (Figure 2). This effect is probably dependent on mobilization of Ca^{2+} from intracellular stores, as suggested by the strong inhibition of glutamate release from PC12-NCS-1 cells loaded with BAPTA followed by stimulation with CCH in the presence of EGTA (2mM) (Figure 2). Our data support the hypothesis that NCS-1 has an action on neurotransmission that is independent of voltage dependent Ca^{2+} channels (Zheng et al., 2005). Therefore it was described recently, structural and functional association of NCS-1 with InsP3 receptor (InsP3R). The activation of this complex was able to increase Ca^{2+} currents through InsP3R (Schlecker et al., 2006; Boehmerle et al., 2007). Based on these data, it could be suggested that the improvement of glutamate release that occur independently on extracellular Ca^{2+} influx results from facilitation of Ca^{2+} currents through InsP3 receptors.

Interestingly, KCl (60mM) depolarization was not able to induce $\text{PH}_{\text{PLC}\delta 1}$ EGFP translocation, an indicator of InsP3 production, either in PC12-wt or PC12-NCS-1 cells, while CCH facilitated cytosolic $\text{PH}_{\text{PLC}\delta 1}$ EGFP translocation in PC12-NCS-1 cells (data not shown), supporting the hypothesis that NCS-1, following GPCR activation, could modulate neurotransmitter release by a mechanism involving the phosphoinositide cycle and InsP₃ receptors activation (Zhao et al., 2001; Rajebhosale et al., 2003 and Zheng et al., 2005; Schlecker et al., 2006; Boehmerle et al., 2007). Voltage clamp experiments

demonstrated strong and consistent paired-pulse facilitation in NCS-1 transfected hippocampal synapses (Sippy et al., 2003). Our data showed that NCS-1 overexpression in PC12 cells could contribute not only to the enhancement of glutamate release coupled to second messenger cascades, but also to the facilitation of depolarization-evoked glutamate release, in a manner independent of PIP₂ breakdown. Our results are in agreement with consistent reports that support the idea that part of the effect of NCS-1, as a neurotransmission potentiator, is directly related to its interaction with PI4K β , by forming a complex that Zheng et al. (2005) named neuropotentiator (NP). This complex would act via regulation of membrane channels and/or vesicle cycles.

Beyond the exocytose of glutamate at fast neuronal synapses it also important to consider the release of this transmitter by other cells, like bone cells, megakaryocytes, primary cultured astrocytes, chromaffin and B-islet pancreatic cells (reviewed Skerry and Genever, 2001; Bezzi et al., 2004; Jourdain et al., 2007). With regard to glutamate function at chromaffin cell, it had been suggested a paracrine role of glutamate in the regulation of catecholamine secretion by this cells, once it was identified N-methyl-D-aspartate, NMDA; α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid, AMPA and kainic acid receptors at these cells (González et al., 1998; Romero et al., 2003). Thus if PC12 cells are originated from tumor of chromaffin cells; it is remarkable important to consider the possibility that facilitation of glutamate release observed at PC12-NCS-1, independent on vesicular or non-vesicular source, could also contribute to the modulatory effect of NCS-1 on catecholamine release. In fact, some reported data gives support to this hypothesis. It was already shown that NCS-1 overexpression is involved in the facilitation of norepinephrine and dopamine release in PC12 cells by mechanisms

dependent on Ca^{2+} influx (McFerran et al. 1998, 1999; Weisz et al. 2000; Weiss and Burgoyne 2001; Koizumi et al., 2002).

