

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



DANIEL ANDRADE DA CUNHA

**Prolactina potencializa a secreção de insulina via
formação do complexo SNARE em ilhotas
pancreáticas**

Este exemplar corresponde à redação
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Daniel Andrade da Cunha
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia
para obtenção do Título de Doutor em
Biologia Funcional e Molecular, na área
de Fisiologia

A handwritten signature in blue ink that reads "Boschero".

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Boschero

2006

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

C914p Cunha, Daniel Andrade da
Prolactina potencializa a secreção de insulina via
formação do complexo SNARE / Daniel Andrade da Cunha
-- Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientador: Antonio Carlos Boschero.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Ilhotas pancreáticas. 2. Prolactina. 3. Proteínas
SNARE. 4. MAP 2. 5. Kinesina. I. Boschero, Antonio
Carlos. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto
de Biologia. III. Título.

(scs/ib)

Título em inglês: Prolactin modulates the insulin secretion by SNARE complex formation in neonatal rat islets.

Palavras-chave em inglês: Islets of Langerhans; Prolactin; SNARE proteins; MAP 2; Kinesin.

Área de concentração: Fisiologia.

Titulação: Doutor em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Antonio Carlos Boschero, Silvana Auxiliadora Bordin da Silva, Lício Augusto Velloso, Eduardo Milani Rocha, Carla Carvalho.

Data da defesa: 28/09/2006.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

Data da Defesa: 28/09/2006

BANCA EXAMINADORA

Prof.Dr. Antonio Carlos Boschero
(Orientador)



Assinatura

Prof.Dr. Mario José Abdalla Saad



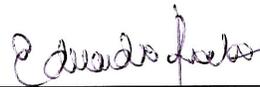
Assinatura

Profa.Dra. Carla Roberta de Oliveira Carvalho



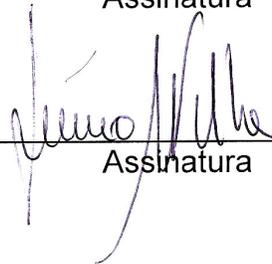
Assinatura

Prof.Dr. Eduardo Melani Rocha



Assinatura

Prof.Dr. Lício Augusto Velloso



Assinatura

Prof.Dr. José Barreto Campello Carvalheira

Assinatura

Profa.Dra. Silvana Auxiliadora Bordin da Silva

Assinatura

Prof.Dr. Ângelo Rafael Carpinelli

Assinatura

Aos meus avós, pais e irmã

A Leticia

Dedico este trabalho

AGRADECIMENTOS

Aos meus avós, pais e irmã pela ajuda incondicional.

A Leticia por mostrar que a vida é bem mais que a ciência.

Ao meu orientador Prof. Dr. Antonio Carlos Boschero pela paciência, incentivo e ajuda profissional.

Ao Prof. Dr. Eduardo Rocha por sempre me ensinar a ser um pesquisador.

À Profa. Dra. Helena Coutinho Franco de Oliveira pelo auxílio em muitos momentos.

Aos meus amigos da grandiosa turma de Biologia 98D.

Aos meus amigos dos imbatíveis times da Biologia.

Aos meus amigos do laboratório.

Ao Léscio pelas constantes ajudas nos procedimentos laboratoriais.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas.....	vii
Lista de Figuras.....	ix
Lista de Tabelas.....	x
Resumo.....	xi
Abstract.....	xii
1 - Introdução.....	1
2 - Objetivos.....	10
3 - Material e Métodos.....	12
4 - Resultados.....	19
5 - Discussão.....	29
7 - Referências Bibliográficas.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA – análise de variância

ATP – trifosfato de adenosina

AIP - Peptídeo inibitório relacionado com a autocamitida 2

Ca²⁺ - cálcio

DDT – ditiotreitól

DEPC – dietil pirocarbonato

DMSO – dimetil sulfoxido

EDTA – ácido etilendiaminotetracético

EPM – erro padrão da média

GH – hormônio do crescimento

GLUT – transportador de glicose

HGF – fator de crescimento de hepatócito

IRS – substrato do receptor de insulina

K⁺ - potássio

kDa – quilodalton

MAP-2 – proteína associada a microtúbulo

MAP-cinase – proteína cinase ativada por mitógenos

MTBD – domínio de ligação a microtúbulo

NSF – fator sensível à N-etilmaleimida

PBS – tampão fosfato salina

PCR – reação em cadeia da polimerase

PI3-quinase – fosfatidilinositol 3-quinase

PKA – proteína quinase A

PKC – proteína quinase C

PLC – fosfolipase C

PMA – phorbol 12-myristate 13-acetate

RIE – radioimunoensaio

SDS – dodecil sulfato de sódio

SNAP-25 – proteína sinaptossomal associada de 25 kDa

SNARE – proteína receptora ao fator sensível à N-etilmaleimida

TBE – tris borato EDTA

VAMP-2 – proteína associada à membrana vesicular isoforma 2

VEGF – fator de crescimento vascular endotelial

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Expressão dos genes cinesina, munc-18, MAP-2 e CaMK2 em ilhotas de ratos neonatos cultivadas por cinco dias na presença ou ausência de 100 ng/ml de prolactina	20
Figura 2 - Expressão das proteínas cinesina, munc-18, MAP-2 e CaMK2 em ilhotas de ratos neonatos cultivadas por cinco dias na presença ou ausência de 100 ng/ml de prolactina	21
Figura 3 – Efeito da incubação aguda (20 min) com 100 ng/ml de prolactina na fosforilação de proteínas envolvidas na exocitose em ilhotas de ratos neonatos	22
Figura 4 - Efeito da incubação aguda (20 min) com 100 ng/ml de prolactina sobre a associação de proteínas envolvidas na exocitose em ilhotas de ratos neonatos.....	23
Figura 5 - Curva tempo-resposta da formação do complexo SNARE em ilhotas de ratos neonatos incubadas com 100 ng/ml de prolactina.....	25
Figura 6 - Efeito de diversos estimuladores das células β sobre a formação do complexo SNARE e secreção de insulina.....	26
Figura 7 - Efeito da inibição das vias PI3 cinase e MAP cinase sobre a formação do complexo SNARE (A), secreção de insulina (B) e fosforilação da syntaxina (C).....	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Seqüência dos <i>primers</i> utilizados na PCR.....	16
---	----

RESUMO

Prolactina induz a maturação da resposta secretória das células β pancreáticas em ilhotas de ratos neonatos *in vitro*. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar se a maturação na resposta a glicose, induzida pela prolactina, está associada a alterações na expressão, associação e fosforilação de proteínas envolvidas na mobilização e extrusão dos grânulos de insulina. Para isso, ilhotas pancreáticas de ratos neonatos foram cultivadas por cinco dias em presença de prolactina e após extração do RNA e proteína total foram realizados RT-PCR e western blot. Observamos aumento na expressão gênica e protéica da MAP-2 e cinesina em ilhotas cultivadas com prolactina. Analisamos também a associação e fosforilação através de imunoprecipitação seguido de western blot de proteínas SNARE e MAP-2/cinesina em ilhotas estimuladas agudamente (20 min) com prolactina. Prolactina aumentou a associação entre proteínas SNARE e MAP-2/cinesina e reduziu a ligação entre sintaxina 1A/munc-18. Fosforilação em resíduos serina das proteínas SNAP-25, sintaxina 1A, munc-18 e MAP-2 encontravam-se aumentadas enquanto que da cinesina foi diminuída, em ilhotas estimuladas com prolactina. Ainda, foi observado aumento na formação do complexo SNARE em ilhotas agudamente estimuladas com prolactina, 22 mM de glicose, 40 de mM K^+ , 200 μ M de carbacol e 1 μ M de PMA (ativador da PKC). A inibição da via da MAP cinase, por PD098059, bloqueou a formação do complexo SNARE e fosforilação da sintaxina induzida por prolactina. Desta forma, podemos concluir que prolactina auxilia na maturação das células β por aumentar a expressão, fosforilação e associação de proteínas que compõem a maquinaria de extrusão dos grânulos de insulina, provavelmente via MAP cinase/PKC.

ABSTRACT

Prolactin induces maturation of insulin secretion in cultured neonatal rat islets. In this study, we investigated whether the improved secretory response to glucose caused by prolactin involves alteration in the expression, association and phosphorylation of several proteins that participate in these processes. Messenger RNA was extracted from neonatal rat islets cultured for five days in the presence of prolactin and reverse transcribed. Gene expression was analyzed by semi-quantitative RT-PCR and by western blotting for proteins. The gene transcription and protein expression of kinesin and MAP-2 were increased in prolactin-treated islets compared to the controls. The association and phosphorylation of proteins was analyzed by immunoprecipitation followed by western blotting, after acute exposure to prolactin. Prolactin increased the association between SNARE proteins and kinesin/MAP-2 while the association of munc-18/syntaxin 1A was decreased. Serine phosphorylation of SNAP-25, syntaxin 1A, munc-18, MAP-2 was significantly higher whereas kinesin phosphorylation was decreased in prolactin-treated islets. There was an increase in SNARE complex formation in islets stimulated with prolactin, 22 mM glucose, 40 mM K⁺, 200 μM carbachol and 1 μM PMA (PKC activator). The prolactin-induced increase in the formation of SNARE complex and syntaxin 1A phosphorylation was inhibited by PD098059, a blocker of the MAPK pathway. These findings indicate that prolactin primes pancreatic β-cells to release insulin by increasing the expression and phosphorylation/association of proteins implicated in the secretory machinery, probably via the MAPK/PKC pathway.

I - INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

A secreção de insulina pelas células β pancreáticas é ajustada continuamente de acordo com as flutuações dos níveis de nutrientes circulantes, em especial, da glicose. A secreção é ainda modulada, direta ou indiretamente, por hormônios, neurotransmissores e agentes farmacológicos. Esse controle multifatorial permite que as células β secretem insulina em quantidade e tempo adequados, regulando perfeitamente os níveis de nutrientes no sangue em diferentes situações fisiológicas, tais como: jejum, refeição, exercício físico, prenhez, lactação, crescimento e velhice. Alterações no mecanismo de produção e secreção de insulina, muitas vezes associadas ao aumento da resistência à ação do hormônio nas células alvo, levam ao aparecimento de hiperglicemia crônica que, dependendo da etiopatologia, é classificada nos diferentes tipos de diabetes mellitus (Boschero, 1996).

Mecanismos gerais da ação da prolactina

Prolactina, a exemplo do hormônio de crescimento e de diferentes citocinas, atua nas células alvo através da interação com receptores específicos pertencentes à superfamília de receptores das citocinas e hematopoietina, que se caracterizam pela homologia de seus domínios extracelulares (Taga e Kishimoto, 1992). Diferentes isoformas dos receptores de prolactina foram clonadas e seqüenciadas e, dependendo do comprimento e composição de aminoácidos do segmento intracelular, os mesmos foram classificados como longos, intermediários e curtos (Goffin e Kelly, 1996). Embora o domínio intracelular das diferentes isoformas dos receptores de prolactina difere quanto ao tamanho e composição de seus aminoácidos, a região extracelular é muito conservada (Goffin et al, 2002). Após ligação da prolactina no seu receptor específico é necessário à ocorrência de dimerização do receptor e a subsequente fosforilação de resíduos

tirosina, localizados na parte citoplasmática do mesmo. A presença de receptores com diferentes domínios intracelulares leva-nos a inferir que a prolactina pode induzir nas células alvo diferentes ações, dependendo do tipo ou tipos de isoformas ali presentes. O primeiro evento intracelular, largamente descrito na literatura, induzido pela prolactina seria a fosforilação da proteína JAK2 (Janus cinase 2). Esta, por sua vez, pode ativar diferentes proteínas intracelulares, especialmente os STATs (*Signal Transducers and Activators of Transcription*). Dentre os STATs merece destaque o STAT5 que, ativado, migra em direção ao núcleo da célula, liga-se a elementos responsivos no DNA estimulando a transcrição de genes específicos (Yamauchi et al, 1998). Contudo, é sabido que as vias intracelulares da sinalização de diferentes hormônios que atuam via receptores do tipo tirosina cinase podem, em níveis diferentes, se cruzarem (*cross talk*). Com o sinal da prolactina não é diferente. Assim, a literatura apresenta inúmeras evidências que a prolactina pode interferir na atividade de diferentes proteínas intracelulares envolvidas na transmissão de diferentes sinais. Entre estas: Fyn, Ras, Raf, Vav, Grb2, Sos, Shc, MAP cinase, IRS1, SHP2, PKC, PI3 cinase, G proteínas, PLC, IRS2/3 (David et al, 1994; Erwin et al, 1995; Too et al, 1989; Berlanga et al, 1997; Yamauchi et al, 1998).

