

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



SANDRA MARA FERREIRA

**“ARHGAP21 INIBE A SECREÇÃO DE INSULINA
ESTIMULADA POR GLICOSE ATRAVÉS DA MODULAÇÃO DA
FAK, CDC42 E PKC ζ ”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)

Sandra Mara Ferreira

Boschiero

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Mestre em Biologia Molecular e
Funcional, na área de Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Boschiero

Co-orientador: Prof. Dr. Everardo Magalhães Carneiro

Campinas, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

F413a Ferreira, Sandra Mara
ARHGAP21 inibe a secreção de insulina estimulada por
glicose através da modulação da FAK, Cdc42 e PKC ζ /
Sandra Mara Ferreira. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Antonio Carlos Boschero.
Co-orientador: Everardo Magalhães Carneiro.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Gene ARHGAP21. 2. Glicose. 3. Insulina -
Secreção. 4. Proteínas citoesqueleto. 5. Actina. I.
Boschero, Antonio Carlos, 1943-. II. Carneiro, Everardo
Magalhães, 1955-. III. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Título em inglês: ARHGAP21 inhibits glucose-stimulated insulin secretion through FAK, Cdc42 and PKC ζ .

Palavras-chave em inglês: ARHGAP21 gene; Glucose; Insulin – Secretion; Cytoskeletal proteins; Actin.

Área de concentração: Fisiologia.

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Antonio Carlos Boschero, Silvana Auxiliadora Bordin da Silva, Cláudio Chrysostomo Werneck.

Data da defesa: 29/06/2011.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

Campinas, 29 de junho de 2011

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Antonio Carlos Boschiero (Orientador)



Assinatura

Profa. Dra. Silvana Auxiliadora Bordin da Silva



Assinatura

Prof. Dr. Cláudio Chrysostomo Werneck



Assinatura

Dra. Fernanda Ortis

Assinatura

Prof. Dr. Leonardo dos Reis Silveira

Assinatura

**“Tempos difíceis tem um valor científico.
São as oportunidades que um bom aprendiz jamais perde.”**

Ralph Wald Emerson

Às pessoas mais importantes da minha vida:

Meus pais: Selma e Eliu

Meus irmãos: Elaneomar, Eliezer, Selma e Simeia

Minhas sobrinhas: Leticia, Daiany e Gabriely.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Boschero pela oportunidade de desenvolver este trabalho, pela confiança depositada em mim e pelo exemplo profissional e pessoal.

À Helena Barbosa pela colaboração na elaboração do projeto, na realização dos experimentos e análise dos resultados.

Ao Luiz Rezende pela colaboração na realização dos experimentos, análise dos resultados e pela paciência em responder todas as minhas perguntas.

Aos professores Everardo e Helena pelas discussões e apoio na realização deste trabalho.

À Professora Sara Saad e à Carolina Bigarella pela disponibilidade de reagentes e pela colaboração na realização de alguns experimentos e análise de resultados.

À Marise pela colaboração nos serviços burocráticos e pela amizade.

Aos amigos Gustavo e Fernanda pelas discussões dos resultados, auxílio na escrita desta dissertação e pela companhia nos muitos cafezinhos.

Aos amigos do Laboratório de Pâncreas Endócrino e Metabolismo: Leli, Jane, Flávia, Thais, André, Tarlizza, Júnia, Ana Paula, Jean, Thiago, Rafael, Priscilla, Camila, Daniela, Rosane, Cláudio, José Maria, Nicoli, Gabriel, Helena, Larissa e Juliana pelos momentos compartilhados e pelos auxílios no laboratório.

Aos membros da banca de qualificação: Profa. Carmem Veríssima Ferreira, Profa. Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes e Profa. Camila Aparecida Machado de Oliveira pelas correções deste trabalho e sugestões de experimentos futuros.

Aos Professores Márcia, Nilton, Tânia e Elza, meus orientadores de iniciação científica, por trilhar os meus primeiros passos no caminho científico.

À Elizete e Valéria por me ensinar as primeiras técnicas de laboratório, por sempre me incentivarem e pela amizade.

Aos amigos da turma de graduação em especial à Aline e Érica pela amizade, pelos momentos de estudos e descontrações.

Aos meus pais e irmãos por sempre respeitarem e apoiarem minhas decisões.

Aos meus tios Sandra e Nivaldo e primos Michelly, Priscila e Robério por me acolherem e pela convivência.

Aos primos e amigos Gleise, Glauci, Suzana, Salety, Aline, Márcia, Marlon, Édrey, Etienne e Leydian pelos grandes momentos que passamos juntos.

À Giselle, Jaqueline e Graziela pela amizade de longa data.

À todas as pessoas que, por ventura, aqui não se encontram citadas e que de alguma forma tenham feito parte da minha vida e colaborado para o meu desenvolvimento pessoal e profissional.

À Fapesp pelo apoio financeiro

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xii
RESUMO.....	15
ABSTRACT.....	17
INTRODUÇÃO.....	18
Secreção de insulina.....	19
Citoesqueleto de actina.....	19
ARHGAP21.....	20
ARHGAP21 e a célula beta pancreática.....	21
OBJETIVOS.....	23
MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
Reagentes.....	26
Cultura de célula.....	26
Animais.....	27
Imunofluorescência e microscopia confocal.....	27
Tratamento com glicose e insulina.....	27
Ensaio de fosforilação e imunoprecipitação.....	28
Western blot.....	28
Inibição da ARHGAP21 com anti-sense.....	29
Secreção de insulina.....	30
Análise estatística.....	30
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
Expressão e localização da ARHGAP21 em MIN6.....	32
Efeito da glicose e da insulina na expressão da ARHGAP21, FAK, PKC ζ e Cdc42.....	33
Efeito da glicose sobre as interações ARHGAP21/FAK e ARHGAP21/PKC ζ e fosforilação da FAK e PKC ζ	34
Efeito da ARHGAP21 sobre a expressão da FAK, PKC ζ e Cdc42.....	39
Papel da ARHGAP21 na secreção de insulina.....	40
CONCLUSÃO.....	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS

ARHGAP21 – Proteína ativadora de Rho-GTPase

AS – antisense Anti-ARHGAP21

ATP – Adenosina trifosfato

ADP – Adenosina difosfato

BSA – Albumina

Ca - Cálcio

Caco-2 – Linhagem celular de carcinoma de cólon humana

CAS – Substrato associado à proteína Crk

Cdc42 – Ciclo de divisão celular 42

Crk – proteínas adaptadoras que liga proteínas fosforiladas em tirosina

CTL - Controle

DTT - Ditioneitol

ECM – Matriz extracelular

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

EGFr – Receptor de fator de crescimento epidermal

F-actina – actina polimérica

FAK – Quinase de Adesão Focal

G-actina – Actina monomérica

GAP – Proteína ativadora de GTPases

GAPDH - Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

GDI - Fatores inibitórios de dissociação de GDP

GDP – Guanosina difosfato

GEF - Fatores de troca de nucleotídeos de guanina

GLUT2 – Transportador de glicose 2

GTP – Guanosina trifosfato

GTPases – Enzimas que hidrolisam GTP

IgG – Imunoglobulina G

INS - Insulina

JNK – Jun quinase

K - Potássio

KCl – Cloreto de Potássio
KH₂PO₄ - Hidrogenofosfato de Potássio
MAPK – Quinase ativada por mitógeno
NaCl – Cloreto de sódio
NFκB – Fator nuclear kappa B
p130^{CAS} – Substrato tirosino-quinase associado a CrK
PBS – Tampão fosfato-salino
PDGFr - receptor do fator de crescimento derivado das plaquetas
PDZ - PSD-95/Discs-large/ZO-1
p-FAK^{tyr397} – Quinase de adesão focal fosforilada em tirosina 397
p-FAK^{tyr925} - Quinase de adesão focal fosforilada em tirosina 925
PH – domínio de homologia da plequistrina
PI3K - fosfoinositídeo 3-quinase
PKCζ – Proteína quinase C isotipo zeta
PMSF – Fluoreto de fenilmetilsulfonil
p-PKC^{thr410} – Proteína quinase C isotipo Zeta fosforilada em treonina 410
Rac – Substrato C3 da toxina botulínica relacionada à Ras 1
Rho- Gene homólogo da proteína Ras
Rho-GAP – Proteínas ativadoras de proteínas GTPases Rho
Rho-GTPases – Gene homólogo da proteína Ras que hidrolisam GTP
SFB – Soro fetal Bovino
SH₂ – Domínio homólogo a Src 2
SH₃ - Domínio homólogo a Src 3
SNAP-25 – Proteína associada à sinaptossomal 25
TA - Temperatura ambiente
TBST - Solução tampão salina Tris e Tween-20
Thr - treonina
TRITC - Isotiocianato tetrametilrodamina
t-SNARE – receptor solúvel de ligação NSF alvo
Tyr - Tirosina
VAMP2 – Proteína associada a membrana de vesícula 2
v-SNARE – receptor solúvel de ligação NSF associado à membrana de vesícula

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Esquema da estrutura primária da proteína ARHGAP21 e seus domínios.** A ARHGAP21 apresenta 1957 aminoácidos e os domínios PDZ, PH e Rho-GAP.....20
- Figura 2. Interações protéicas de ARHGAP21.** Em cardiomiócitos a ARHGAP21 se associa à PKC ζ fosforilada que está envolvida na modulação de via de proliferação celular (A). Em glioblastoma a ARHGAP21 interage e inibe a FAK e Cdc42 que promove o rearranjo do citoesqueleto de actina (B).....22
- Figura 3. Localização citoplasmática da ARHGAP21.** (A) ARHGAP21, (B) filamento de actina, (C) Núcleo (DAPI) e (D) sobreposição das imagens A, B e C. As setas indicam co-localização da ARHGAP21 com o filamento de actina. Imagens capturadas por escaneamento a laser LSM-510 (Zeiss) montado sobre um microscópio Axioplan (Zeiss).....32
- Figura 4. Expressão protéica de ARHGAP21, FAK, PKC ζ e Cdc42.** Expressão protéica de ARHGAP21, FAK, PKC ζ e Cdc42 de células MIN6 tratadas por três dias com 5,6 ou 22mM de glicose e de MIN6 cultivadas na ausência (CTL) ou presença de insulina (INS) (0,2U/ml) durante três dias. (A) e (B) Imagens representativas dos Westerns blot para as proteínas ARHGAP21, FAK, PKC ζ , Cdc42 e GAPDH. (C-F) Quantificação da expressão protéica de ARHGAP21, FAK, PKC ζ e Cdc42 de células MIN6 cultivadas em 5,6 ou 22 mM de glicose. (D-J) Quantificação da expressão protéica de ARHGAP21, FAK, PKC ζ e Cdc42 em células MIN6 cultivadas na ausência ou presença de insulina (0,2U/ml). Resultados apresentados em % dos obtidos em 5,6 ou CTL. *p<0,005 vs 5,6 ou CTL. A figura representa 3 experimentos independentes.....36
- Figura 5. Ensaio de imunoprecipitação e fosforilação.** Análise da associação de ARHGAP21/FAK e ARHGAP21/PKC ζ e expressão protéica de FAK^{Tyr 397}, FAK^{Tyr 925}, PKC ζ ^{thr410} e ARHGAP21 de células MIN6 tratadas com 22 mM de glicose em 0,

5, 15 e 30 min. (A) Imagens representativas da associação de ARHGAP21/FAK e expressão protéica de FAK total, FAK^{Tyr 397}, FAK^{Tyr 925}, (B) Imagens representativas da associação ARHGAP21/ PKCζ e de expressão protéica de PKCζ total, PKCζ^{thr410} e ARHGAP21. (C) Níveis de associação entre ARHGAP21 e FAK (D) FAK^{Tyr 397} (FAK^{Tyr 397}/FAK). (E) FAK^{Tyr 925} (FAK^{Tyr 925}/FAK). (F) Níveis de associação entre ARHGAP21 e PKCζ. (G) PKCζ^{thr410} (PKCζ^{thr410}/ PKCζ). (H) ARHGAP21. Resultados apresentados em % em relação aos obtidos no tempo 0, *p<0,05 vs tempo 0. A figura representa 3 experimentos independentes.....37

Figura 6. Esquema da estrutura primária da proteína FAK. Evidenciados o domínio FERM na região N-terminal, um domínio quinase central, o domínio FAT na região C-terminal e os resíduos de tirosina (Tyr) que quando fosforilados resultam em ativação da proteína.....38

Figura 7. Esquema da via de ativação de FAK. A fosforilação de FAK ocorre quando as subunidades de integrinas se dimerizam devido à sinalização da matriz extracelular (ECM), uma vez fosforilada a FAK recruta e fosforila a proteína Src. A proteína p130^{CAS} se associa à FAK ativa e é fosforilada por Src e ativa proteínas da família Rho-GTPase resultando em modificações do citoesqueleto de actina.....38

Figura 8. Esquema da via de ativação de PKCζ. A PKCζ é fosforilada em Thr 410 via PI3K e, uma vez fosforilada, a PKCζ ativa a cascata de MAPK o que leva a proliferação celular.....39

Figura 9. Expressão proteica de ARHGAP21, FAK, PKCζ e Cdc42. Expressão protéica de ARHGAP21, FAK, PKCζ e Cdc42 de ilhotas de camundongos Swiss neonato tratados com antisense 1nM de anti-ARHGAP21. (A) Imagens representativas da expressão protéica de ARHGAP21, FAK, PKCζ, Cdc42 e GAPDH. (B) Quantificação da expressão protéica de ARHGAP21. (C) FAK. (D) PKCζ. (E) Cdc42, resultados apresentados em relação aos obtidos no tempo 0, *p<0,05 vs controle. A figura representa n=4.....41

Figura 10. Secreção de insulina. Secreção de insulina estimulada com 2,8 ou 16,7 mM de glicose de ilhotas de camundongos Swiss neonatos com ARHGAP21 inibida, *p<0,005; n=8.....42

Figura 11. Modulação da ARHGAP21 pela glicose. Na ausência de glicose a ARHGAP21 está associada à FAK inibindo sua ativação e conseqüentemente a secreção de insulina. Na presença de glicose a ARHGAP21 se dissocia da FAK e associa à PKC ζ , assim a FAK se autofosforila e ativa vias que favorecem a secreção de insulina.....42