In conclusion, we have shown, for the first time, that endogenous glutamate can be released via a regulated (possibly vesicular) mechanism from PC12 cells and that this release can be potentiated by NCS-1 via pathways dependent on ion channels and via its involvement with phosphatidylinositol. Great importance of NCS-1 function at neurotransmitter cellular signaling came from *post-mortem* studies that found in the prefrontal cortex of schizophrenic patients increased levels of NCS-1 (Koh et al., 2003; Bai et al., 2004). Evidences of schizophrenia pathophysiology mechanisms has been showing that not only dopaminergic hypothesis is sufficient to describe and explain this transtorn. Because of treatment-resistant negative symptoms recent explanatory models extend other signaling transmission including the dysfunction of glutamatergic system (Stone et al., 2007). It was suggested a correlation between schizophrenia acute conditions to hypofunction of glutamatergic receptor (NMDA) following by neurodegeneration resulting from elevated glutamate release at frontal cortex and hippocampus (Olney and Farber, 1995; Harrison, 1999; Harrison et al., 2005; Jarskog et al., 2005; Glantz et al., 2006). Since more experiments will be necessary to elucidate the vesicular or non-vesicular origin of glutamate release at our model, it was clearly evident the facilitation and dependence at PC12-NCS-1 depolarized with KCl (60mM) or stimulated with GPCR agonist. If in the prefrontal cortex of schizophrenic *post-mortem* patient was found higher levels of NCS-1, so the improvement of glutamate release observed at PC12-NCS-1 model seems to corroborate to the mechanism of glutamatergic hypothesis dysfunction associated with schizophrenia transtorn. Considering this

emerging role of glutamate in several mental disorders exposed above, and the bidirectional tuning function of NCS-1 overexpression on glutamate release, facilitating even by mechanisms dependent on depolarization or GPCR stimuli, the elucidation of the mechanisms involved on the regulation of glutamate release by NCS-1 hold clear pathophysiological and therapeutic interests.

ACKNOWLEDGMENT

MVG and MAR-S are CNPq research fellows and DSC, MMG are holders of CNPq studentships. Financial support from CNPq Universal grant proc.#471837/2004-0, Programa Institutos do Milênio/CNPq/FINEP and FAPEMIG # CBB-453/04.

LEGENDS

Fig. 1 : Alterations at glutamate release in WT and NCS-1 PC12 cells provoked by KCl depolarization. Differentiated PC12 cells plated on 60mm plates were submitted to 5 min/ 37°C glutamate release assay induced by 60mM KCl depolarization or 60mM KCl in the presence of Ca²⁺ buffers. Dark and light bars are referent to NCS-1 and WT cells responses respectively. Grouped light and dark par of bars are correspondent respectively, to basal conditions of glutamate release, 60mM KCl isolated stimulus, 60mM KCl in the presence of 2mM EGTA and 20min 10µM BAPTA-AM pre treatment followed by 60mM KCl in the presence of 2mM EGTA. Glutamate release was expressed in nmol/mg of protein as average of at least three independent experiments. Statistical significance was considered as p < 0,05. * basal conditions compared with stimulus; ** WT response compared with NCS-1 cells response, *** KCl stimulation compared with experimental conditions (KCl plus EGTA or KCl plus BAPTA/EGTA).

Fig. 2 : Alterations at glutamate release in WT and NCS-1 PC12 cells provoked by CCH stimulation. Differentiated PC12 cells were submitted to 5 min/ 37°C glutamate release assay induced by 300µM CCH or 300µM CCH in the presence of Ca²⁺ buffers or muscarinic antagonist. Dark and light bars were referent to NCS-1 and WT cells respectively. Grouped light and dark par of bars are correspondent respectively to basal conditions of glutamate release, 300µM CCH isolated stimulus, 300µM CCH in the presence of 2mM EGTA, 20min 10µM BAPTA-AM pre treatment followed by 300µM CCH stimulation in the presence of 2mM EGTA and, finally, 300µM CCH in

concomitant presence of 10 μ M atropine was represented at the last group of bars. Glutamate release was expressed in nmol/mg of protein as average of at least three independent experiments. Statistical significance was considered as $p < 0,05$. * basal conditions compared with stimulus; ** WT response compared with NCS-1 cells response, *** CCH stimulation compared with experimental conditions (CCH plus EGTA, BAPTA plus CCH /EGTA or CCH plus atropine).

Table 1: Glutamate release induced by KCl at different experimental conditions.

Mean values of glutamate release (in nmol/mg of protein) from WT and NCS-1 PC12 cells stimulated during five minutes with 60mM KCl, 60mM KCl plus 2mM EGTA and 60mM KCl plus 2mM EGTA after 10 μ M BAPTA preincubation. Each treatment corresponds, at least, to three separated experiments performed at different days. Statistical significance was considered as $p < 0,05$. * basal conditions compared with stimulus; ** WT response compared with NCS-1 cells response, *** KCl stimulation compared with experimental conditions (KCl plus EGTA or KCl plus BAPTA/EGTA).