Ações da prolactina nas ilhotas de Langherans

Durante a prenhez, as ilhotas de Langherans dos mamíferos passam por modificações estruturais e funcionais em resposta a uma demanda maior de insulina. Observa-se um aumento da massa total das ilhotas como consequência da hiperplasia (Weinhaus et al, 1996) e redução da apoptose das células β (Parsons et al, 1995). A curva dose resposta à glicose, durante esse período, é deslocada para a esquerda permitindo a secreção de quantidades maiores de insulina

frente a concentrações fisiológicas de glicose, evitando-se a hiperglicemia. Estas adaptações são comandadas por diferentes hormônios, especialmente, pela prolactina e lactogênios placentários.

Muitas das alterações observadas durante a prenhez podem ser reproduzidas *in vitro*, em especial, se forem usadas ilhotas de Langerhans de neonatos, como modelo biológico. Está bem estabelecido que o tratamento prolongado de ilhotas de ratos neonatos *in vitro* com prolactina aumenta a síntese de insulina (Brelje et al, 1993); expressão do transportador de glicose GLUT2 (Mazancourt et al, 1994); atividade da glicocinase IV; metabolismo da glicose (Burch et al, 1981), formação de ATP e aumento da atividade iônica, representada aqui por maior habilidade da glicose em reter K^+ e Ca^{2+} pelas células secretoras de insulina (Crepaldi et al, 1997); aumento da interação das células β nas ilhotas através aumento da expressão da conexina 43 e da β -catenina (Michaels et al, 1987; Collares-Buzato et al, 2001) e, finalmente, secreção de insulina (Sorenson et al, 1993; Crepaldi et al, 1997). Análise multigênica de ilhotas cultivadas com prolactina demonstrou aumento da expressão de diversos genes importantes para a secreção de insulina e proliferação das células β como STAT3, ciclinas e AKT2, bem como redução da expressão de genes ligados à apoptose (Bordin et al, 2004). Além disso, o bloqueio do receptor da prolactina durante a prenhez, reverteu muita destas alterações, incluindo a ativação das vias PI3 cinase e MAP cinase e a secreção de insulina (Amaral et al, 2004).

Quanto ao mecanismo de ação da prolactina nas células secretoras de insulina sabe-se que ela age através da ativação da via JAK/STAT5 (Yamauchi et al, 1998). Como já assinalado anteriormente, foi demonstrado, em várias linhagens de células, que a prolactina é capaz de, através da JAK-2, estimular a fosforilação dos IRSs-1, -2 e -3 e induzir a associação dessas proteínas fosforiladas com a PI3-cinase sugerindo possível participação dessa via de sinalização da prolactina. Experimentos conduzidos em nosso laboratório, observamos que a prolactina pode

estimular as vias de sinalização IRSs/PI3-cinase e SHc/GRAB2/MAP-cinase em ilhotas isoladas de ratos neonatos. Estas observações confirmam a existência de um “cross talk” entre os sinais da prolactina e da insulina favorecendo a manutenção de uma massa e da funcionalidade das ilhotas (células β) em diferentes situações fisiológicas (Amaral et al, 2003). Recentemente, foi sugerida uma via indireta pelo qual prolactina levaria ao aumento da massa de células β . O mecanismo proposto seria: prolactina estimula a produção de VEGF pelas células β , ativando células endoteliais das ilhotas a produzir HGF que induz a proliferação das células β durante a prenhez (Johansson et al, 2006).

Movimentação dos Grânulos de Insulina

A secreção sustentada de insulina é dependente da mobilização dos grânulos estocados no citoplasma das células β . Para tal são necessários, entre outros fatores, a integridade dos microtúbulos (Boyd et al, 1982) e a cinesina (Varadi et al, 2002). A cinesina é um membro da família das proteínas motoras que utilizam energia da quebra do ATP para mover vesículas ao longo de microtúbulos (Brady et al, 1985). A cinesina é um heterotetrâmero de alto peso molecular (400 kDa) formada por duas cadeias pesadas (KHC) e duas leves (KLC) (Yang et al, 1990). Como já mencionado, cinesina exerce função importante na secreção de insulina, pois mutação da KHC ou tratamento com antisense para cinesina, em células β induziram redução significativa na segunda fase da secreção de insulina. Sua atividade é controlada por duas enzimas, a caseína cinase 2 (CK2) que fosforila a KHC inibindo sua atividade e, pela proteína fosfatase 2B β (PP2B β), também conhecida por calcineurina, que desfosforila a KHC promovendo sua ativação (Donelan et al, 2002). Além disso, PP2B β tem sua atividade controlada por Ca^{2+} /calmodulina (Rusnak e Mertz, 2000) e sua inibição por ciclosporina A provoca

diminuição na secreção de insulina estimulada por glicose (Herold et al, 1993). Desta forma, acredita-se que durante a secreção de insulina, a elevação nas concentrações citoplasmáticas de Ca^{2+} induz a ativação da PP2B β que desfosforila a cinesina levando a mobilização dos grânulos estocados no citoplasma para a periferia da membrana plasmática promovendo, assim, a segunda fase da secreção.

A cinase dependente de Ca^{2+} /calmodulina 2 (CaMK2) é considerada uma das principais efetoras das ações mediadas por Ca^{2+} nas células β , pois: 1) sua ativação ocorre em concentrações de Ca^{2+} semelhantes às observadas durante a secreção de insulina (Colca et al, 1983), 2) é ativada por altas concentrações de glicose e carbacol (Wenham et al, 1994 e Babb et al, 1996), 3) se auto-fosforila em presença de altas concentrações de Ca^{2+} aumentando e mantendo sua atividade por período de tempo semelhante à segunda fase de secreção da insulina (Miller e Kennedy, 1986) e, 4) a inibição de sua atividade por fármacos KN-93 ou peptídeos AIP causa redução significativa na secreção de insulina (Bhatt et al, 2000). Além disso, ela é responsável pela fosforilação de diversas proteínas ligadas a movimentação e extrusão dos grânulos de insulina (Greengard et al, 1993; Krueger et al, 1997).

A proteína associada a microtúbulos 2 (MAP-2) é um membro da grande família de proteínas associadas a microtúbulos como a MAP-1 e Tau que possuem um domínio comum, o MTBD, responsável pela ligação destas proteínas aos microtúbulos. Tem por função regular a dinâmica dos microtúbulos, através do controle da polimerização reversível da tubulina (unidade formadora dos microtúbulos) e conferir estabilidade ao mesmo (Sloboda et al, 1976). Além disso, MAP-2 auxilia na ligação de vários componentes aos microtúbulos como, por exemplo, vesículas secretórias derivadas de pâncreas (Suprenant e Dentler, 1982). Ensaios *in vitro*, demonstraram que MAP-2 é fosforilada por diversas enzimas como a PKC (Ainsztein e Purich, 1994), PKA

(Theurkauf e Vallee, 1982), CaMK2 (Yamamoto et al, 1985) e pelo receptor de insulina (Kadowaki et al, 1985) porém, a importância deste processo sobre sua função não está bem estabelecida. Krueger (1997) demonstrou a expressão da MAP-2 em ilhotas pancreáticas de rato e células β TC3 e, neste mesmo estudo, foi visto que células β TC3, incubadas com forskolin ou altas concentrações de Ca^{2+} , apresentaram aumento na fosforilação da MAP-2. Assim, acredita-se que em células β , MAP-2 é fosforilada pela PKA e CaMK2 sendo um importante efetor das ações do cálcio durante a secreção de insula.

Maquinaria de Exocitose

Entre as inúmeras ações da prolactina nas células β pancreáticas, certamente, a extrusão aumentada dos grânulos de insulina é uma das mais importantes para fazer frente à maior demanda de insulina durante a prenhez. O controle da fusão de membranas é essencial para o perfeito funcionamento das células. Este controle apresenta inúmeras características conservadas entre as células eucarióticas dentre as quais; a necessidade de energia e, a participação de várias proteínas. Entre estas se destacam as proteínas de fusão sensíveis à N-etilmaleimida (NSF), as proteínas solúveis ligantes a NSF (SNAP), os receptores de SNAP (SNARE) e, as GTPases da família Rab (Otto et al, 1997; Hay & Scheller, 1997; Ungermann et al, 1998).

A família SNARE é conhecida pela presença de um domínio comum de aproximadamente 60 resíduos de aminoácidos (Sutton et al, 1998). Ela ainda pode ser dividida em duas subfamílias as v-SNARE, composta por proteínas localizadas nas membranas das vesículas de secreção, como Sinaptobrevina (VAMP) e, as t-SNARE situadas na membrana plasmática alvo, sendo as principais, a Sintaxina e a SNAP-25 (proteína sinaptossomal associada de 25 kDa). Foi demonstrado que as proteínas SNARE podem se agrupar formando um complexo heterotrimérico

estável composto por 4 hélices paralelas ligando as vesículas à membrana plasmática (Sollner et al, 1993; Fasshauer et al, 1997; Sutton et al, 1998). Desta forma, acredita-se que o complexo SNARE teria a função de aproximar as membranas gerando a reorganização dos fosfolipídios e conseqüente fusão (Rothman, 1994). Foi confirmada a presença de algumas proteínas SNARE, como a syntaxina 1 e a SNAP-25 em ilhotas (Nagamatsu et al, 1999) e em linhagens de células (β HHC-9) secretoras de insulina (Daniel et al., 1999). Constatou-se que tais proteínas exercem função importante na secreção de insulina (Martin et al, 1995; Sadoul et al, 1995).

As proteínas SM constituem outra família importante que participa do processo de extrusão dos grânulos. A Munc-18 (também chamada de Sec-1) é o membro desta família melhor estudado, e amplamente encontrado em muitas espécies. Esta tem a propriedade de se associar a forma fechada da syntaxina (Dulubova et al, 1999) impedindo sua ligação com outras proteínas e, assim, evitar a formação do complexo SNARE e conseqüentemente a exocitose (Pevsner et al, 1994). Em células cromafins, a fosforilação do complexo syntaxina-Munc18a pela cinase dependente de ciclina 5 (Cdk5) causa a dissociação do mesmo, permitindo a ligação da syntaxina com outras proteínas SNARE, melhorando a resposta secretória (Fletcher et al, 1999). A Munc-18 foi identificada em ilhotas pancreáticas e células produtoras de insulina (Katagiri et al, 1995 e Jacobsson et al, 1994) e, a exemplo de células nervosas, regula a formação do complexo SNARE, através de sua ligação com a syntaxina (Zhang et al, 2000).

Em diversas células neuroendócrinas, o estímulo final para a secreção de seu conteúdo vesicular é o influxo de Ca^{2+} . Evidências, obtidas *in vitro*, em células neuronais tem indicado a participação do Ca^{2+} como estímulo para a formação do complexo SNARE (Neher et al, 1998). Contudo, como não existem receptores para o Ca^{2+} nas proteínas que compõe o complexo SNARE, seria necessária a presença de um sensor de Ca^{2+} para o processamento da reação.