RESUMO

Introdução e objetivos: A ARHGAP21 é uma Rho-GAP que promove a ativação de um fator intrínseco da Rho-GTPase Cdc42 responsável pela hidrólise de GTP à GDP e inativação da atividade da proteína. ARHGAP21 se associa à PKC ζ em cardiomiócitos e à porção C-terminal da FAK em glioblastomas, onde inibe a ativação de Rho-GTPases, e, com isso, o rearranjo do citoesqueleto de actina. A Cdc42, FAK e PKC ζ estão envolvidas na secreção de insulina estimulada por glicose, diferenciação e proliferação de ilhotas pancreáticas. O objetivo deste trabalho foi investigar em células beta pancreáticas: 1) a expressão e localização da ARHGAP21; 2) o efeito da glicose na expressão das proteínas PKC ζ , FAK e Cdc42 e sua associação à ARHGAP21 e; 3) a função da ARHGAP21 no controle da secreção de insulina estimulada por glicose. **Materiais e Métodos:** A expressão e localização da ARHGAP21 em células MIN6 foram avaliadas por imunofluorescência. Células MIN6 foram tratadas na presença de 5,6 ou 22 mM de glicose ou, na ausência ou presença de insulina (0,2 U/ml) por 3 dias. Após a extração protéica a expressão das proteínas ARHGAP21, PKC ζ , FAK e Cdc42 foi avaliada por Western blot. Células MIN6 foram incubadas em solução contendo 22 mM de glicose e coletadas em diferentes tempos (0, 5, 15, e 30 min) para avaliação da interação ARHGAP21/FAK e ARHGAP21/PKC ζ por imunoprecipitação e, para análise do grau de fosforilação tirosina 397 e 925 da FAK e em treonina 410 da PKC ζ . A expressão dessas proteínas também foi avaliada em ilhotas pancreáticas de camundongos Swiss neonatos previamente tratados por dois dias com 1 nM de anti-sense anti-ARHGAP21 ou *mismatch*. Essas ilhotas foram incubadas com 2,8 ou 16,7 mM de glicose e a secreção de insulina avaliada. **Resultados:** A ARHGAP21 localiza-se no citoplasma, mais acentuadamente na região da membrana plasmática. Glicose reduziu a expressão da ARHGAP21 e PKC ζ e não alterou a expressão da FAK e Cdc42, enquanto a insulina não alterou a expressão de nenhuma das proteínas estudadas. A glicose também promoveu a dissociação ARHGAP21/FAK, levando ao aumento na fosforilação da FAK seguido de aumento na associação ARHGAP21/PKC ζ e redução na fosforilação da PKC ζ em Thr 410. Animais *Knockdown* para ARHGAP21 apresentaram menor expressão de PKC ζ e maior expressão de Cdc42, além de um aumento na secreção de insulina por ilhotas pancreáticas tanto em condição sub- (2,8 mM) quanto supra-estimulatória (16,7 mM) de glicose. **Conclusão:** ARHGAP21 modula Cdc42 e FAK, proteínas responsáveis pelo rearranjo do citoesqueleto de actina e extrusão

do grânulo de insulina, reduzindo sua expressão e atividade, o que inibe a secreção de insulina. Além disso, observamos que a glicose modula as interações ARHGAP21/FAK e ARHGAP21/PKC ζ .

ABSTRACT

Background/Aims: ARHGAP21 is a Rho-GAP that promotes activation of the Rho-GTPase Cdc42 intrinsic factor, which is responsible for the hydrolysis of GTP to GDP and those proteins inactivation. ARHGAP21 associates with PKC ζ in cardiomyocytes and to the C-terminal portion of FAK in glioblastoma, inhibiting Rho-GTPases and actin cytoskeleton rearrangement. Cdc42, FAK and PKC ζ promote glucose-stimulated insulin secretion, differentiation and proliferation in pancreatic islets. The aim this study was to assess in pancreatic beta cells: 1) ARHGAP21 expression and localization; 2) glucose effect in PKC ζ , FAK e Cdc42 expression and association to ARHGAP21; 3) The role of ARHGAP21 on glucose-stimulated insulin secretion. **Materials and Methods:** ARHGAP21 expression and localization in MIN6 cells were evaluated by immunofluorescence. MIN6 cells were treated with glucose (5.6 mM and 22 mM) or insulin (0.2 U/ml) for 3 days. After protein extraction, the ARHGAP21, PKC ζ , FAK e Cdc42 expressions were evaluated by Western blot. MIN6 cells were exposed for 0, 5, 15, e 30 min to 22 mM of glucose. ARHGAP21/FAK and ARHGAP21/PKC ζ interactions were evaluated for immunoprecipitation and phosphorylation of FAK in tyrosine 397 and 925 and phosphorylation of PKC ζ in threonine 410. The expression of these proteins also was evaluated in pancreatic islets of neonates Swiss mice previously treated for 2 days with 1 nM of ARHGAP21 antisense or mismatch oligonucleotides. These islets were incubated with 2.8 mM or 16.7 mM of glucose and insulin secretion was evaluated. **Results:** ARHGAP21 is localized in the cytoplasm, mainly the plasmatic membrane. Glucose reduced ARHGAP21 and PKC ζ expression but not altered FAK and Cdc42 expression, while insulin had no effect whatsoever on the expression of the studied proteins. Glucose also dissociated ARHGAP21/FAK, leading to increased FAK phosphorylation, which was followed by ARHGAP21/PKC ζ association and reduced Thr410 PKC ζ phosphorylation. ARHGAP21 Knockdown mice pancreatic islets had lower PKC ζ and higher Cdc42 expression, and also increased insulin secretion in both sub- (2.8 mM) and supra-stimulatory (16.7 mM) of glucose conditions. **Conclusions:** ARHGAP21 modulates Cdc42 and FAK, proteins responsible for rearrangement of actin cytoskeleton and extrusion of insulin vesicles, and reducing their expression leads to inhibited insulin secretion. Furthermore, we observed that glucose modulates ARHGAP21/FAK and ARHGAP21/ PKC ζ interactions.

INTRODUÇÃO

Secreção de Insulina

A secreção de insulina pode ser regulada por vários nutrientes circulantes, em especial pela glicose. A glicose é internalizada pelas células beta através de um transportador especial denominado GLUT2 localizado na membrana plasmática. Dentro da célula, a glicose é rapidamente metabolizada o que leva ao aumento da razão ATP/ADP intracelular e promove o fechamento de canais de potássio sensíveis à ATP (K_{ATP}) na membrana plasmática (1; 2), com consequente elevação da $[K^+]$ intracelular. A retenção de cargas positivas no interior da célula provoca despolarização da membrana plasmática e consequente abertura de canais de cálcio dependentes de voltagem o que, por sua vez, leva ao aumento da $[Ca^{2+}]$ citoplasmático (3). Esse aumento na $[Ca^{2+}]$ promove a translocação e fusão de grânulos de insulina na membrana citoplasmática da célula beta e subsequente liberação do hormônio para o meio extracelular (4; 5).