Table 2: Glutamate release induced by CCH at different experimental conditions.

Mean values of glutamate release (in nmol/mg of protein) from WT and NCS-1 PC12 cells stimulated during five minutes with 300 μ M CCH, 300 μ M CCH plus 2mM EGTA, 300 μ M CCH plus 2mM EGTA after 10 μ M BAPTA preincubation and 300 μ M CCH plus 10 μ M atropine. Each treatment corresponds, at least, to three separated experiments performed at different days. Statistical significance was considered as $p < 0,05$. * basal conditions compared with stimulus; ** WT response compared with NCS-1 cells

response, *** CCH stimulation compared with experimental conditions (CCH plus EGTA, BAPTA plus CCH /EGTA or CCH plus atropine).

Figure 3:

A: Glutamate release induced by CCH in PC12 cells permeabilized with digitonin.

Differentiated PC12 cells were incubated with 6 μ M digitonin during 6 min at room temperature and submitted to 15 min/ 37°C glutamate release assay at conditions without CCH (first par of bars), induced by 300 μ M CCH (second par of bars) and 300 μ M CCH in the presence of 2mM EGTA (third par of bars). The last par of bars corresponds to glutamate release induced by 300 μ M CCH at conditions without digitonin. Dark and light bars were referent to NCS-1 and WT cells respectively. Glutamate release was expressed in nmol/mg of protein as average of at least three independent experiments. Statistical significance was considered as $p < 0,0001$. * basal response after digitonin incubation compared with CCH stimulus after digitonin; ** CCH stimulation compared with EGTA-CCH both after digitonin conditions, *** CCH after digitonin incubation compared with isolated CCH stimulation. **B: Expression of v-GLUT type 2 at WT and NCS-1 PC12 cells.** Confocal images (upper panel) showing immunofluorescence expression of v-GLUT type 2 at WT and NCS-1 PC12 cells. The WT and NCS-1 cells were revealed with monoclonal antibodies mouse anti-vGLUT type 2 (1:500) and secondary antibody ALEXA 568nm conjugated with anti-mouse (1:300) (upper cells) and negative control revealed just with secondary antibody ALEXA 568nm conjugated with anti-mouse (1:300) (bottom cells). Western blott image (bottom panel) showing the expression of v-glut type 2 at WT and NCS-1 PC12 cell. The cells were labeled with

monoclonal antibodies mouse anti-vGLUT type 2 (1:1000) and revealed with secondary antibody anti-mouse conjugated with peroxidase (1:5000).