Possíveis sensores de Ca^{2+} tem sido estudados e, entre eles, destaca-se a sinaptotagmina, uma proteína integral de membrana, amplamente distribuída por vários tecidos, incluindo as ilhotas pancreáticas (Gao et al, 2000). Demonstrou-se, em linhagens de células INS-1E e HIT-T15, que a ligação do Ca^{2+} com o domínio C_2 da sinaptotagmina é essencial para a exocitose da insulina (Lang et al, 1997). Sinaptotagmina pode se ligar a syntaxina em presença de alta concentração Ca^{2+} livre (Li et al, 1995). Desta forma, tem sido proposto que a ligação do Ca^{2+} com a sinaptotagmina provocaria sua interação com a syntaxina induzindo e/ou acelerando a formação do complexo SNARE levando, finalmente, a fusão de membrana e conseqüente extrusão das vesículas. Por outro lado, tem sido proposto que o próprio canal de Ca^{2+} poderia exercer a função de sensor para este cátion. Tanto o canal $\text{Ca}_v1.2$ (tipo Lc) quanto o $\text{Ca}_v2.3$ (tipo N) podem se ligar a syntaxina 1A, SNAP-25 e sinaptotagmina (Tobi et al, 1998; Wiser et al, 1999). Assim, a ligação do cálcio ao canal induziria alterações conformacionais no complexo SNARE- $\text{Ca}_v1.2$, promovendo a liberação dos grânulos pré-docados (Wiser et al, 2002).

Pesquisas recentes indicam que proteínas SNARE são alvo de fosforilação por parte de diversas cinases. Em células nervosas, a syntaxina 1A se associa a CaMK2 em altas concentrações de Ca^{2+} facilitando sua interação com a SNAP-25 e a sinaptotagmina 1 (Ohyama et al, 2002). Além disso, syntaxina 1A é fosforilada por diversas enzimas como, CaMK2 (Hirling e Scheller, 1996), CK2 (caseína cinase 2) (Risinger e Bennett, 1999) e, proteína de morte associada cinase (DAPK) (Tian et al, 2003). Uma vez fosforilada, a syntaxina reduz sua capacidade de ligação com a Munc-18, e desta forma permite a formação do complexo SNARE. Em ilhotas de ratos, foi demonstrado que SNAP-25 é fosforilada pela PKC em resposta a PMA, altas concentrações de glicose e carbacol, porém acredita-se que este aumento na fosforilação não está relacionado ao aumento na secreção de insulina (Gonelle-Gispert et al, 2002).

II - OBJETIVOS

2 - OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivo analisar o efeito crônico e agudo da prolactina sobre a expressão e função de elementos envolvidos na movimentação e extrusão dos grânulos de insulina em ilhotas pancreáticas de ratos neonatos.

2.1 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a expressão gênica e protéica da cinesina, MAP-2, CaMK2 e munc-18 em ilhotas de ratos neonatos submetidas à cultura por 5 dias com prolactina.
- Analisar a fosforilação e associação das proteínas syntaxina 1A, SNAP-25, MAP-2, cinesina e munc-18 em ilhotas de ratos neonatos estimuladas com prolactina.
- Analisar a formação do complexo SNARE em ilhotas de neonatos, incubadas agudamente com prolactina, e diversos estimuladores da secreção de insulina.
- Analisar as vias de transdução de sinais da prolactina responsáveis por alterações na fosforilação da syntaxina e formação do complexo SNARE.

III – MATERIAL E MÉTODOS

3 - MATERIAL E METODOS

3.1 - Animais

Foram utilizados ratos Wistar neonatos de ambos os sexos, com até 48 h de vida, provenientes do biotério central da UNICAMP. Os animais recém nascidos foram sacrificados imediatamente para retirada do pâncreas.

3.2 - Cultura de ilhotas pancreáticas de neonatos

Todo o material utilizado para cultura de ilhotas foi submetido a condições especiais de esterilização. Para cada experimento foram utilizados aproximadamente 40-60 neonatos. Após decapitação e assepsia da região abdominal, os animais foram colocados em placas de Petri de vidro e transferidos ao fluxo laminar (VECO, HLFS-12) para a retirada dos pâncreas. Durante a cirurgia todos os pâncreas foram mantidos em solução de Hanks. A seguir, foram reduzidos a fragmentos pequenos, com auxílio de tesouras, e lavados com solução de Hanks. Os fragmentos foram transferidos para um tubo de ensaio de 15 ml. Para facilitar a separação das ilhotas das células acinares, foi realizado um tratamento com colagenase. Após a adição de 0,2 mg da colagenase/pâncreas, o tubo de ensaio foi agitado durante 5 min, em banho-maria a 37°C. Em seguida, o material foi lavado 3 vezes com solução de Hanks, para eliminação da colagenase bem como possíveis contaminações adquiridas durante o procedimento cirúrgico. Cada lavagem foi seguida de centrifugação e descarte do sobrenadante. Uma quarta lavagem foi realizada com meio de cultura. O tecido pancreático, parcialmente digerido, foi transferido para placas de cultura (Falcon 3003 – 100 x 120 mm), contendo 10 ml de meio RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 0,5% de uma mistura dos antibióticos penicilina (100 IU/ml),

streptomicina (100 µg/ml) e 10 mM de glicose. As placas foram mantidas em incubadora (CO-24, New Brunswick Scientific Co., Inc., New Jersey, USA) a 37°C, em atmosfera umidificada a 3% de CO₂ por 5 dias. Quando necessário, adicionou-se ao meio 100 ng/ml de prolactina. Após cultura, as ilhotas pancreáticas foram ressuspensas por aspirações com auxílio de uma pipeta Pasteur e distribuídas em eppendorfs.

3.3 - Secreção estática de insulina

Grupos de 10 ilhotas isoladas de neonatos foram pré-incubados em solução de Krebs-bicarbonato por 45 min a 37 °C e pH 7.4. A seguir, o meio de pré-incubação foi descartado e as ilhotas incubadas por período suplementar de 20 min também em Krebs-bicarbonato o qual continha, quando necessário, 2.8, 8.3 ou 22 mM de glicose, 40 mM de K⁺, 200 µM de carbachol, 1 µM de PMA, 100 nM de wortmannin e 50 nM de PD098059. Após incubação, uma alíquota do sobrenadante foi mantida a -20 °C para dosagem de insulina.

A insulina contida nos meios de incubação (secreção estática) foi avaliada por radioimunoensaio e a curva padrão confeccionada com insulina de rato.

3.4 - Extração do mRNA

RNA total foi extraído de cerca de 300-500 ilhotas por meio de adição de 1 ml de reagente Trizol (GIBCO BRL - Life Technologies). As ilhotas foram homogeneizadas em vortex e incubadas por 5 min à temperatura ambiente. Em seguida, 200 µl de clorofórmio foram adicionados e as amostras vigorosamente homogeneizadas por 15 sec. Após incubação de 3 min, à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 15 min a 4°C. O volume correspondente à fase aquosa foi transferido para outro tubo e o RNA precipitado pela adição de

500 µL de álcool isopropílico, seguido de incubação por 10 min, à temperatura ambiente. Nova centrifugação a 12.000 g por 15 min a 4°C foi realizada, o pellet obtido foi lavado em seguida com 1ml de etanol 75%, centrifugado a 7500 g por 10 min a 4°C e, posteriormente, lavado com 1 ml de etanol 100%. O etanol foi descartado e o pellet parcialmente seco em estufa a 37°C. As amostras foram ressuspensas em 30 µl de água previamente tratada com DEPC.

A integridade do RNA foi verificada em gel de agarose desnaturante para visualização das unidades ribossomais 28S e 18S após coloração com brometo de etídeo, e a quantificação do mesmo foi feita por leituras de absorbâncias a 260 e 280 nm em aparelho Genequant (Pharmacia Biotech).

3.5 - Obtenção de cDNA a partir de RNA total

A reação da transcriptase reversa foi realizada a 42°C durante 50 min, em 20 µl de uma mistura contendo 2 µg de RNA total, 10 mM de dNTP mix, 40 U/µl de inibidor de RNase, 0,1 M de DTT, 5X first-strand buffer, 0,5 µg/ml de oligo dT e 200 U da enzima Super Script II RNase H Reverse Transcriptase (GIBCO BRL – Life Technologies).

3.6 - PCR

O cDNA resultante foi amplificado com os *primers* listados na tabela 1.

Tabela 1. Sequência dos *primers* utilizados na PCR.

Gene	Seqüência (5' - 3')	Temperatura de anelamento	Produto (pb)
Cinesina 1	AGATCTTGCAGCAGCTCGTGAG TTCTCACTGCCGTCCCTGATC	59°C	504
MAP-2	CCATCTCTTCAGCACGACGGAC CTTCAGGTCTGGCAGAGGTTGG	58°C	298
Munc-18	CCCATGAGAGCCATTGTCCC CAATGTCCATAGCGGGCACTC	59°C	410
CaMK2d	ACGAAAGCAAGAGATCATCA CCCACTCGAGTCTTCTG	59°C	331
RPS-29	AGGCAAGATGGGTCACCAGC AGTCGAATCATCCATTCAGGTCG	57°C	202

A PCR foi realizada em 25 µl de uma mistura contendo tampão da Taq polimerase, 50 mM de MgCl₂, 10 mM de cada deoxinucleosídeo trifosfato, 2,5 U/µl de Taq DNA polimerase, 10 pmol de *primer* direto, 10 pmol de *primer* reverso, e cDNA. A PCR foi realizada em termociclador (modelo 9700, Applied Biosystems) iniciando com 94°C por 3 min para desnaturação, seguido de número variável de ciclos de 94°C por 30 s, 30 s de anelamento em temperatura específica e alongação por 45 s a 72°C. O número de ciclos usados foi 28 para RPS-29, 32 para munc-18, 35 para cinesina, 27 para MAP-2 e 28 para CaMK2, determinados após confecção de curva de 18 a 40 ciclos, sendo utilizado o ponto correspondente a EC50 da curva. Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1 % e a intensidade das bandas obtidas foi determinada por densitometria em programa Scion Image (Scion Corporation).

3.7 - Identificação e quantificação protéica por *immunoblotting*.

Ilhotas pancreáticas foram homogeneizadas por sonicação com 6 pulsos de 5 sec com 5 sec de intervalo entre os pulsos (VirSoni 60). Os extratos foram centrifugados a 12.000 g a 4 °C por 15 min para remoção do material insolúvel. As amostras foram tratadas com tampão Laemmli contendo DDT 10 mM, aquecidas em água fervente por 5 min. Alíquotas com concentrações

protéicas semelhantes foram aplicadas no SDS-PAGE (10% Tris acrilamida) em aparelho minigel (Miniprotean) em paralelo com marcadores de pesos moleculares conhecidos. Após corrida, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose. Esta foi incubada por 2 h em solução bloqueadora para diminuir a ligação inespecífica das proteínas. A seguir as membranas foram incubadas com anticorpo policlonal anti-cinesina (Chemicon), anti-munc-18 (Sigma), anti-MAP-2 (Santa Cruz) e anti-CaMK2 (Zymed Laboratories) na diluição 2 µg/ml, por 4 hs. Após, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado com HRP (Zymed) por 2 hs. Após lavagem, as membranas foram incubadas em solução reveladora Super Signal (Pierce) e colocadas junto a filmes radiográficos (Kodak) para auto-radiografia. A intensidade das bandas foi avaliada por densitometria em programa Scion Image (Scion Corporation). Em paralelo, quantidade igual de proteína total foi submetida a eletroforese em gel de poliacrilamida (10%) e corado com Coomassie-blue. Após, foi feita densitometria das bandas correspondentes a 40, 60, 80 e 120 kDa. A média dos valores obtidos foi utilizada para normalizar os resultados do *immunoblotting*. Apenas as bandas correspondentes a 80 kDa são mostradas nas figuras.

3.8 – Ensaio de associação e fosforilação

Alíquotas contendo 300 µg de proteína foram incubadas por 12 h a 4°C com anticorpos anti-SNAP-25 (Sigma), anti-sintaxina 1A (Santa Cruz), anti-cinesina, anti-MAP-2 e anti-munc-18, seguido de encubação com proteína A-Sepharose 6 MB por 2 h a 4°C. Após, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante descartado. O “pellet” contendo as proteínas imunoprecipitadas foi tratado com tampão Laemmli por 5 min a 100°C, submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida (10%) e transferidas para membrana de nitrocelulose. As membranas então, foram incubadas em solução bloqueadora por 8 h a 4°C. Nos ensaios de fosforilação, as

membranas foram incubadas com anticorpo anti-fosfoerina (Santa Cruz) por 4 h a 22°C. Nos ensaios de associação, as membranas foram incubadas com anticorpos anti-MAP-2, anti-munc-18, anti-VAMP-2 (Calbiochem) e anti-SNAP-25 por 4 h a 22°C. Para ambos ensaios, as membranas foram então incubadas com anticorpo secundário conjugado com HRP por 2 h a 22°C. Após lavagem, as membranas foram incubadas em solução reveladora Super Signal (Pierce) e colocadas junto a filmes (Kodak) para auto-radiografia. A intensidade das bandas foi avaliada por densitometria em programa Scion Image (Scion Corporation).