Para que essa translocação de grânulos de insulina ocorra, é necessário a movimentação de componentes do citoesqueleto, como microtúbulos e filamentos de actina. A rede de microtúbulos é essencial para o processo de direcionamento e orientação dos grânulos de insulina em direção ao citoesqueleto de actina localizado na periferia da célula (6; 7), sendo as proteínas Cinesina I e Dineína fundamentais para esse processo (7). O citoesqueleto denso de actina limita a aproximação das vesículas de insulina à membrana da célula e, portanto, é necessário o rearranjo desta rede para que o grânulo se ancore à membrana plasmática e permita a extrusão da insulina. (6; 8).

Citoesqueleto de actina

A actina se encontra no citoplasma das células nas formas monomérica (G-actina) ou polimérica (F-actina), e a dinâmica da formação dos filamentos de actina é regulada pelo controle do balanço homeostático entre essas duas formas. Esse controle depende de múltiplos fatores, dentre eles as GTPases da família Rho (Cdc42, Rac e RhoA) que, uma vez ativadas, promovem o desarranjo do citoesqueleto de actina, (9; 10).

Em células beta, as Rho-GTPases que promovem o remodelamento do citoesqueleto de actina, estão envolvidas no processo de secreção de insulina estimulada por glicose (11; 12). Além disso, a Cdc42 também participa do processo de fusão do grânulo de insulina à membrana plasmática (13).

As Rho-GTPases são reguladas principalmente por três fatores: (1) as GEFs (fatores de troca de nucleotídeos de guanina) que facilitam a conversão da forma inativa (ligada a GDP) para a forma ativa (ligada a GTP); (2) as GDIs (fatores inibitórios de dissociação de GDP) que inibem a dissociação do GDP da Rho-GTPase, o que mantém a proteína na sua forma inativa; (3) as GAPs (proteínas ativadoras de GTPases) que promovem a ativação de um fator intrínseco das Rho-GTPases responsável pela hidrólise de GTP à GDP, o que leva à inativação da proteína (11).

A ARHGAP21 é uma GAP recentemente descoberta (14), que tem a redução de sua expressão relacionada ao aumento na atividade de Cdc42 em linhagens celulares de glioblastoma (15).

ARHGAP21

ARHGAP21 pertence à família das Rho-GAPs (Proteínas ativadoras de Rho-GTPases). Seu gene é composto por 26 exons, localizado no braço curto do cromossomo 10 humano e que codifica um transcrito de 7.107 bases e quadro aberto de leitura de 5.874 pb. A proteína codificada pelo RNAm possui 1.957 aminoácidos com peso molecular aproximado de 250 kDa e, três domínios principais: PDZ (PSD-95/Discs-large/ZO-1), PH (Domínio homólogo à Plequistrina) e Rho-GAP (14) (16) (Figura 1).

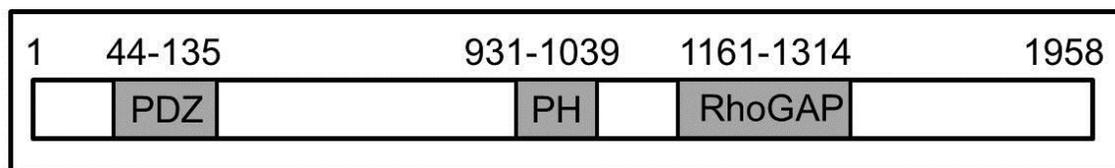


Figura 1. Esquema da estrutura primária da proteína ARHGAP21 e seus domínios. A ARHGAP21 apresenta 1957 aminoácidos e os domínios PDZ, PH e Rho-GAP.

A ARHGAP21 é altamente expressa nos tecidos musculares esquelético e cardíaco, em células neuronais, na placenta e em células HL-60. Nestas, a referida proteína está envolvida na diferenciação celular (14).

No tecido cardíaco, a ARHGAP21 se associa à PKC ζ (Proteína Quinase C isotipo zeta). Visto que a fosforilação de PKC ζ em Thr 410 leva à ativação das vias MAPK e NF κ B (17), a associação ARHGAP21/PKC ζ provavelmente está relacionada a processos de sobrevivência e proliferação celular (Figura 2A) (18).

Além disso, ARHGAP21 se associa à porção C-terminal da FAK (Quinase de Adesão Focal) em células cardíacas de ratos normais e espontaneamente hipertensos, possivelmente regulando sua atividade (18). Essa interação ARHGAP21/FAK impede a associação da FAK com p130^{CAS} (proteína da família CAS, responsável pelo recrutamento das proteínas adaptadoras Crk). Uma vez que a proteína p130^{CAS} participa do recrutamento de proteínas adaptadoras Crk, a associação ARHGAP21/FAK impede o recrutamento das Crk e portanto inibe a ativação das Rho-GTPases Rac1, Cdc42 ou JNK (Jun quinase) (Figura 2B) (15).

ARHGAP21 e a célula beta pancreática

A exocitose dos grânulos de insulina pelas células beta é realizada através da mobilização e fusão de um *pool* de grânulos localizados próximos à membrana, prontos para serem liberados (19). A fusão dos grânulos de insulina ocorre através da interação da proteína VAMP2 (Proteína associada à membrana de vesícula 2), uma v-SNARE (receptor solúvel de ligação NSF associado à membrana de vesícula), com proteínas t-SNARE (receptor solúvel de ligação NSF associado a membrana alvo) presentes na membrana plasmática, principalmente Sintaxina 1A e SNAP-25 (20; 21). Contudo, os mecanismos anteriores à fusão do grânulo à membrana plasmática ainda não são totalmente conhecidos.

Sabe-se que em células beta pancreáticas, Cdc42 colocaliza-se com a VAMP2 (12), e atua como molécula sinalizadora para fusão do grânulo à membrana. Concentrações estimulatórias de glicose ativam a Cdc42 ligada à VAMP2, o que promove a ligação de VAMP2 à Sintaxina 1A (22) e leva à formação do complexo Cdc42/VAMP2/Sintaxina 1A e conseqüentemente à extrusão dos grânulos de insulina (13).

Considerando que Cdc42 e FAK participam do rearranjo do citoesqueleto (Figura 2B) e são importantes controladores dos processos de extrusão de grânulos de insulina (11; 12; 23; 24) e, que ambas são controladas por ARHGAP21 (15; 18), pode-se supor que a ARHGAP21 module a atividade dessas proteínas em células beta pancreáticas, e, portanto, que esteja envolvida nos processos de rearranjo de citoesqueleto, extrusão de grânulos e, finalmente, na secreção de insulina estimulada por glicose. Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o papel da ARHGAP21 no controle da secreção de insulina estimulada por glicose.