Figure 1

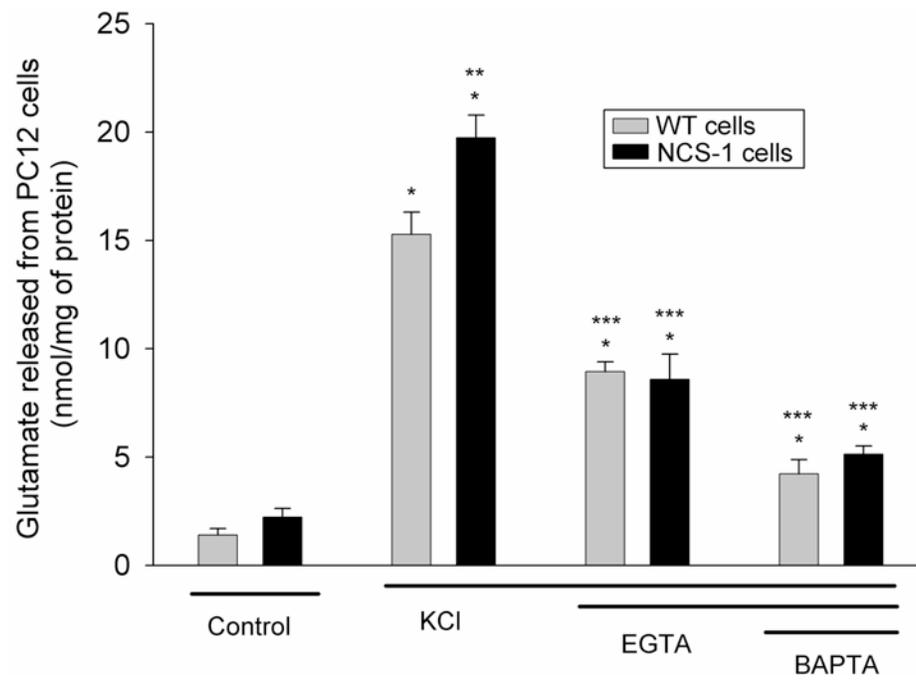


Figure 2

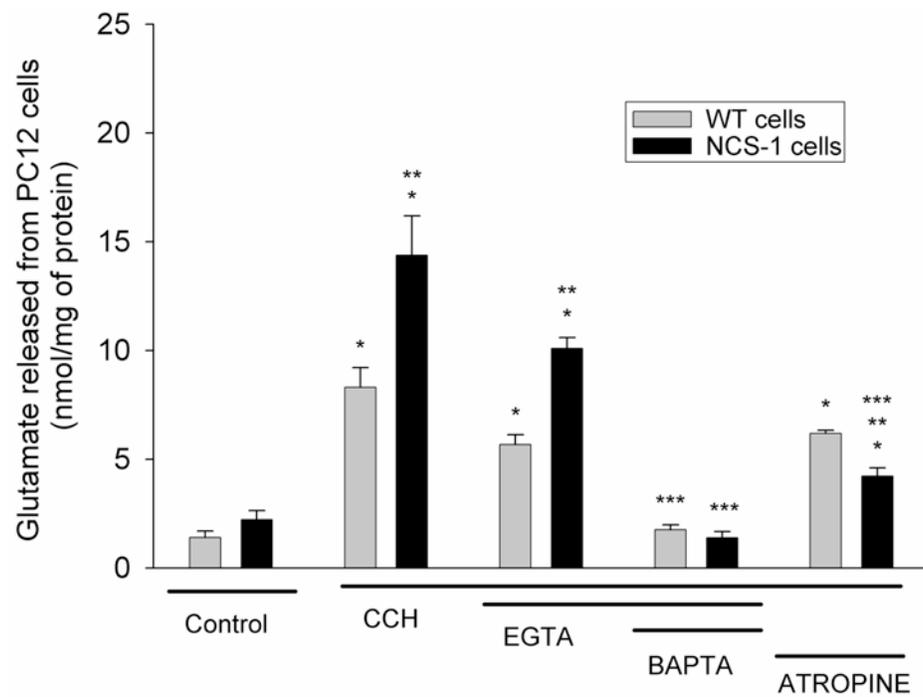
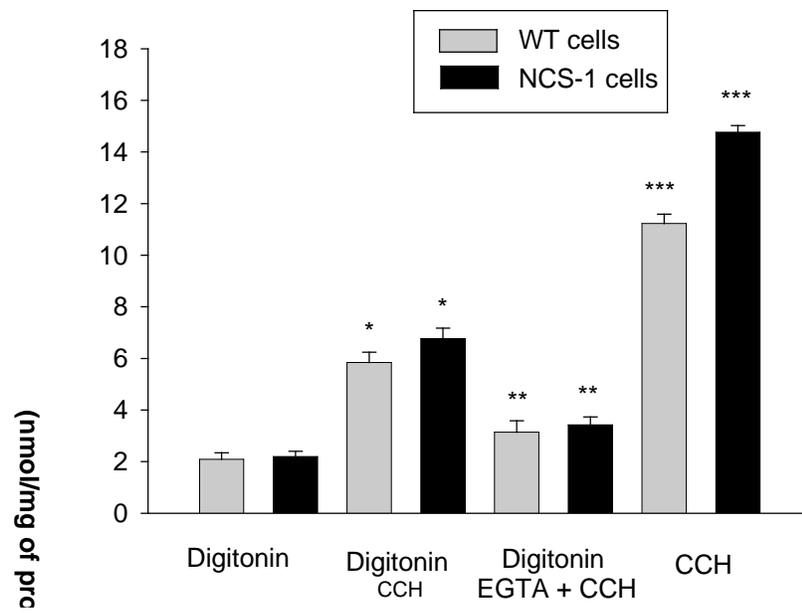