3.9 - Análise Estatística

Para os ensaios de RT-PCR e *immunoblotting* foi utilizado o teste Mann-Whitney. Para os demais ensaios foi utilizado o teste Kruskal-Wallis. As análises foram feitas utilizando-se o programa BioEstat (versão 2.0). Em todos os casos, o nível de significância adotado foi de $p < 0.05$.

IV - RESULTADOS

4 – RESULTADOS

4.1 – Efeito crônico da prolactina sobre a expressão gênica e protéica da MAP-2, munc-18, CaMK2 e cinesina.

A expressão dos genes MAP-2 e cinesina em ilhotas de ratos neonatos cultivadas por 5 dias com prolactina foi significativamente maior (50% e 92%, respectivamente) que em ilhotas controle (fig. 1). Não foram detectadas diferenças na expressão dos genes da CaMK2 ou da munc-18 nas ilhotas cultivadas com prolactina em relação as controles (fig. 1).

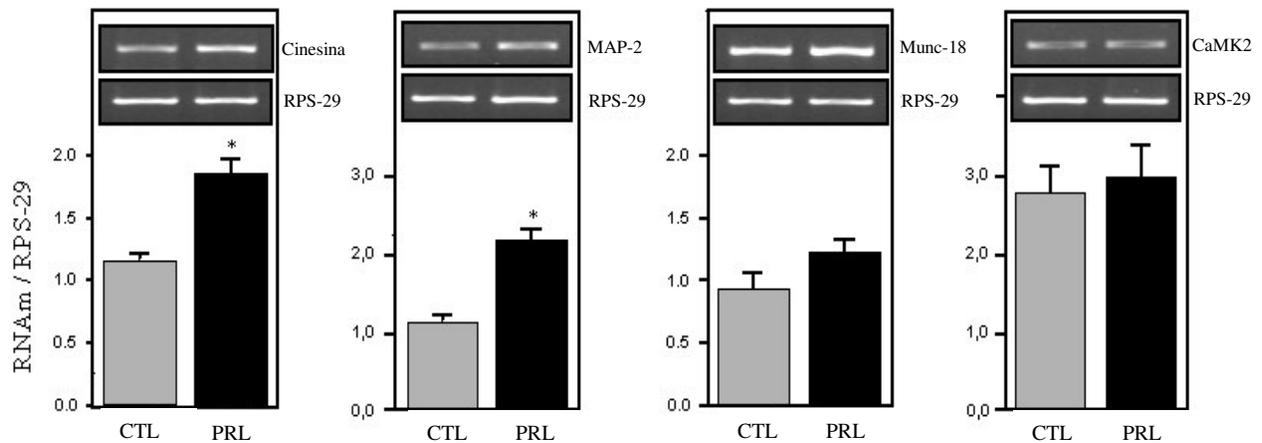


Figura 1. Expressão dos genes cinesina, munc-18, MAP-2 e CaMK2 em ilhotas de ratos neonatos cultivadas por cinco dias na presença ou ausência de 100 ng/ml de prolactina. Os dados são representados pelas médias \pm EPM de quatro experimentos independentes, normalizados pelo controle interno RPS-29. *P < 0.05 para o controle vs. tratado com prolactina.

Semelhantes aos resultados obtidos de expressão gênica, observamos aumento na expressão das proteínas MAP-2 (95%) e cinesina (99%) em ilhotas cronicamente tratadas com prolactina (fig. 2). Nenhuma diferença significativa foi encontrada em relação à expressão das proteínas CaMK2 e munc-18 (fig. 2).

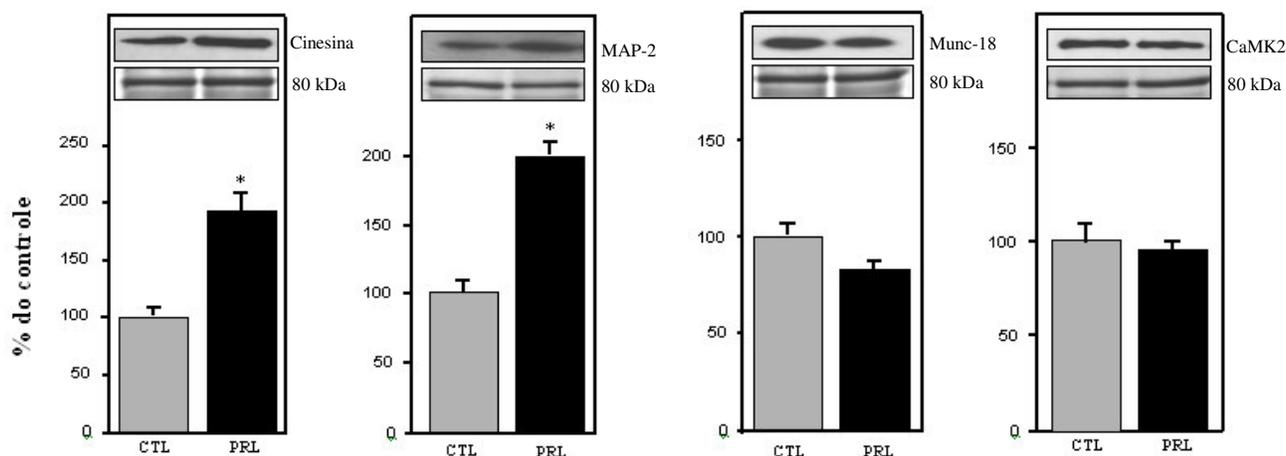


Figura 2. Expressão das proteínas cinesina, munc-18, MAP-2 e CaMK2 em ilhotas de ratos neonatos cultivadas por cinco dias na presença (PRL) ou ausência (CTL) de 100 ng/ml de prolactina. Quantidades iguais de amostras de proteína total foram corridas em gel de poliacrilamida 10%, transferidas para membranas de nitrocelulose e incubadas com anticorpos anti-cinesina, anti-munc-18, anti-MAP-2 e anti-CaMK2. Os dados normalizados (ver Material e Métodos) são médias \pm EPM de quatro experimentos independentes (somente a banda de 80 kDa dos géis corados com Coomassie-blue é mostrada). * $P < 0.05$ para o controle vs. tratado com prolactina.

4.2 – Efeito agudo da prolactina sobre a fosforilação das proteínas SNAP-25, sintaxina 1A, MAP-2, cinesina e munc-18.

Passamos então a analisar o efeito agudo da prolactina sobre a fosforilação de proteínas importantes na movimentação e extrusão dos grânulos de insulina em ilhotas de ratos neonatos.

Incubação das ilhotas por 20 min com prolactina dobrou os níveis de fosforilação em resíduos serina das proteínas SNAP-25, syntaxina e munc-18 (fig. 3). Observamos ainda, aumento de 50% e diminuição de 30% na fosforilação em resíduos serina das proteínas MAP-2 e cinesina, respectivamente, em ilhotas tratadas agudamente com prolactina comparadas as controles (fig.3).

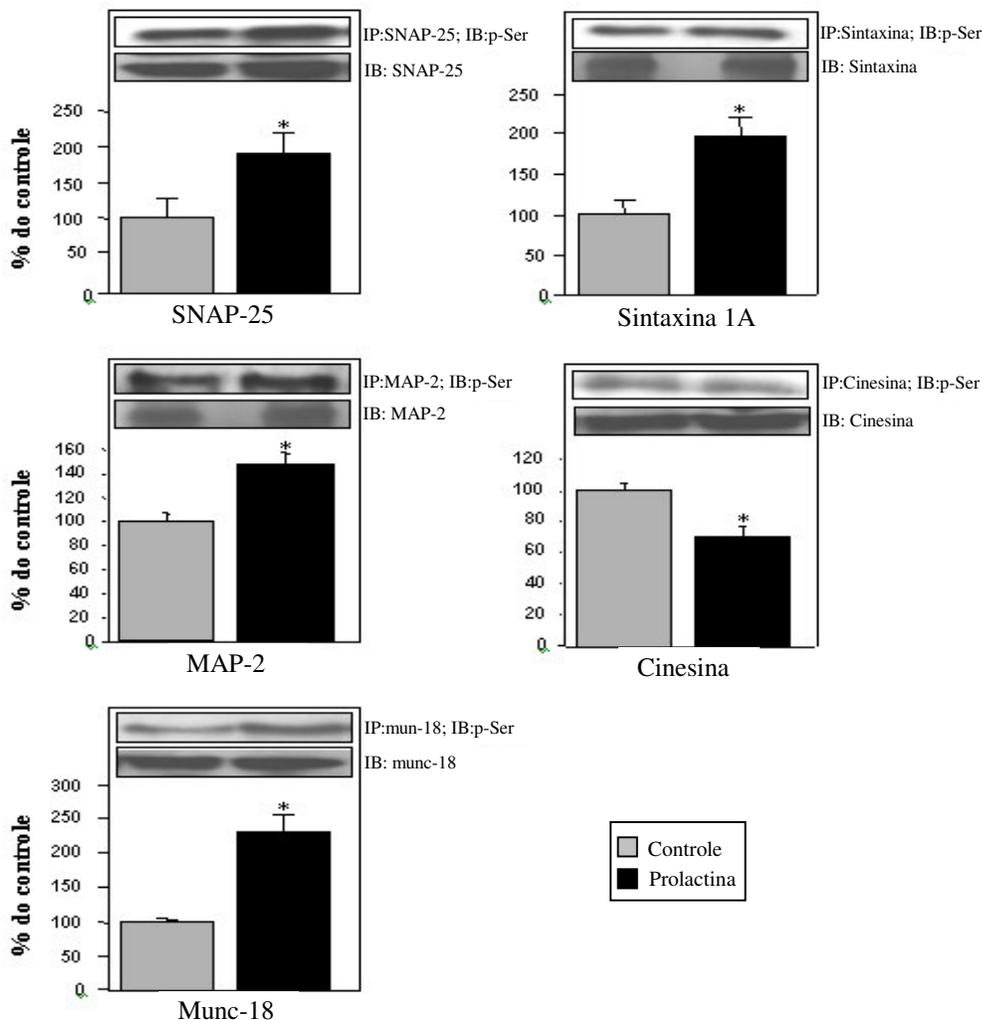


Figura 3. Efeito da incubação aguda (20 min) com (PRL) ou sem (CTL) 100 ng/ml de prolactina na fosforilação de proteínas envolvidas na exocitose em ilhotas de ratos neonatos. Amostras de proteína total foram solubilizadas e imunoprecipitadas (IP) com anticorpos específicos, como indicado. Os imunoprecipitados foram corridos em gel de poli-acrilamida 10%, transferido para membranas de nitrocelulose e incubadas (IB) com anticorpos anti-serina fosforilada (p-Ser). Os dados são médias \pm EPM de três experimentos independentes. *P < 0.05 para o controle vs. tratado com prolactina.

4.3 – Efeito agudo da prolactina sobre a associação das proteínas SNARE, MAP-2, cinesina e munc-18.

Devido à presença do domínio SNARE esta família de proteínas tem a capacidade de se ligar formando dímeros muito estáveis (Sutton, et al. 1998). Desta forma, passamos a investigar se o tratamento agudo com prolactina alteraria a associação entre proteínas SNARE. Ilhotas incubadas por 20 min com prolactina apresentaram aumento significativo na associação entre as proteínas syntaxina e SNAP-25 (83%), bem como syntaxina e VAMP-2 (96%) (fig. 4). Além disso, observamos redução de 88% na ligação da syntaxina com munc-18 e aumento na associação entre as proteínas MAP-2 e cinesina (fig. 4).