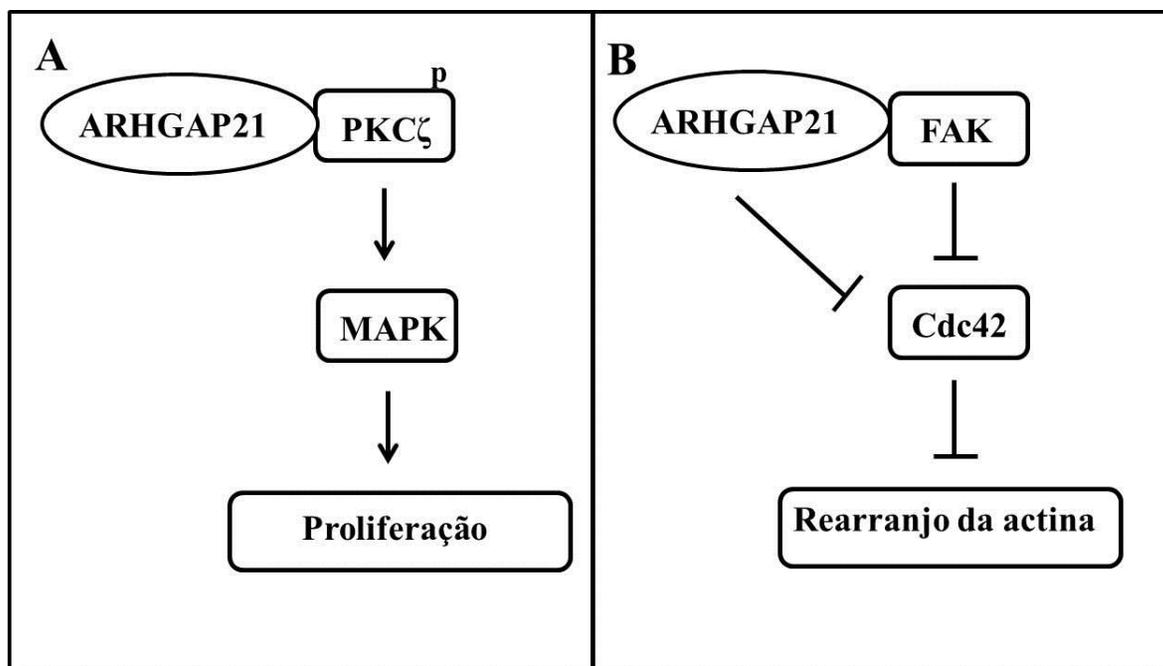


Figura 2. Interações proteicas de ARHGAP21. Em cardiomiócitos a ARHGAP21 se associa à PKC ζ fosforilada que está envolvida na modulação de via de proliferação celular (A). Em glioblastoma a ARHGAP21 interage e inibe a FAK e Cdc42 que promove o rearranjo do citoesqueleto de actina (B).

OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da glicose sobre a atividade da ARHGAP21 e sobre as proteínas que ela modula (PKC ζ , FAK e Cdc42) e o papel da ARHGAP21 no controle da secreção de insulina estimulada por glicose. Para isso avaliamos:

1. A expressão e localização da ARHGAP21 em linhagens tumorais de células secretoras de insulina MIN6;
2. A expressão protéica da ARHGAP21, da PKC ζ , da FAK e da Cdc42 em células MIN6, na presença de concentrações sub- (5,6 mM) e supra-estimulatória de glicose (22 mM) bem como em MIN6 cultivadas na presença ou ausência de insulina (0,2U/ml);
3. A fosforilação da FAK em Tyr 397 e Tyr 925 em células tratadas com 22 mM de glicose em diferentes tempos (0, 5, 15 e 30 min) bem como as associações ARHGAP21/FAK e ARHGAP21/PKC ζ nessas células;
4. A secreção de insulina em ilhotas de camundongos Swiss neonatos tratados com antisense anti-ARHGAP21 bem como a expressão protéica das proteínas FAK, PKC ζ e Cdc42 nestas ilhotas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Reagentes

O anticorpo policlonal anti-ARHGAP21, produzido em coelho, correspondente aos resíduos 1856-1870 da sequência da proteína humana ARHGAP21, foi cedido pelo Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro da UNICAMP (Prof. Dr. Sara Teresinha Olalla Saad). Anticorpos policlonais produzidos em coelho contra as proteínas FAK (sc-558), p-FAK^{Tyr397} (sc-11765-R), PKC ζ (sc-216), p-PKC ζ^{thr410} (sc-12894-R) e GAPDH (sc-25778), anticorpo monoclonal anti-Cdc42 (sc-8401) e anticorpo policlonal anti-cabra contra p-FAK^{Tyr925} (sc-11766) foram adquiridos da Santa Cruz Biotechnology. Anticorpos secundários anti-coelho produzido em cabra (31460), anti-camundongo produzido em cabra (31430) e anti-cabra produzido em coelho (31402) foram obtidos da Thermo Scientific. Anticorpo secundário conjugado AlexaFluor[®] 488 (A 21441) anti-coelho produzido em galinha e o meio de montagem para fluorescência ProLong[®] Gold com DAPI (P36931) foram adquiridos da Molecular Probes, anticorpo secundário anti-cobaia conjugado com isotiocianato tetrametilrodamina (TRITC) produzido em coelho (T7153) e faloidina-TRITC (P1951), os reagentes de quimioluminescência para revelação de Western blot: 5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazinadiona (A8511-5G), Ácido p-Cumárico (C9008-5G), o meio de cultura RPMI1640 (R1383-10X1L), penicilina (P3032-100MU) e estreptomicina (S6501), antisense anti-ARHGAP21 (mC*mU*mU* mU*C*C* T*C*C* T*C*T* G*T*mU* mU*mC*mC) e *mismatch* (mC*mU*mU* mU*C*T* A*C*C* T*C*A* G*T*mU* mU*mC*mC) foram obtidos da Sigma-Aldrich. *In vivo* JetPEItm (201-10) foi adquirido da Polyplus Transfection. Soro Fetal bovino foi adquirido da Vitrocell Embriolife (Campinas, São Paulo, Brasil). Proteína Sefarose A (17-0469-01) foi obtida da GE Healthcare Life Sciences.

Cultura de células

Linhagens de células beta de camundongo (MIN6), gentilmente cedidos pelo Dr. Y. Oka e Prof. J.-I. Miyazaki (Tóquio, Japão), foram mantidas em cultura (37°C, 5% CO₂), cultivadas em meio RPMI1640 contendo 11 mM de glicose, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 100 U/ml de penicilina e 100 mg/ml de estreptomicina.

Animais

Foram utilizados camundongos Swiss neonatos com 3-6 dias de vida, provenientes do biotério central da UNICAMP.

Imunofluorescência e microscopia confocal

Células MIN6 foram cultivadas em lamínulas de vidro circulares até atingir confluência de 80%. As células foram fixadas em paraformaldeído 4% por 15 min em temperatura ambiente (TA) e lavadas em PBS (NaCl 140 mM, KCl 2,6 mM, KH_2PO_4 1,2 mM, Na_2HPO_4 8,1 mM, pH 7,4) 3 vezes (5 min, sob agitação). Para evitar ligação inespecífica do anticorpo primário e permeabilizar as células, estas foram bloqueadas em solução de PBS contendo 3% de leite desnatado e 0,5% de triton X-100 (1 h, TA). A incubação com o anticorpo primário anti-ARHGAP21 (na diluição 1:50 em PBS 1% leite desnatado) foi realizada em câmara úmida por 16-18 h (4°C). Após este período, as lamínulas foram lavadas em PBS (3 vezes de 5 min, sob agitação) e incubadas com anticorpo secundário anti-camundongo AlexaFluor 488 por 1 h, TA. A seguir, as lamínulas foram lavadas mais três vezes em PBS e incubadas com faloidina-TRITC por 30 min. Finalmente, após mais três lavagens em PBS, as lamínulas foram montadas em lâminas utilizando-se o meio de montagem para fluorescência.