Figure 3

A)



B)

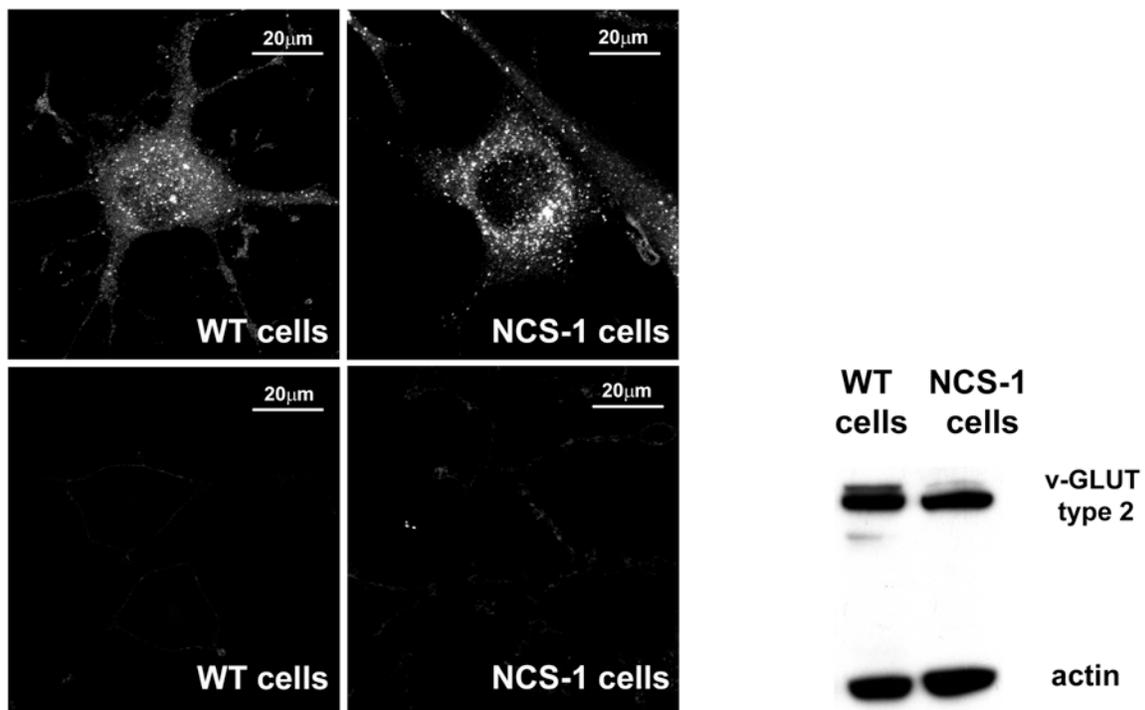


Table 1:

	Basal	KCl	KCl/EGTA	KCl/BAPTA/EGTA
	<i>nmol/mg of protein</i>	<i>nmol/mg of protein</i>	<i>nmol/mg of protein</i>	<i>nmol/mg of protein</i>
	<i>means±(sem)</i>	<i>means±(sem)</i>	<i>means±(sem)</i>	<i>means±(sem)</i>
<i>NCS-1 cells</i>	2.2 (0.4)	19.7 (1.0)*	8.6 (1.1)*,***	5.1 (0.4)*,***
<i>WT cells</i>	1.4 (0.3)	15.3 (1.0)*,**	8.9 (0.5)*,***	4.2 (0.6)*,***

Table 2:

	Basal <i>nmol/mg of protein</i> <i>means±(sem)</i>	CCH <i>nmol/mg of protein</i> <i>means±(sem)</i>	CCH/EGTA <i>nmol/mg of protein</i> <i>means±(sem)</i>	CCH/BAPTA/EGTA <i>nmol/mg of protein</i> <i>means±(sem)</i>	CCH/Atropine <i>nmol/mg of protein</i> <i>means±(sem)</i>
<i>NCS-1</i> <i>cells</i>	2.2 (0.4)	14.4 (1.8)*,**	10.1 (0.4)*,**	1.4 (0.3)***	4.2 (0.3)*,**,***
<i>WT</i> <i>cells</i>	1.4 (0.3)	8.3 (0.9)*	5.6 (0.4)*	1.7 (0.2)***	6.2 (0.1)*