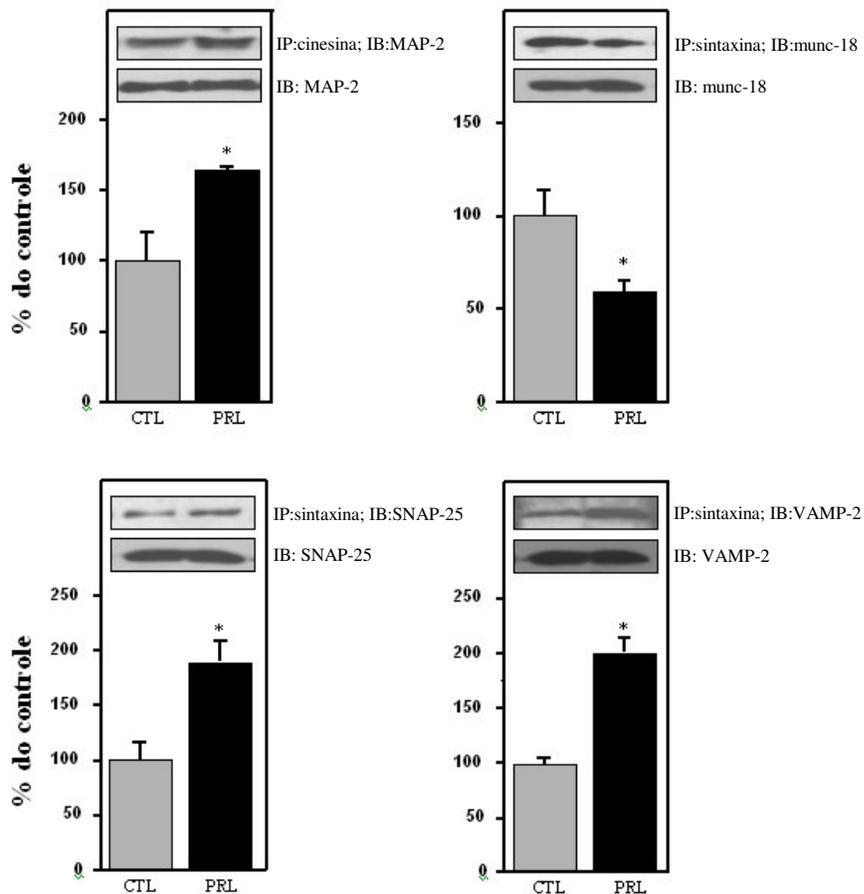


Figura 4. Efeito da incubação aguda (20 min) com (PRL) ou sem (CTL) 100 ng/ml de prolactina sobre a associação de proteínas envolvidas na exocitose em ilhotas de ratos neonatos. Amostras de proteína total foram solubilizadas e imunoprecipitadas (IP) com anticorpos específicos, como

indicado. Os imunoprecipitados foram corridos em gel de poliacrilamida 10%, transferidos para membranas de nitrocelulose e incubados (IB) com anticorpos anti-MAP-2, anti-SNAP-25, anti-munc-18 e anti-VAMP-2. Os dados são médias \pm EPM de três experimentos independentes. *P < 0.05 para o controle vs. tratado com prolactina.

4.4 – Efeito agudo da prolactina, despolarização da membrana plasmática, glicose e estimulação da PKC sobre a formação do complexo SNARE.

O complexo SNARE é formado pela syntaxina, SNAP-25 e VAMP-2 e possui aproximadamente 100 kDa. Este ainda é altamente estável, resistindo a desnaturação por diversos agentes, incluindo SDS. Contudo, o aquecimento do complexo a temperaturas superiores a 95°C é capaz de dissociá-lo (Hayashi et al, 1994). Assim, passamos a estudar a formação do complexo SNARE por “western blot” em amostras de proteína total não aquecidas de ilhotas de neonatos incubadas por 20 min com diversas substâncias conhecidamente estimuladoras das células β .

Inicialmente, estudamos o efeito da prolactina sobre a formação do complexo SNARE em ilhotas de ratos neonatos estimuladas por até 40 min. A figura 5 mostra que não houve alteração na formação do complexo SNARE após 2, 5 e 10 min de exposição a prolactina. Porém, após 20 e 40 min de incubação observou-se aumento de 2.1 e 2.7 vezes, respectivamente, comparado a ilhotas controle (tempo 0). Desta forma, padronizamos o tempo 20 min para os experimentos em que analisamos a formação do complexo SNARE estimulada por prolactina.

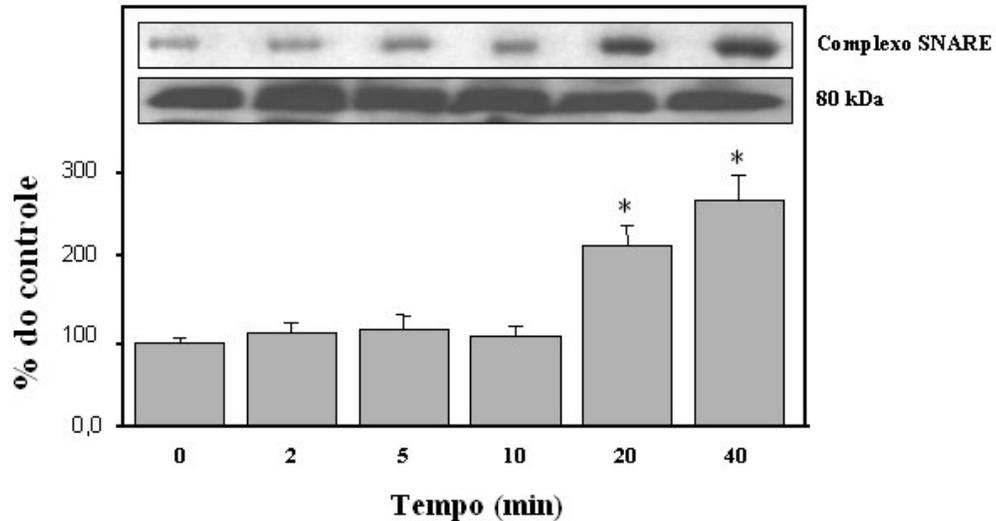


Figura 5. Curva tempo-resposta da formação do complexo SNARE em ilhotas de neonatos incubadas com 100 ng/ml de prolactina. Amostras de proteínas total não aquecidas foram corridas em gel de poliácridamida 10%, transferidas para membranas de nitrocelulose e incubadas com anticorpo anti-sintaxina. Somente a banda de 100 kDa correspondente ao complexo SNARE é mostrada. Os dados normalizados (ver Material e Métodos) são médias \pm EPM de três experimentos independentes (somente a banda de 80 kDa dos géis corados com Coomassie-blue é mostrada). *P < 0.05.

Alta concentração de glicose (22 mM) aumentou a formação do complexo SNARE em 2.5 vezes comparado as ilhotas controle. A incubação concomitante das ilhotas com alta concentração de glicose e prolactina provocou aumento superior (+ 40%) em relação ao observado quando apenas incubadas com 22 mM de glicose (fig. 6A). O aumento na formação do complexo SNARE induzido por 22 mM de glicose e a associação de glicose e prolactina foi acompanhado por elevação semelhante na secreção de insulina (fig. 6D).

A despolarização da membrana plasmática por 40 mM de K^+ aumentou a formação do complexo SNARE em 2.4 vezes comparado a ilhotas controle (5 mM de K^+). Este aumento foi potencializado em 35% pela prolactina (fig. 6B). Ilhotas de ratos neonatos estimuladas com 40 mM de K^+ apresentaram maior secreção de insulina que as controle. Ainda, incubação com apenas prolactina não alterou a secreção de insulina, porém, quando adicionada ao meio contendo

40 mM de K^+ observou-se efeito aditivo sobre a secreção de insulina (fig. 6E). Estes resultados indicam que prolactina age de forma sinérgica a despolarização da membrana plasmática, estimulando a formação do complexo SNARE.

Incubação das ilhotas por 20 min na presença de 200 μ M de carbacol (agonista muscarínico) ou 1 μ M de PMA (ativador específico da PKC) elevou a quantidade do complexo SNARE em 2 e 2.2 vezes, respectivamente, comparado às ilhotas controle (fig. 6C). Este aumento foi acompanhado por acréscimo na secreção de insulina (1.7 e 2.1 vezes, respectivamente) (fig. 6F), indicando que a estimulação parassimpática sobre as células β induz a formação do complexo SNARE via ativação da PKC.

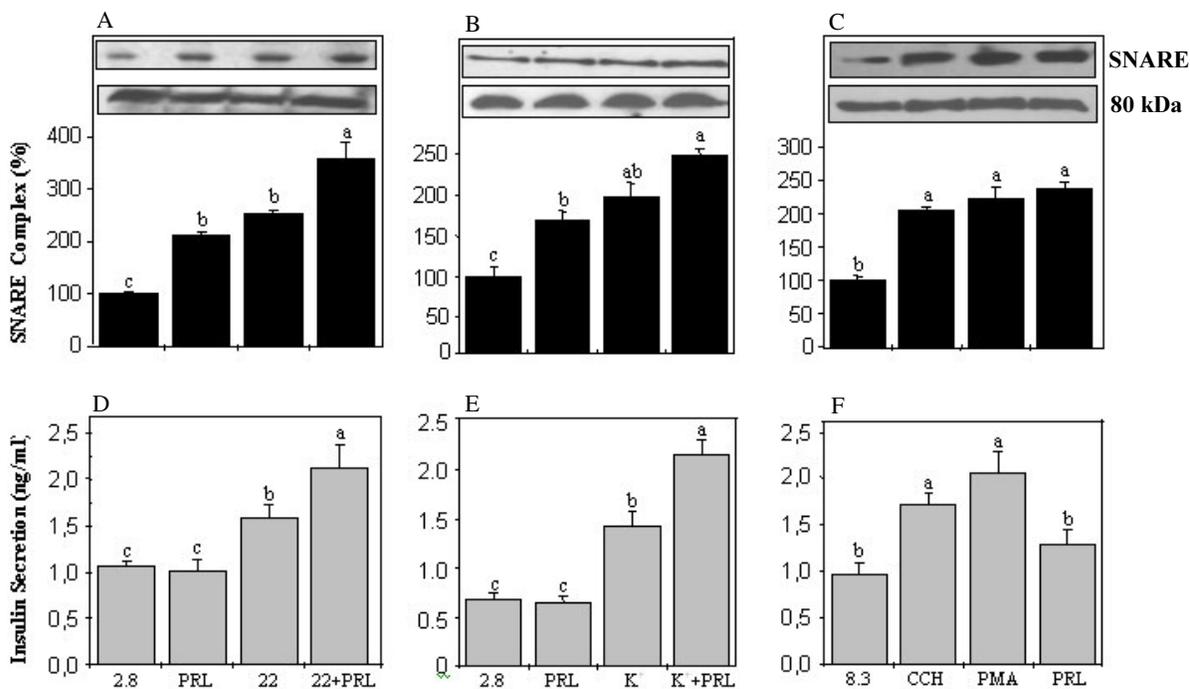
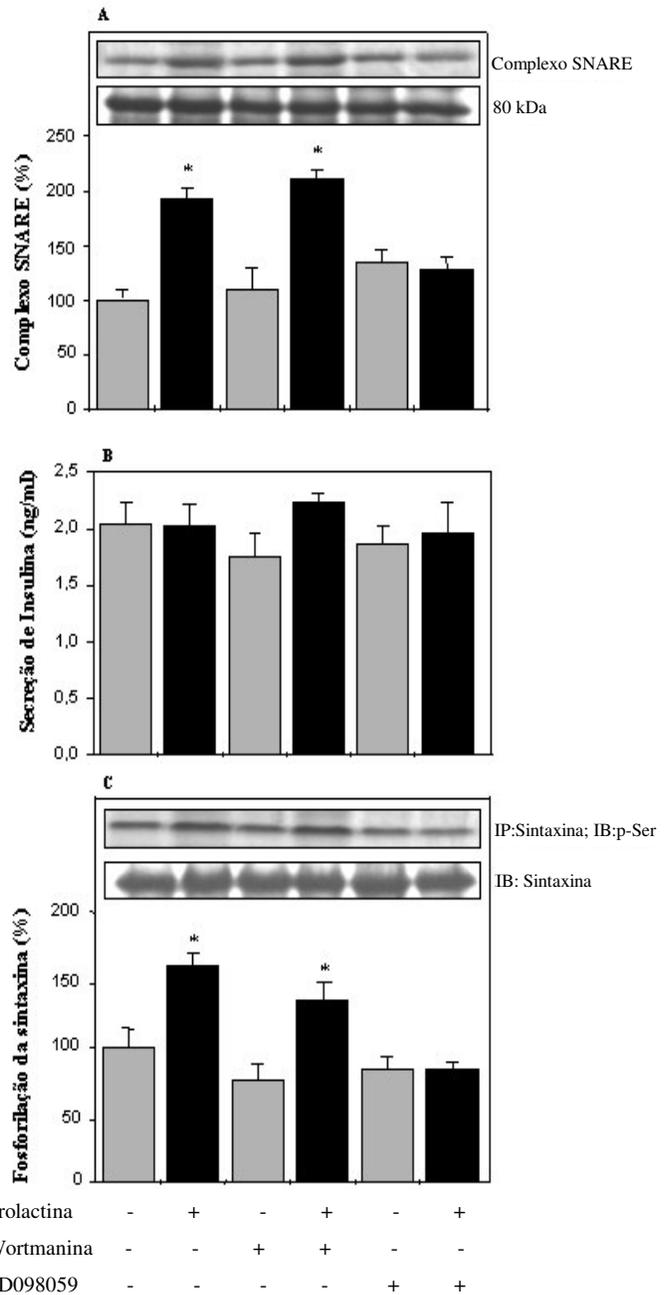