As lâminas foram analisadas em microscópio de varredura confocal a laser (Zeiss LSM 510) utilizando a objetivas de 63X de imersão em óleo.

Tratamento com glicose e insulina

Células MIN6 foram semeadas em placas de 6 poços (2×10^5 células/poço) e cultivadas por três dias em meio RPMI contendo 5,6 ou 22 mM de glicose ou na ausência ou presença de insulina (0,2 U/ml) e 11 mM de glicose. Após este período as proteínas foram extraídas com tampão de Uréia 8M e Triton-X100 1%. As amostras foram sonicadas e centrifugadas a 11000 g por 15 min e a fosforilação avaliada por Western blot.

Ensaio de fosforilação e imunoprecipitação

Células MIN6 foram semeadas em placas p100 (1×10^6 células/ placa) contendo meio RPMI e 5,6 mM de glicose. Após 14-16 horas, o meio foi trocado por outro similar agora contendo 22 mM de glicose com a incubação por diferentes tempos (0, 5 15 e 30 min). Proteínas foram então extraídas com tampão de 8 M de uréia e com coquetel anti-protease contendo: Tris 100 mM, pH 7,5; Pirofosfato de sódio 10 mM; Fluoreto de sódio 100 mM; EDTA 10 mM; Ortovanadato de sódio 10 mM; PMSF 2 mM e Triton-X100 1%. As amostras foram sonicadas e centrifugadas a 11000 g por 15 min e a fosforilação avaliada por Western blot.

Para avaliar as associações entre proteínas, estas foram extraídas com tampão de extração para imunoprecipitados (EDTA 10 mM; Tris 100 mM pH 7,4; Pirofosfato de sódio 10 mM; Fluoreto de sódio 100 mM; Ortovanadato de sódio 10 mM; PMSF 2 mM; Aprotinina 0,1 mg/ml e Triton-X100 1%), sonicadas e centrifugadas a 11000 g por 15 min. Após a quantificação, 1 mg de extrato protéico foi incubado com 1 µg de anticorpo anti-ARHGAP21 por 16-18 h (4°C) sob agitação. Os imuno-complexos foram recuperados pela incubação com solução de 50% proteína sefarose A por 2 h sob agitação (4°C), seguida de 3 lavagens em tampão contendo: Ortovanadato de sódio 2 mM; Tris 100 mM, pH 7,5; Triton-X100 0,5% para remoção das ligações inespecíficas. As associações foram analisadas por Western blot.

Western Blot

Extratos protéicos foram avaliados utilizando-se reagente Bradford, BioRad, e tendo como base uma curva padrão de albumina (BSA). As amostras foram então incubadas à 100°C por 3 min em Tampão de Laemmli (20% do volume da amostra) (Azul de bromofenol 0.1%, fosfato de sódio 1M, glicerol 50%, SDS 10%) contendo DTT. Para corrida eletroforética foi aplicado um volume correspondente a 50 µg de proteína em gel bifásico: gel de empilhamento (EDTA 4 mM, SDS 2%, Trisma base 750 mM, pH 6,7) e gel de resolução (EDTA 4 mM, SDS 2%, Trisma base 50 mM, pH 8.9). A corrida foi efetuada a 90 V por aproximadamente 1,5 h com Tampão de Corrida (Trisma base 50 mM, glicina 0,38 M, EDTA 1,795 mM e SDS 0,1%). As amostras foram transferidas para uma membrana de Nitrocelulose (BioRad) durante 2 h à 120 V em gelo, banhada com Tampão de Transferência (Trisma base 25 mM, glicina 192 mM e metanol

20%). Após transferência, a membrana foi bloqueada em solução de TBST (50 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl e 0,1% Tween-20) contendo com 5% de leite desnatado por 40 min, TA. As proteínas relacionadas ao estudo foram detectadas na membrana de nitrocelulose por incubação de 14-16 h, 4° C, com anticorpo específico (anti-ARHGAP21, anti-FAK, anti-PKC ζ e anti-Cdc42). Em seguida, a membrana foi incubada por 2 h em solução contendo anticorpo policlonal anti-IgG (diluição 1:1000 em TBST com 2% de leite desnatado). As membranas foram lavadas com TBST, incubadas por 3 min com reagentes de quimioluminescência e expostas em cassetes a filmes de raio-X (Kodak, AM, Brasil). A intensidade e quantificação das bandas foram medidas por densitometria (ImageJ, Bethesda, USA), sendo os valores das bandas normalizados pelos valores de densitometria do controle interno GAPDH. Para análise da fosforilação protéica, os valores da densitometria das proteínas fosforiladas foram normalizados pela expressão das proteínas totais (Fosforilação proteica = proteína fosforilada/proteína total).

Inibição da ARHGAP21 com anti-sense

Para o *knockdown in-vivo* de ARHGAP21, camundongos Swiss neonatos (2-4 dias) receberam 1nM de oligonucleotídeo antisense específico (ARHGAP21 AS) ou *mismatch* (CTL), ambos com esqueleto fosfotiorado e metilações flanqueadas nas extremidades, dissolvidos em solução Tris-EDTA e aplicados conjuntamente ao *In vivo* JET-PEItm, de acordo com instruções do fabricante, a cada 24 horas por dois dias seguidos. No terceiro dia os camundongos foram mortos por decapitação e após incisão abdominal o pâncreas foi retirado e transferido para um tubo de 15 ml contendo solução de Hanks enriquecida com 1 mg/ml de colagenase. O pâncreas na solução de Hanks foi mantido em banho a 37°C por 17 min. Ao final deste período foi realizada uma leve agitação de 15 seg para facilitar a desagregação do tecido pancreático. A digestão do tecido foi interrompida mediante adição de Hanks a 4 °C. O material foi lavado 4 vezes em solução de Hanks para a remoção da colagenase e enzimas digestivas liberadas durante a incubação. As ilhotas, completamente separadas do tecido acinar, foram coletadas uma a uma, por aspiração com o auxílio de pipeta Pasteur, previamente estirada e siliconada. Foram avaliadas expressão protéica de ARHGAP21, FAK, PKC ζ e Cdc42 e a secreção de insulina estimulada por glicose.

Secreção de insulina

Ilhotas pancreáticas foram pré-incubadas em solução de Krebs 5,6 mM de glicose por 1 h a 37°C. As ilhotas foram então incubadas com solução de Krebs contendo 2,8 ou 16,7 mM de glicose por 1 h a 37°C. Amostra do sobrenadante foi coletada e a insulina contida nesse meio foi medida por radioimunoensaio. A secreção foi expressa por ilhota.

Análise Estatística

Os resultados foram analisados pelo teste *t student*. As análises foram feitas com o programa GraphPad Prism 4. O nível de significância adotado para as análises foi $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Expressão e localização da ARHGAP21 em MIN6

Inicialmente, verificamos a expressão e localização da ARHGAP21 em células MIN6. Observamos que, em geral, a ARHGAP21 localiza-se no citoplasma e, de forma mais acentuada, próximo à membrana plasmática. Observamos também que a ARHGAP21 colocaliza-se com o citoesqueleto de actina (Figura 3).