REFERENCES

Bai, J., He, F., Novikova, S.I., Undie, A.S., Dracheva, S., Haroutunian, V., and Lidow, M.S., 2004. Abnormalities in the dopamine system in schizophrenia may lie in altered levels of dopamine receptor-interacting proteins. *Biol. Psychiatry* 56, 427-440.

Bezzi, P., Gundersen, V., Galbete, J.L., Seifert, G., Steinhauser, C., Pilati, E., and Volterra, A., 2004. Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate. *Nat. Neurosci.* 7, 613-620.

Boehmerle, W., Splittgerber, U., Lazarus, M.B., McKenzie, K.M., Johnston, D.G., Austin, D.J., and Ehrlich, B.E., 2006. Paclitaxel induces calcium oscillations via an inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and neuronal calcium sensor 1-dependent mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103, 18356-18361.

Burgoyne, R.D. and Weiss, J.L., 2001. The neuronal calcium sensor family of Ca²⁺-binding proteins. *Biochem. J.* 353, 1-12.

Burgoyne, R.D., 2007. Neuronal calcium sensor proteins: generating diversity in neuronal Ca²⁺ signalling. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 182-193.

Glantz, L.A., Gilmore, J.H., Lieberman, J.A., and Jarskog, L.F., 2006. Apoptotic mechanisms and the synaptic pathology of schizophrenia. *Schizophr. Res.* 81, 47-63.

Gonzalez, M.P., Herrero, M.T., Vicente, S., and Oset-Gasque, M.J., 1998. Effect of glutamate receptor agonists on catecholamine secretion in bovine chromaffin cells. *Neuroendocrinology* 67, 181-189.

Guo, W., Malin, S.A., Johns, D.C., Jeromin, A., and Nerbonne, J.M., 2002. Modulation of Kv4-encoded K(+) currents in the mammalian myocardium by neuronal calcium sensor-1. *J. Biol. Chem.* 277, 26436-26443.

Harrison, P.J., 1999. The neuropathology of schizophrenia. A critical review of the data and their interpretation. *Brain* 122 (Pt 4), 593-624.

Harrison, P.J. and Weinberger, D.R., 2005. Schizophrenia genes, gene expression, and neuropathology: on the matter of their convergence. *Mol. Psychiatry* 10, 40-68.

Haynes, L.P., Thomas, G.M., and Burgoyne, R.D., 2005. Interaction of neuronal calcium sensor-1 and ADP-ribosylation factor 1 allows bidirectional control of phosphatidylinositol 4-kinase beta and trans-Golgi network-plasma membrane traffic. *J. Biol. Chem.* 280, 6047-6054.

Hendricks, K.B., Wang, B.Q., Schnieders, E.A., and Thorner, J., 1999. Yeast homologue of neuronal frequenin is a regulator of phosphatidylinositol-4-OH kinase. *Nat. Cell Biol.* 1, 234-241.

Hilfiker, S., 2003. Neuronal calcium sensor-1: a multifunctional regulator of secretion. *Biochem. Soc. Trans.* 31, 828-832.

Jarskog, L.F., Glantz, L.A., Gilmore, J.H., and Lieberman, J.A., 2005. Apoptotic mechanisms in the pathophysiology of schizophrenia. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 29, 846-858.

Jeromin, A., Muralidhar, D., Parameswaran, M.N., Roder, J., Fairwell, T., Scarlata, S., Dowal, L., Mustafi, S.M., Chary, K.V., and Sharma, Y., 2004. N-terminal myristoylation regulates calcium-induced conformational changes in neuronal calcium sensor-1. *J. Biol. Chem.* 279, 27158-27167.