Figura 6. Efeito de diversos estimuladores das células β sobre a formação o complexo SNARE e secreção de insulina. Foram separados grupos de 500 ilhotas para os experimentos de formação do complexo SNARE (letras A, B e C) e 5 ilhotas para os experimentos de secreção de insulina (letras D, E e F). Após pré-incubação em tampão Krebs com 5.6 mM de glicose, as ilhotas foram incubadas por 20 min em meio contendo 2.8 (2.8) e 22 (22) mM de glicose, 100 ng/ml de

prolactina (PRL), 40 mM de potássio (K^+), 200 μ M de carbacol (CCH) e 1 μ M de PMA (PMA) como indicado. Para os experimentos de formação do complexo SNARE, amostras de proteínas total não aquecidas foram corridas em gel de poliacrilamida 10%, transferidas para membranas de nitrocelulose e incubadas com anticorpo anti-sintaxina. Somente a banda de 100 kDa correspondente ao complexo SNARE é mostrada. Os dados normalizados (ver Material e Métodos) são médias \pm EPM de três experimentos independentes (somente a banda de 80 kDa dos géis corados com Coomassie-blue é mostrada). Letras diferentes sobre as barras significam $P < 0.05$.

Finalmente, para elucidar o mecanismo pelo qual a prolactina estimula a formação do complexo SNARE, ilhotas de ratos neonatos foram incubadas por 20 min na presença ou ausência de prolactina, wortmanina (inibidor da via PI3 cinase) e PD098059 (inibidor da via MAP cinase). Incubação com wortmanina ou PD098059 não alterou a formação do complexo SNARE bem como a secreção de insulina ou fosforilação da syntaxina (fig. 7 A, B e C). Ainda, wortmanina falhou em modificar a formação do complexo ou fosforilação da syntaxina induzida por prolactina. Por outro lado, a inibição da via MAP cinase reverteu o efeito da prolactina sobre estes parâmetros (fig. 7 A e C). Estes dados claramente mostram que a prolactina estimula a formação do complexo SNARE e a fosforilação da syntaxina via MAP cinase.

Figura 7. Efeito da inibição das vias PI3 cinase e MAP cinase sobre a formação do complexo SNARE (A), secreção de insulina (B) e fosforilação da syntaxina (C). Ilhotas de ratos neonatos foram incubadas por 20 min na presença ou ausência de 100 ng/ml de prolactina, 100 nM de wortmanina e 50 nM de PD098059 como indicado. Para os experimentos de formação do complexo SNARE, amostras de proteínas total não aquecidas foram corridas em gel de poliacrilamida 10%, transferidas para membranas de nitrocelulose e incubadas com anticorpo anti-syntaxina. Somente a banda de 100 kDa correspondente ao complexo SNARE é mostrada. Os dados normalizados (ver Material e Métodos) são médias \pm EPM de três experimentos independentes (somente a banda de 80 kDa dos géis corados com Coomassie-blue é mostrada). Para os experimentos de fosforilação da syntaxina, amostras de proteína total foram solubilizadas e imunoprecipitadas (IP) com anticorpos específicos. Os imunoprecipitados foram corridos em gel de poliacrilamida 10%, transferidos para membranas de nitrocelulose e incubados com anticorpos anti-serina fosforilada (p-Ser). Os dados são médias \pm EPM de três experimentos independentes. *P < 0.05.



V - DISCUSSÃO

5 – DISCUSSÃO

Neste trabalho foi mostrado que a exposição crônica a prolactina aumenta a expressão das proteínas cinesina e MAP-2 em ilhotas isoladas de ratos. Estas proteínas são responsáveis pela translocação dos grânulos de insulina, processo essencial para a secreção de insulina (Suprenant e Dentler 1982; Varadi et al, 2002). Além disso, trabalhos anteriores mostraram que prolactina aumenta a expressão de diversos componentes importantes para a secreção de insulina como a glicocinase, GLUT2 (Crepaldi et al, 1997) e proteínas SNARE (Cunha et al, 2006). Estes resultados mostram que prolactina é também capaz de modular positivamente a mobilização das vesículas de insulina em ilhotas de ratos neonatos.

O processo de ancoragem (*docking*) e subsequente fusão das vesículas de insulina com a membrana plasmática são um evento complexo envolvendo múltiplas proteínas como algumas da família SNARE, proteínas reguladoras como munc-18 (Jacobsson et al, 1994), sinaptotagminas (Zhang et al, 2000) e/ou o próprio canal de cálcio (Yang et al, 1999). Muitas destas proteínas tem sua função regulada por mecanismos de fosforilação ou associação.

A syntaxina e a SNAP-25 são substratos para diversas proteínas cinases em células secretórias. Em células PC12, SNAP-25 é fosforilada pela PKA, PKC (Hepp et al, 2002) e CaMK2 (Risinger e Bennett 1999). Neste mesmo modelo, syntaxina 1A é substrato para CK2 (Hepp et al, 2002). Contudo, a importância da fosforilação destas proteínas para a formação do complexo SNARE e exocitose ainda não está bem compreendida. Gonelle-Gispert e colaboradores (2002) observaram aumento na fosforilação em resíduos ser¹⁸⁷ da SNAP-25 em resposta a PMA, alta concentração de glicose e carbacol em ilhotas pancreáticas, porém, este aumento não alterou a secreção de insulina. A fosforilação da SNAP-25 pela PKC reduziu sua

associação com a syntaxina em células PC12 (Shimazaki et al, 1996), no entanto, induziu a formação do complexo SNARE em células de hipocampo (Xu et al, 2004) e recrutamento de vesículas em células cromafins (Nagy et al, 2002). Finalmente, a fosforilação da syntaxina pela CK2 aumentou sua ligação com a sinaptotagmina 1, levando a regulação positiva na exocitose de neurotransmissores por células PC12 (Hepp et al, 2002). Apesar da controvérsia encontrada na literatura, nossos resultados indicam que o aumento na fosforilação da syntaxina e SNAP-25, provocado pela prolactina, favoreceu a associação destas proteínas, bem como a associação com a VAMP-2 e conseqüente formação do complexo SNARE.

A exposição aguda à prolactina aumentou a fosforilação da munc-18 e reduziu sua ligação com a syntaxina. Resultados semelhantes foram observados em amostras de neurônios de ratos, em que a fosforilação do dímero syntaxina/munc-18 pela cinase dependente de ciclina 5 resultou na dissociação do complexo (Fletcher et al, 1999). Como descrito, a estimulação de ilhotas pancreáticas com prolactina induziu fosforilação da syntaxina o que causa inibição de sua interação com a munc-18 (Tian et al, 2003). Além disso, a fosforilação em resíduos serina da munc-18 inibe sua ligação com a syntaxina (Fujita et al, 1996). Mais uma vez, nossos resultados mostram que prolactina pode auxiliar na exocitose da insulina por reduzir a associação da munc-18 com a syntaxina, facilitando assim, a formação do complexo SNARE.

Em concentrações não estimulatórias de glicose, as células β possuem níveis de Ca^{2+} reduzidos no meio intracelular o que mantém a cinesina fosforilada pela CK2 e, conseqüentemente, inativa. Altas concentrações de glicose provocam influxo de Ca^{2+} , ativando a proteína fosfatase 2B (PP2B)/calcineurina, levando a desfosforilação da cinesina e maior motilidade das vesículas de insulina (Donelan et al, 2002). A proteína MAP-2 também participa da mobilização dos grânulos de insulina por controlar a polimerização dos microtúbulos (Sloboda et al, 1976) e sua atividade é controlada por fosforilação, pelo menos *in vitro* (Raffaelli et al,

1992). Foram identificadas diversas cinases que utilizam a MAP-2 como substrato, entre elas, PKA (Theurkauf e Vallee 1982), PKC (Ainsztein e Purich 1994), CaMK2 (Yamamoto et al, 1985) e MAP cinase (Quinlan and Halpain 1996). Krueger e colaboradores (1997) demonstraram que a fosforilação da MAP-2, induzida por Ca^{2+} em células β TC3, causa aumento na secreção de insulina. Como mostrado, prolactina induz a fosforilação da MAP-2 e diminui a fosforilação da cinesina levando ao aumento na associação destas proteínas. Podemos então concluir que prolactina regula positivamente a mobilização das vesículas de insulina por modular a atividade da MAP-2 e cinesina.

A incubação das ilhotas com meio contendo 100 ng/ml de prolactina, 22 mM de glicose, 40 mM de K^+ , 200 μ M de carbacol e 1 μ M de PMA aumentou significativamente a formação do complexo SNARE. Todos os agentes testados aumentaram a secreção de insulina com exceção da prolactina. Não existem dados na literatura mostrando efeito agudo da prolactina sobre a liberação da insulina. Apesar de não haver alteração na secreção isoladamente, prolactina potencializou a secreção de insulina estimulada por glicose e potássio. Resultados similares foram encontrados por Frodin e colaboradores (1995). Estes pesquisadores observaram que, a incubação de células INS1 com o fator de crescimento neuronal (NGF) não alterou a secreção de insulina, contudo, quando incubadas com NGF e alta concentração de glicose ocorreu aumento em relação a apenas glicose. Assim, acreditamos que apesar de induzir a formação do complexo SNARE, prolactina agudamente não altera a secreção de insulina devido à falta de outros eventos importantes como, por exemplo, o aumento das concentrações intracelulares de cálcio.

Finalmente, estudamos o mecanismo pelo qual a prolactina induz a fosforilação e a formação do complexo SNARE. Para isso, adicionamos ao meio de incubação wortmanina e PD098059 para o bloqueio das vias da PI3 cinase e MAP cinase, respectivamente. Nenhuma

alteração foi observada na formação o complexo SNARE, secreção de insulina ou fosforilação basal da syntaxina após bloqueio de ambas as vias isoladamente. Por outro lado, o bloqueio da via MAP cinase aboliu o efeito da prolactina em estimular a formação do complexo SNARE e fosforilação da syntaxina, enquanto a inibição da via PI3 cinase não modificou as alterações provocadas pela prolactina sobre esses parâmetros. Existem poucos trabalhos na literatura abordando a via da MAP cinase e proteínas SNARE. Recentemente, foi visto que prolactina ativa a via MAP cinase em ilhotas de ratos neonatos ocorrendo um *crossstalk* com a via de transdução de sinal da insulina (Amaral et al, 2003). Além disso, em células PC12 a ativação da via MAP cinase resulta em aumento na fosforilação da SNAP-25 (Kataoka et al, 2000), bem como ativação da MAP-2 (Nagata et al, 1998) e cinesina (Stariha et al, 1997). Estes dados claramente indicam que a via da MAP cinase está envolvida no efeito da prolactina sobre a função das proteínas SNARE, MAP-2 e cinesina.