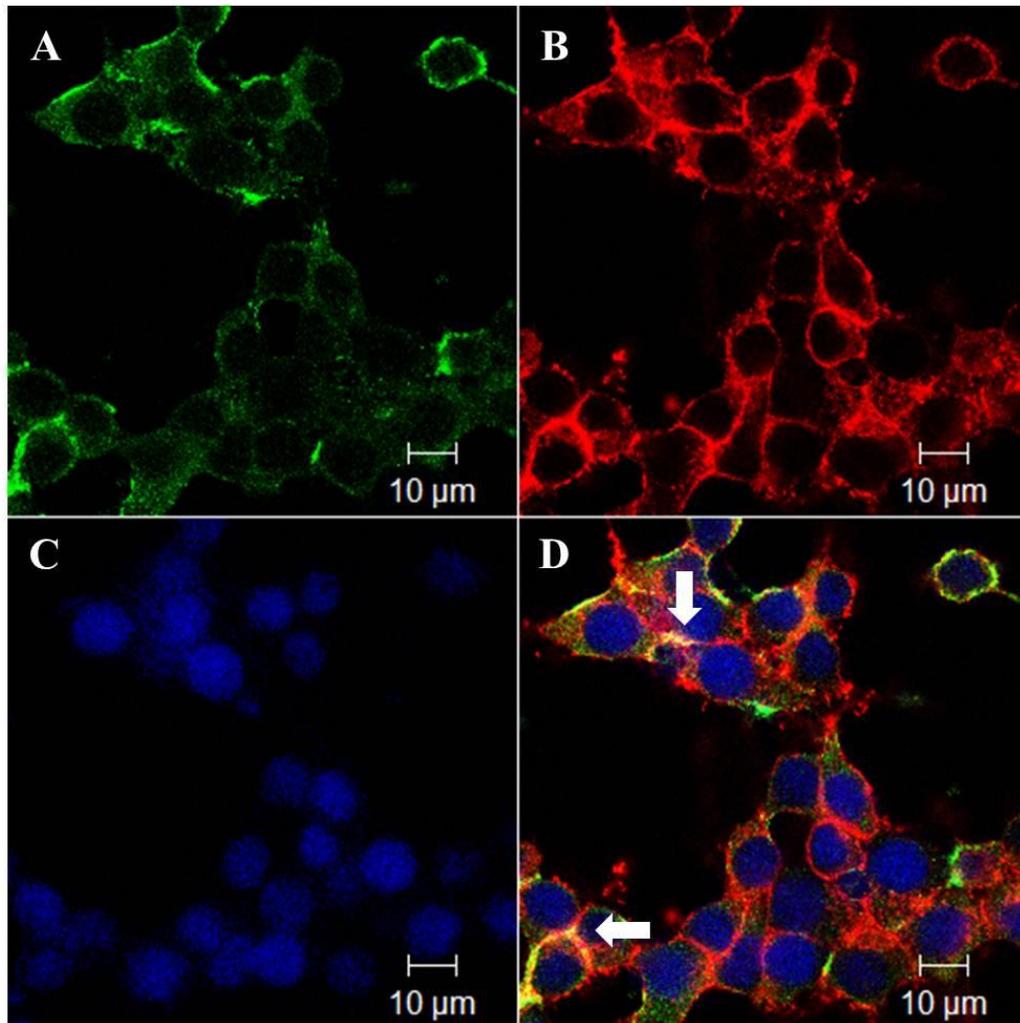


Figura 3. Localização citoplasmática da ARHGAP21. (A) ARHGAP21, (B) filamento de actina, (C) Núcleo (DAPI) e (D) sobreposição das imagens A ,B e C. As setas indicam colocalização da ARHGAP 21 com o filamento de actina . Imagens capturadas por escaneamento a laser LSM-510 (Zeiss) montado sobre um microscópio Axioplan (Zeiss).

A localização citoplasmática da ARHGAP21 nas células MIN6 difere daquela registrada em outros tipos celulares. Em cardiomiócitos a ARHGAP21 se localiza predominantemente no núcleo (18), ao passo que em linhagens celulares de fibroblastos humanos normais, em linhagens celulares de carcinoma cervical humano (HeLa) e linhagens de glioblastoma humano A172 e T98G a proteína se localiza na região nuclear e peri-nuclear (15). A exemplo do que mostramos em células MIN6 (Figura 3), a localização de ARHGAP21 próximo a membrana plasmática foi observada em linhagens de células epiteliais Caco-2 e JEG-3, onde a ARHGAP21 mostrou ser importante no controle da dinâmica da actina, no contato célula-célula e na formação de junções (16). Interessante salientar que a depleção da ARHGAP21 em células T98G provocou mudanças drásticas na morfologia da célula, resultante do rearranjo do citoesqueleto (15). Como mostrado na Figura 3, observamos interação entre a ARHGAP21 com o filamento de actina o que, provavelmente indica que, também nas células beta pancreática, a ARHGAP21 possa modular o citoesqueleto de actina.

Efeito da glicose e da insulina na expressão da ARHGAP21, FAK, PKC ζ e Cdc42

A seguir, avaliamos uma possível modulação por glicose da expressão de ARHGAP21 e proteínas associadas (FAK, PKC ζ e Cdc42) em células MIN6. Para tanto, células MIN6 foram expostas a 5,6 ou 22 mM glicose por 3 dias. Observamos que em 22 mM de glicose não houve alteração na expressão das proteínas FAK (Figura 4D) e Cdc42 (Figura 4F), contudo, as expressões da ARHGAP21 (Figura 4C) e da PKC ζ (Figura 4E) foram significativamente reduzidas, indicando possível modulação dessas duas proteínas pela glicose.

No entanto, considerando-se que as células MIN6 secretam quantidades significativas de insulina em resposta a concentrações variáveis de glicose, os efeitos observados em alta concentração do açúcar poderiam estar relacionados à ação da insulina secretada e não da glicose. Sendo assim, realizamos um protocolo experimental para determinar a função da insulina nas alterações observadas em presença de altas concentrações de glicose. Para isso, cultivamos células MIN6 por 3 dias na ausência (CTL) ou presença (INS) de 0,2 U/ml de insulina e de apenas 11 mM de glicose (concentração de glicose usualmente utilizada para o cultivo dessas células). Os resultados obtidos mostraram que a insulina não promoveu alterações na expressão das proteínas ARHGAP21 (Figura 4G), FAK (Figura 4H), PKC ζ (Figura 4I) e Cdc42 (Figura 4J),

demonstrando que os efeitos observados no tratamento com altas concentrações de glicose (Figura 4C-F) são decorrentes de um efeito direto da hexose.

Efeito da glicose sobre as interações ARHGAP21/FAK e ARHGAP21/PKC ζ e fosforilação da FAK e PKC ζ

Sabendo-se que a ARHGAP21 controla a atividade da FAK (15) e da PKC ζ (18), avaliamos se a glicose modula as interações ARHGAP21/FAK e ARHGAP21/PKC ζ em células MIN6. Para isso, verificamos, por imunoprecipitação, as associações ARHGAP21/FAK e ARHGAP21/PKC ζ após 0, 5, 15 ou 30 min de exposição à 22 mM de glicose (Figura 5) e observamos redução na associação ARHGAP21/FAK já após 5 min de exposição à glicose (Figura 5C), acompanhada de maior associação ARHGAP21/PKC ζ após 15 min de exposição à glicose (Figura 5F).