Jourdain, P., Bergersen, L.H., Bhaukaurally, K., Bezzi, P., Santello, M., Domercq, M., Matute, C., Tonello, F., Gundersen, V., and Volterra, A., 2007. Glutamate exocytosis from astrocytes controls synaptic strength. *Nat. Neurosci.* 10, 331-339.

Kabbani, N., Negyessy, L., Lin, R., Goldman-Rakic, P., and Levenson, R., 2002. Interaction with neuronal calcium sensor NCS-1 mediates desensitization of the D2 dopamine receptor. *J. Neurosci.* 22, 8476-8486.

Kapp-Barnea, Y., Melnikov, S., Shefler, I., Jeromin, A., and Sagi-Eisenberg, R., 2003. Neuronal calcium sensor-1 and phosphatidylinositol 4-kinase beta regulate IgE receptor-triggered exocytosis in cultured mast cells. *J. Immunol.* 171, 5320-5327.

Koh, P.O., Undie, A.S., Kabbani, N., Levenson, R., Goldman-Rakic, P.S., and Lidow, M.S., 2003. Up-regulation of neuronal calcium sensor-1 (NCS-1) in the prefrontal cortex of schizophrenic and bipolar patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 313-317.

Koizumi, S., Rosa, P., Willars, G.B., Challiss, R.A., Taverna, E., Francolini, M., Bootman, M.D., Lipp, P., Inoue, K., Roder, J., and Jeromin, A., 2002. Mechanisms

underlying the neuronal calcium sensor-1-evoked enhancement of exocytosis in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 277, 30315-30324.

McFerran, B.W., Graham, M.E., and Burgoyne, R.D., 1998. Neuronal Ca²⁺ sensor 1, the mammalian homologue of frequenin, is expressed in chromaffin and PC12 cells and regulates neurosecretion from dense-core granules. *J. Biol. Chem.* 273, 22768-22772.

Nef, S., Fiumelli, H., De, C.E., Raes, M.B., and Nef, P., 1995. Identification of neuronal calcium sensor (NCS-1) possibly involved in the regulation of receptor phosphorylation. *J. Recept. Signal. Transduct. Res.* 15, 365-378.

Nicholls, D.G., Sihra, T.S., and Sanchez-Prieto, J., 1987. Calcium-dependent and -independent release of glutamate from synaptosomes monitored by continuous fluorometry. *J. Neurochem.* 49, 50-57.

O'Callaghan, D.W. and Burgoyne, R.D., 2003. Role of myristoylation in the intracellular targeting of neuronal calcium sensor (NCS) proteins. *Biochem. Soc. Trans.* 31, 963-965.

Olafsson, P., Wang, T., and Lu, B., 1995. Molecular cloning and functional characterization of the *Xenopus* Ca(2+)-binding protein frequenin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 8001-8005.

Olney, J.W. and Farber, N.B., 1995. Glutamate receptor dysfunction and schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry* 52, 998-1007.

Pongs, O., Lindemeier, J., Zhu, X.R., Theil, T., Engelkamp, D., Krah-Jentgens, I., Lambrecht, H.G., Koch, K.W., Schwemer, J., Rivosecchi, R., and ., 1993. Frequenin--a novel calcium-binding protein that modulates synaptic efficacy in the *Drosophila* nervous system. *Neuron* 11, 15-28.

Rajebhosale, M., Greenwood, S., Vidugiriene, J., Jeromin, A., and Hilfiker, S., 2003. Phosphatidylinositol 4-OH kinase is a downstream target of neuronal calcium sensor-1 in enhancing exocytosis in neuroendocrine cells. *J. Biol. Chem.* 278, 6075-6084.

Rivosecchi, R., Pongs, O., Theil, T., and Mallart, A., 1994. Implication of frequenin in the facilitation of transmitter release in *Drosophila*. *J. Physiol* 474, 223-232.

Romano-Silva, M.A., Ribeiro-Santos, R., Ribeiro, A.M., Gomez, M.V., Diniz, C.R., Cordeiro, M.N., and Brammer, M.J., 1993. Rat cortical synaptosomes have more than one mechanism for Ca²⁺ entry linked to rapid glutamate release: studies using the Phoneutria nigriventer toxin PhTX2 and potassium depolarization. *Biochem. J.* 296 (Pt 2), 313-319.