Concluindo, exposição crônica a prolactina aumentou a expressão da cinesina e MAP-2 em ilhotas de ratos neonatos. Além disso, prolactina, agudamente, alterou o grau de fosforilação das proteínas syntaxina, SNAP-25, munc-18, cinesina e MAP-2 e ainda aumentou a formação do complexo SNARE, potencializando a secreção de insulina induzida por glicose. Foi demonstrado também que o aumento na formação do complexo SNARE e a fosforilação da syntaxina foram mediados pela via MAP cinase. Estes resultados indicam que prolactina aguda e/ou cronicamente regula a expressão e função de proteínas responsáveis pelas etapas finais da secreção de insulina.

VII – REFERÊNCIAS

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ainsztein AM, Purich DL. (1994). Stimulation of tubulin polymerization by MAP-2. Control by protein kinase C-mediated phosphorylation at specific sites in the microtubule-binding region. **J Biol Chem**. 11;269(45):28465-71.
- Amaral ME, Ueno M, Carneiro EM, Velloso LA, Saad MJ, Boschero AC. (2003). Prolactin-signal transduction in neonatal rat pancreatic islets and interaction with the insulin-signaling pathway. **Horm Metab Res** 35:282-9.
- Amaral ME, Cunha DA, Anhe GF, Ueno M, Carneiro EM, Velloso LA, Bordin S, Boschero AC. (2004). Participation of prolactin receptors and phosphatidylinositol 3-kinase and MAP kinase pathways in the increase in pancreatic islet mass and sensitivity to glucose during pregnancy. **J Endocrinol** 183:469-79.
- Amit T, Dibner C, Barkey RJ. (1997). Characterization of prolactin- and growth hormone-binding proteins in milk and their diversity among species. **Mol Cell Endocrinol** 130:167-80.
- Babb EL, Tarpley J, Landt M, Easom RA. (1996). Muscarinic activation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in pancreatic islets. Temporal dissociation of kinase activation and insulin secretion. **Biochem J**. 1;317 (Pt 1):167-72.
- Berlanga JJ, Gualillo O, Buteau H, Applanat M, Kelly PA, Edery M. (1997). Prolactin activates tyrosyl phosphorylation of insulin receptor substrate 1 and phosphatidylinositol-3-OH kinase. **J Biol Chem** 272:2050-2.
- Bhatt HS, Conner BP, Prasanna G, Yorio T, Easom RA. (2000). Dependence of insulin secretion from permeabilized pancreatic beta-cells on the activation of Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II. **Biochem Pharmacol**. 1;60(11):1655-63.
- Bordin S, Amaral ME, Anhe GF, Delghingaro-Augusto V, Cunha DA, Nicoletti-Carvalho JE, Boschero AC. (2004). Prolactin-modulated gene expression profiles in pancreatic islets from adult female rats. **Mol Cell Endocrinol** 220:41-50.
- Boschero AC. (1996). Acoplamento da estimulação-secreção de insulina pelas células β pancreáticas Arq Bras Endocrinol Metab 40:149-55.

- Boyd AE 3rd, Bolton WE, Brinkley BR. (1982). Microtubules and beta cell function: effect of colchicine on microtubules and insulin secretion in vitro by mouse beta cells. **J Cell Biol.** Feb;92(2):425-34.
- Brady ST. (1985). A novel brain ATPase with properties for the fast axonal transport motor. **Nature** 319:73-75
- Brelje TC, Scharp DW, Lacy PE, Ogren L, Talamantes F, Robertson M, Friesen HG, Sorenson RL. (1993). Effect of homologous placental lactogens, prolactins, and growth hormones on islet B-cell division and insulin secretion in rat, mouse, and human islets: implication for placental lactogen regulation of islet function during pregnancy. **Endocrinology** 132: 879-87.
- Brose N, Petrenko AG, Sudhof, TC and Jahn R. (1992). Synaptotagmin: a calcium sensor on the synaptic vesicle surface. **Science** 256:1021-5.
- Burch PT, MD Trus, DK Berner. (1981). Adaptation of glycolytic enzymes: glucose use and insulin release in rat pancreatic islets during fasting and refeeding. **Diabetes** 30: 923-928.
- Clark JD, Lin LL, Kriz RW, Ramesha CS, Sultzman LA, Lin AY, Milona N, Knopf JL. (1991). A novel arachidonic acid-selective cytosolic PLA2 contains a Ca(2+)-dependent translocation domain with homology to PKC and GAP. **Cell** 65:1043-51.
- Colca JR, Brooks CL, Landt M, McDaniel ML. (1983). Correlation of Ca²⁺-and calmodulin-dependent protein kinase activity with secretion of insulin from islets of Langerhans. **Biochem J.** 15;212(3):819-27.
- Collares-Buzato CB, Leite AR, Boschero AC. (2001). Modulation of gap and adherens junctional proteins in cultured neonatal pancreatic islets. **Pancreas** 23:177-85.
- Crepaldi SC, Carneiro EM, Boschero AC. (1997). Long-term effect of prolactin treatment on glucose-induced insulin secretion in cultured neonatal rat islets. **Horm Metab Res** 29:220-4.
- Cunha DA, Amaral ME, Carvalho CPF, Collares-Buzato CB, Carneiro EM & Boschero AC. (2006). Increased expression of SNARE proteins and synaptotagmin IV in islets from pregnant rats and in vitro prolactin-treated neonatal islets. **Biological Research** 39:555-66.
- Daniel S, Noda M, Straub SG, Sharp GW. (1999). Identification of the docked granule pool responsible for the first phase of glucose-stimulated insulin secretion. **Diabetes** 48:1686-90.

- David M, Petricoin EF 3rd, Igarashi K, Feldman GM, Finbloom DS, Lerner AC. (1994). Prolactin activates the interferon-regulated p91 transcription factor and the Jak2 kinase by tyrosine phosphorylation. **Proc Nat Acad Sci USA** 91:7174-8.
- Donelan MJ, Morfini G, Julyan R, Sommers S, Hays L, Kajio H, Briaud I, Easom RA, Molkentin JD, Brady ST, Rhodes CJ. (2002). Ca²⁺-dependent Dephosphorylation of Kinesin Heavy Chain on β -Granules in Pancreatic β -Cells. **J Biol Chem** 277:24232-42.
- Dulubova I, Sugita S, Hill S, Hosaka M, Fernandez I, Sudhof TC, Rizo J. (1999). A conformational switch in syntaxin during exocytosis: role of munc18. **EMBO J**. 18(16):4372-82.
- Erwin RA, Kirken RA, Malabarba MG, Farrar WL, Rui H. (1995). Prolactin activates Ras via signaling proteins SHC, growth factor receptor bound 2, and son of sevenless. **Endocrinology** 136:3512-8.
- Fasshauer D, Otto H, Eliason WK, Jahn R, Brunger AT. (1997). Structural changes are associated with soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptor complex formation. **J Biol Chem** 272:28036-41.
- Fernandez I, Ubach J, Dulubova I, Zhang X, Südhof TC, Rizo J. (1998). Three-dimensional structure of an evolutionarily conserved N-terminal domain of syntaxin 1A. **Cell** 94:841-9
- Fleenor DE, Freemark M. (2001). Prolactin induction of insulin gene transcription: roles of glucose and signal transducer and activator of transcription 5. **Endocrinology** 142:2805-10.
- Fletcher AI, Shuang R, Giovannucci DR, Zhang L, Bittner MA, Stuenkel EL. (1999). Regulation of exocytosis by cyclin-dependent kinase 5 via phosphorylation of Munc18. **J Biol Chem**. 274(7):4027-35.
- Frodin M, Sekine N, Roche E, Filloux C, Prentki M, Wollheim CB & Van Obberghen E. (1995). Glucose, other secretagogues, and nerve growth factor stimulate mitogen-activated protein kinase in the insulin-secreting beta-cell line, INS-1. **J Biol Chem** 270:7882-89.
- Fujita Y, Sasaki T, Fukui K, Kotani H, Kimura T, Hata Y, Sudhof TC, Scheller RH, Takai Y (1996). Phosphorylation of Munc-18/n-Sec1/rbSec1 by Protein Kinase C. **J. Biol. Chem** 271:7265-8.
- Gao Z, Reavey-Cantwell J, Young RA, Jegier P, Wolf BA. (2000). Synaptotagmin III/VII isoforms mediate Ca²⁺-induced insulin secretion in pancreatic islet β -cells. **J. Biol Chem** 275:36079-85.

- Gao Z, Reavey-Cantwell J, Young RA, Jegier P, Wolf BA. (2000). Synaptotagmin III/VII isoforms mediate Ca²⁺-induced insulin secretion in pancreatic islet beta -cells. **J. Biol Chem** 275(46):36079-85.
- Geppert M, Goda Y, Hammer RE, Li C, Rosahl TW, Stevens CF, Sudhof TC. (1994). Synaptotagmin I: a major Ca²⁺ sensor for transmitter release at a central synapse. **Cell** 79:717-27.
- Goffin V, Kelly PA. (1996). Prolactin and growth hormone receptors. **Clin Endocrinol** 45:247-55.
- Goffin V, Kelly PA. (2002). Growth-promoting actions of prolactin, the hormone of lactation. **J Pediatr Endocrinol Metab** 15:787-8.
- Gonelle-Gispert C, Costa M, Takahashi M, Sadoul K, Halban P. (2002). Phosphorylation of SNAP-25 on serine-187 is induced by secretagogues in insulin-secreting cells, but is not correlated with insulin secretion. **Biochem J.** 368(Pt 1):223-32.
- Greengard P, Valtorta F, Czernik AJ, Benfenati F. (1993). Synaptic vesicle phosphoproteins and regulation of synaptic function. **Science.** 5;259(5096):780-5.
- Hata Y, Slaughter CA, Sudhof TC. (1993). Synaptic vesicle fusion complex contains unc-18 homologue bound to syntaxin. **Nature** 366:347-51.
- Hay JC, Scheller R. (1997). SNAREs and NSF in targeted membrane fusion. **Curr Opin Cell Biol** 9:505-12.
- Hepp R, Cabaniols JP & Roche PA. (2002). Differential phosphorylation of SNAP-25 in vivo by protein kinase C and protein kinase A. **FEBS Letter** 532:52-6.
- Herold KC, Nagamatsu S, Buse JB, Kulsakdinun P, Steiner DF. (1993). Inhibition of glucose-stimulated insulin release from beta TC3 cells and rodent islets by an analog of FK506. **Transplantation.** 55(1):186-92.
- Hirling H, Scheller RH. (1996). Phosphorylation of synaptic vesicle proteins: modulation of the alpha SNAP interaction with the core complex. **Proc Natl Acad Sci USA** 93(21):11945-9.
- Jacobsson G, Bean AJ, Scheller RH, Juntti-Berggren L, Deeney JT, Berggren PO, Meister B. (1994). Identification of synaptic proteins and their isoform mRNAs in compartments of pancreatic endocrine cells. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 91(26):12487-91.
- Ji J, Tsuk S, Salapatek AM, Huang X, Chikvashvili D, Pasyk EA, Kang Y, Sheu L, Tsushima R, Diamant N, Trimble WS, Lotan I, Gaisano HY. (2002). The 25-kDa synaptosome-associated

protein (SNAP-25) binds and inhibits delayed rectifier potassium channels in secretory cells. **J Biol Chem** 277:20195-204.

Johansson M, Mattsson G, Andersson A, Jansson L, Carlsson PO. (2006). Islet endothelial cells and pancreatic beta-cell proliferation: studies in vitro and during pregnancy in adult rats. *Endocrinology* 147:2315-24.

Kadowaki T, Fujita-Yamaguchi Y, Nishida E, Takaku F, Akiyama T, Kathuria S, Akanuma Y, Kasuga M. (1985). Phosphorylation of tubulin and microtubule-associated proteins by the purified insulin receptor kinase. **J Biol Chem.** 260(7):4016-20.

Katagiri H, Terasaki J, Murata T, Ishihara H, Ogihara T, Inukai K, Fukushima Y, Anai M, Kikuchi M, Miyazaki J. (1995). A novel isoform of syntaxin-binding protein homologous to yeast Sec1 expressed ubiquitously in mammalian cells. **J Biol Chem.** 270(10):4963-6.