Romero, O., Figueroa, S., Vicente, S., Gonzalez, M.P., and Oset-Gasque, M.J., 2003. Molecular mechanisms of glutamate release by bovine chromaffin cells in primary culture. *Neuroscience* 116, 817-829.

Salazar, G., Craige, B., Love, R., Kalman, D., and Faundez, V., 2005. Vglut1 and ZnT3 co-targeting mechanisms regulate vesicular zinc stores in PC12 cells. *J. Cell Sci.* 118, 1911-1921.

Scalettar, B.A., Rosa, P., Taverna, E., Francolini, M., Tsuboi, T., Terakawa, S., Koizumi, S., Roder, J., and Jeromin, A., 2002. Neuronal calcium sensor-1 binds to regulated secretory organelles and functions in basal and stimulated exocytosis in PC12 cells. *J. Cell Sci.* 115, 2399-2412.

Schlecker, C., Boehmerle, W., Jeromin, A., DeGray, B., Varshney, A., Sharma, Y., Szigeti-Buck, K., and Ehrlich, B.E., 2006. Neuronal calcium sensor-1 enhancement of InsP3 receptor activity is inhibited by therapeutic levels of lithium. *J. Clin. Invest* 116, 1668-1674.

Sippy, T., Cruz-Martin, A., Jeromin, A., and Schweizer, F.E., 2003. Acute changes in short-term plasticity at synapses with elevated levels of neuronal calcium sensor-1. *Nat. Neurosci.* 6, 1031-1038.

Skerry, T.M. and Genever, P.G., 2001. Glutamate signalling in non-neuronal tissues. *Trends Pharmacol. Sci.* 22, 174-181.

Stone, J.M., Morrison, P., and Pilowsky, L.S., 2007. Glutamate and dopamine dysregulation in schizophrenia - a synthesis and selective review. *J. Psychopharmacol.*

Taverna, E., Francolini, M., Jeromin, A., Hilfiker, S., Roder, J., and Rosa, P., 2002. Neuronal calcium sensor 1 and phosphatidylinositol 4-OH kinase beta interact in neuronal cells and are translocated to membranes during nucleotide-evoked exocytosis. *J. Cell Sci.* 115, 3909-3922.

Taverna, E., Saba, E., Linetti, A., Longhi, R., Jeromin, A., Righi, M., Clementi, F., and Rosa, P., 2007. Localization of synaptic proteins involved in neurosecretion in different membrane microdomains. *J. Neurochem.* 100, 664-677.

Tsujimoto, T., Jeromin, A., Saitoh, N., Roder, J.C., and Takahashi, T., 2002. Neuronal calcium sensor 1 and activity-dependent facilitation of P/Q-type calcium currents at presynaptic nerve terminals. *Science* 295, 2276-2279.

Weiss, J.L. and Burgoyne, R.D., 2001. Voltage-independent inhibition of P/Q-type Ca²⁺ channels in adrenal chromaffin cells via a neuronal Ca²⁺ sensor-1-dependent pathway involves Src family tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* 276, 44804-44811.

Weisz, O.A., Gibson, G.A., Leung, S.M., Roder, J., and Jeromin, A., 2000. Overexpression of frequenin, a modulator of phosphatidylinositol 4-kinase, inhibits biosynthetic delivery of an apical protein in polarized madin-darby canine kidney cells. *J. Biol. Chem.* 275, 24341-24347.

Zhao, X., Varnai, P., Tuymetova, G., Balla, A., Toth, Z.E., Oker-Blom, C., Roder, J., Jeromin, A., and Balla, T., 2001. Interaction of neuronal calcium sensor-1 (NCS-1) with phosphatidylinositol 4-kinase beta stimulates lipid kinase activity and affects membrane trafficking in COS-7 cells. *J. Biol. Chem.* 276, 40183-40189.

Zheng, Q., Bobich, J.A., Vidugiriene, J., McFadden, S.C., Thomas, F., Roder, J., and Jeromin, A., 2005. Neuronal calcium sensor-1 facilitates neuronal exocytosis through phosphatidylinositol 4-kinase. *J. Neurochem.* 92, 442-451.

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](#)