Kataoka M, Kuwahara R, Iwasaki S, Shoji-Kasai Y & Takahashi M. (2000). Nerve growth factor-induced phosphorylation of SNAP-25 in PC12 cells: a possible involvement in the regulation of SNAP-25 localization. **J Neurochem** 74:2058-66.

Krueger KA, Bhatt H, Landt M, Easom RA. (1997). Calcium-stimulated phosphorylation of MAP-2 in pancreatic betaTC3-cells is mediated by Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II. **J Biol Chem.** 272(43):27464-9.

Lang J, Fukuda M, Zhang H, Mikoshiba K and Wollheim CB. (1997). The first C2 domain of synaptotagmin is required for exocytosis of insulin from pancreatic beta-cells: action of synaptotagmin at low micromolar calcium. **J. EMBO** 16:5837-46.

Li C, Ullrich B, Zhang JZ, Anderson RG, Brose N, Sudhof TC. (1995). Ca²⁺-dependent and -independent activities of neural and non-neural synaptotagmins. **Nature** 375:594-9.

Martin F, Moya F, Gutierrez LM, Reig JA, Soria B. (1995). Role of syntaxin in mouse pancreatic beta cells. **Diabetologia** 38:860-3.

Mazancourt P, Carneiro EM, Atwater I, Boschero AC. (1994). Prolactin treatment increases GLUT2 but not the G protein subunit content in cell membranes from cultured neonatal rat islets. **FEBS Lett** 343:137-40.

Michaels RL, Sorenson RL, Parsons JA, Sheridan JD. (1987). Prolactin enhances cell-to-cell communication among beta-cells in pancreatic islets. **Diabetes** 36:1098-103 .

Miller SG, Kennedy MB. (1986). Regulation of brain type II Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase by autophosphorylation: a Ca²⁺-triggered molecular switch. **Cell.** 28;44(6):861-70.

- Nagamatsu S, Fujiwara T, Nakamachi Y, Watanabe T, Katahira H, Sawa H, Akagawa K. (1996). Expression and functional role of syntaxin 1/HPC-1 in pancreatic beta cells. Syntaxin 1A, but not 1B, plays a negative role in regulatory insulin release pathway. **J Biol Chem** 271:1160-5.
- Nagamatsu S, Nakamichi Y, Ozawa S, Ishida H. (1999). Decreased expression of t-SNARE, syntaxin 1, and SNAP-25 in pancreatic beta-cells is involved in impaired insulin secretion from diabetic GK rat islets: restoration of decreased t-SNARE proteins improves impaired insulin secretion. **Diabetes** 48:2367-73.
- Nagata K, Puls A, Futter C, Aspenstrom P, Schaefer E, Nakata T, Hirokawa N & Hall A. (1998). The MAP kinase kinase kinase MLK2 co-localizes with activated JNK along microtubules and associates with kinesin superfamily motor KIF3. **Embo J** 17:149-58.
- Nagy G, Matti U, Nehring RB, Binz T, Rettig J, Neher E & Sorensen JB. (2002). Protein kinase C-dependent phosphorylation of synaptosome-associated protein of 25 kDa at Ser187 potentiates vesicle recruitment. **J Neurosci** 22:9278-86.
- Neher E. (1998). Vesicle pools and Ca²⁺ microdomains: new tools for understanding their roles in neurotransmitter release. **Neuron** 20:389-99.
- Neher E. (1998). Vesicle pools and Ca²⁺ microdomains: new tools for understanding their roles in neurotransmitter release. **Neuron** 20(3):389-99.
- Niemann H, Blasi J, Jahn R. (1994). Clostridial neurotoxins: new tools for dissecting exocytosis. **Trends Cell Biol** 4:179-85.
- Ohyama A, Hosaka K, Komiya Y, Akagawa K, Yamauchi E, Taniguchi H, Sasagawa N, Kumakura K, Mochida S, Yamauchi T, Igarashi M. (2002). Regulation of exocytosis through Ca²⁺/ATP-dependent binding of autophosphorylated Ca²⁺/calmodulin-activated protein kinase II to syntaxin 1A. **J Neurosci**. 22(9):3342-51.
- Otto H, Hanson PI, Jahn R. (1997). Assembly and disassembly of a ternary complex of synaptobrevin, syntaxin, and SNAP-25 in the membrane of synaptic vesicles. **Proc Natl Acad Sci USA** 94:6197-201.
- Oyler GA, Higgins GA, Hart RA, Battenberg E, Billingsley M, Bloom FE, Wilson MC. (1989). The identification of a novel synaptosomal-associated protein, SNAP-25, differentially expressed by neuronal subpopulations. **J Cell Biol** 109:3039-52.

- Parsons JÁ, TC Brelje, RI Sorenson. (1995). Number and size of islets Langerhans in pregnant, human growth hormone-expressing transgenic, and pituitary dwarf mice: Effect of lactogenic hormones. **Endocrinology** 136:2013-21.
- Pevsner J, Hsu SC, Braun JEA, Calakos N, Ting AE, Bennet ME, Scheller RH. (1994). Specificity and regulation of a synaptic vesicle docking complex. **Neuron** 13:353-61.
- Quinlan EM & Halpain S. (1996). Emergence of activity-dependent, bidirectional control of microtubule-associated protein MAP-2 phosphorylation during postnatal development. **J Neurosci** 16:7627-37.
- Raffaelli N, Yamauchi PS & Purich DL. (1992). Microtubule-associated protein autophosphorylation alters in vitro microtubule dynamic instability. **FEBS Letter** 296:21-4.
- Risinger C, Bennett MK. (1999). Differential phosphorylation of syntaxin and synaptosome-associated protein of 25 kDa (SNAP-25) isoforms. **J Neurochem.** 72(2):614-24.
- Rothman JE. (1994). Mechanisms of intracellular protein transport. **Nature** 372:55-63.
- Rusnak F, Mertz P. (2000). Calcineurin: form and function. **Physiol Rev.** 80(4):1483-521.
- Sadoul K, Lang J, Montecucco C, Weller U, Regazzi R, Catsicas S, Wollheim CB, Halban PA. (1995). SNAP-25 is expressed in islets of Langerhans and is involved in insulin release. **J Cell Biol** 128:1019-28.
- Shimazaki Y, Nishiki T, Omori A, Sekiguchi M, Kamata Y, Kozaki S, Takahashi M (1996). Phosphorylation of 25 kDa Synaptosome-associated Protein. **J Biol Chem** 271:14548-53.
- Sloboda RD, Dentler WL, Rosenbaum JL. (1976). Microtubule-associated proteins and the stimulation of tubulin assembly in vitro. **Biochemistry.** 5;15(20):4497-505.
- Sollner T, Bennett MK, Whiteheart SW, Scheller RH, Rothman JE. (1993). A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. **Cell** 75:409-18.
- Sorenson RL, Brelje TC, Roth C. (1993). Effects of steroid and lactogenic hormones on islets of Langerhans: a new hypothesis for the role of pregnancy steroids in the adaptation of islets to pregnancy. **Endocrinology** 133:2227-34.
- Stariha RL, Kikuchi S, Siow YL, Pelech SL, Kim M & Kim SU. (1997). Role of extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 in oligodendroglial process extension. **J Neurochemistry** 68:945-53.

- Suprenant KA, Dentler WL. (1982). Association between endocrine pancreatic secretory granules and in-vitro-assembled microtubules is dependent upon microtubule-associated proteins. **J Cell Biol.** 93(1):164-74.
- Sutton RB, Fasshauer D, Jahn R, Brunger AT. (1998). Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. **Nature** 395:347-53.
- Taga T, Kishimoto T. (1992). Cytokine receptors and signal transduction. **FASEB J** 6:3387-96.
- Theurkauf WE, Vallee RB. (1982). Molecular characterization of the cAMP-dependent protein kinase bound to microtubule-associated protein 2. **J Biol Chem.** 257(6):3284-90.
- Tian JH, Das S, Sheng ZH. (2003). Ca²⁺-dependent phosphorylation of syntaxin-1A by the death-associated protein (DAP) kinase regulates its interaction with Munc18. **J Biol Chem.** 278(28):26265-74.
- Tobi D, Wiser O, Trus M, Atlas D. (1998). N-type voltage-sensitive calcium channel interacts with syntaxin, synaptotagmin and SNAP-25 in a multiprotein complex. **Receptors Channels** 6:89-98.
- Too CK, Murphy PR, Friesen HG. (1989). G-proteins modulate prolactin- and interleukin-2-stimulated mitogenesis in rat Nb2 lymphoma cells. **Endocrinology** 124:2185-92.
- Trimble WS, Cowan DM, Scheller RH. (1988). VAMP-1: a synaptic vesicle-associated integral membrane protein. **Proc Natl Acad Sci USA** 85:4538-42.
- Ungermann C, Nichols BJ, Pelham HR, Wickner W. (1998). A vacuolar v-t-SNARE complex, the predominant form in vivo and on isolated vacuoles, is disassembled and activated for docking and fusion. **J Cell Biol** 140:61-9.
- Varadi A, Ainscow EK, Allan VJ, Rutter GA. Involvement of conventional kinesin in glucose-stimulated secretory granule movements and exocytosis in clonal pancreatic beta-cells. **J Cell Sci.** 2002 Nov 1;115(Pt 21):4177-89.
- Weinhaus AJ, Stout LE, Sorenson RI. (1996). Glucokinase, hexokinase, glucose transporter 2, and glucose metabolism in islets during pregnancy and prolactin-treated islets in vitro: mechanisms for long term up-regulation of islets. **Endocrinology** 137:1640-9.
- Wenham RM, Landt M, Easom RA. (1994). Glucose activates the multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in isolated rat pancreatic islets. **J Biol Chem.** 18;269(7):4947-52.

- Wheeler MB, Sheu L, Ghai M, Bouquillon A, Grondin G, Weller U, Beaudoin AR, Bennett MK, Trimble WS, Gaisano HY. (1996). Characterization of SNARE protein expression in beta cell lines and pancreatic islets. **Endocrinology** 137:1340-8.
- Wiser O, Cohen R., Atlas D. (2002). Ionic dependence of Ca²⁺ channel modulation by syntaxin 1A. **Proc Natl Acad Sci USA** 99:3968-73
- Wiser O, Trus M, Hernandez A, Renstrom E, Barg S, Rorsman P, Atlas D. (1999). The voltage sensitive Lc-type Ca²⁺ channel is functionally coupled to the exocytotic machinery. **Proc Natl Acad Sci USA** 96:248-53.
- Wollheim C, Sharp WG. (1981). Regulation of insulin release by calcium. **Physiol Rev** 61:914-73
- Xu NJ, Yu YX, Zhu JM, Liu H, Shen L, Zeng R, Zhang X & Pei G. (2004). Inhibition of SNAP-25 phosphorylation at Ser187 is involved in chronic morphine-induced down-regulation of SNARE complex formation. **J Biol Chem** 279:40601-8.
- Yamamoto H, Fukunaga K, Goto S, Tanaka E, Miyamoto E. (1985). Ca²⁺, calmodulin-dependent regulation of microtubule formation via phosphorylation of microtubule-associated protein 2, tau factor, and tubulin, and comparison with the cyclic AMP-dependent phosphorylation. **J Neurochem.** 44(3):759-68.
- Yamauchi T, Kaburagi Y, Ueki K, Tsuji Y, Stark GR, Kerr IM, Tsushima T, Akanuma Y, Komuro I, Tobe K, Yazaki Y, Kadowaki T. (1998). Growth hormone and prolactin stimulate tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate-1, -2, and -3, their association with p85 phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase), and concomitantly PI3-kinase activation via JAK2 kinase. **J Biol Chem** 273:15719-26.
- Yang, J. T., Saxton, W. M., Stewart, R. J., Raff, E. C. and Goldstein, L. S. (1990). Evidence that the head of kinesin is sufficient for force generation and motility in vitro. *Science* 249, 42-47.
- Zhang W, Efanov A, Yang SN, Fried G, Kolare S, Brown H, Zaitsev S, Berggren PO, Meister B. (2000). Munc-18 associates with syntaxin and serves as a negative regulator of exocytosis in the pancreatic beta -cell. **J Biol Chem.** 275(52):41521-7.