Para avaliar como a redução na associação ARHGAP21/FAK se reflete na atividade dessa proteína, analisamos a fosforilação de FAK nos sítios tirosina 397 e 925, e verificamos que a glicose aumentou a fosforilação do sítio 397 a partir de 5 min (Fig. 5D), e a fosforilação do sítio 925 da FAK somente após 15 min (Figura 5E).

A FAK (Figura 6) interage com integrinas (Figura 7), transmite sinais da matriz extracelular para o interior das células e ativa vias de proliferação e migração celular (25). Ainda, em ilhotas pancreáticas, ela é importante regulador de diferenciação e sobrevivência celular (26). Quando integrinas se dimerizam e interagem com o domínio FERM da FAK ou quando receptores de fatores de crescimento são ativados por seus ligantes (tais como PDGFr e EGFr), a FAK se autofosforila em Tyr 397 (27) e recruta a proteína c-Src (14; 28) a qual, por sua vez, fosforila os resíduos Tyr 576/577 do domínio quinase e os resíduos Tyr 861 e Tyr 925 presentes na porção C-terminal de FAK (Figura 6). O último resíduo a ser fosforilado, o Tyr 925, promove a associação de proteínas contendo domínio SH2 à proteínas contendo domínio SH3 (29), tais como proteínas da família CAS. Essa associação ativa pequenas GTPases, como Rac1 ou Cdc42 e JNK (25) (Figura 7). Neste contexto, é conhecido que, em glioblastoma, a ARHGAP21 interage com a região C-terminal da FAK e impede a fosforilação do sítio Tyr 925, o que reduz a atividade de FAK nessas células (15).

Sendo assim, podemos hipotetizar que a glicose é responsável pela ativação da FAK em célula beta através de mecanismo semelhante, ou seja, a glicose promove a dissociação entre ARHGAP21 e FAK levando à um aumento na fosforilação de Tyr 397 e Tyr 925 o que, finalmente, provoca o aumento da atividade de FAK. Como em células MIN6 observamos que a ARHGAP21 é capaz de inibir a atividade da FAK, ARHGAP21 pode ser um regulador negativo da diferenciação e sobrevivência de células beta e do rearranjo do citoesqueleto de actina.

Quanto à PKC ζ , verificamos que sua fosforilação em Thr 410 se encontra diminuída em células beta na presença de 22 mM de glicose a partir de 5 min (Figura 5G). A PKC ζ é uma isoforma atípica que faz parte do subgrupo da família de proteínas quinase C que são insensíveis ao Ca²⁺ e ao diacilglicerol (30). É ativada por componentes lipídicos, tais como fosfatidilinositois (31), ácido fosfatídico (32), ácido aracdônico e ceramidas (33) que promovem, via PI3K, a exposição do principal resíduo de fosforilação e ativação localizado no domínio quinase, Thr 410 (34). Em células beta, a PKC ζ está envolvida na atividade mitogênica através da ativação da via da MAPK (35) (Figura 8). Observamos que, em células beta, a ARHGAP21 interagiu com a PKC ζ , a exemplo do que já foi descrito para cardiomiócitos (18). Além disso, vimos que a glicose reduziu a fosforilação de PKC ζ e aumentou a associação ARHGAP21/PKC ζ , isso indica que a ARHGAP21 pode ser um regulador da proliferação celular em célula beta.

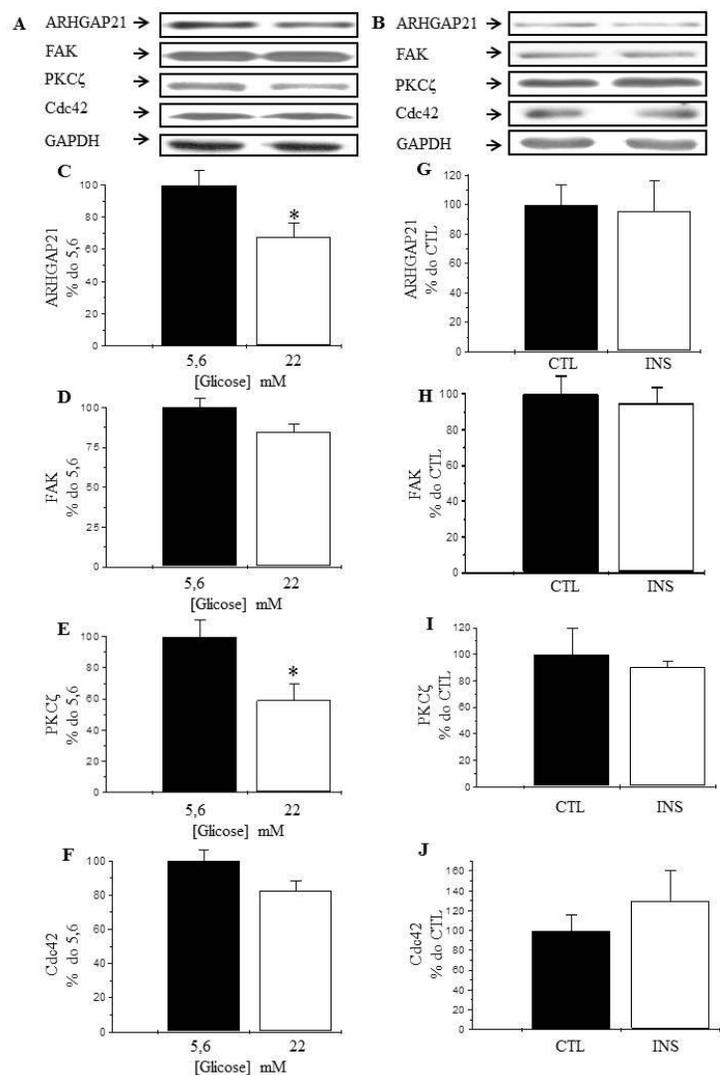


Figura 4. Expressão protéica de ARHGAP21, FAK, PKC ζ e Cdc42. Expressão protéica de ARHGAP21, FAK, PKC ζ e Cdc42 de células MIN6 tratadas por três dias com 5,6 ou 22mM de glicose e de MIN6 cultivadas na ausência (CTL) ou presença de insulina (INS) (0,2U/ml) durante três dias. (A) e (B) Imagens representativas dos Westerns blot para as proteínas ARHGAP21, FAK, PKC ζ , Cdc42 e GAPDH. (C-F) Quantificação da expressão protéica de ARHGAP21, FAK, PKC ζ e Cdc42 de células MIN6 cultivadas em 5,6 ou 22 mM de glicose. (D-J) Quantificação da expressão protéica de ARHGAP21, FAK, PKC ζ e Cdc42 em células MIN6 cultivadas na ausência ou presença se insulina (0,2U/ml). Resultados apresentados em % dos obtidos em 5,6 ou CTL. *p<0,005 vs 5,6 ou CTL. A figura representa 3experimentos independentes.

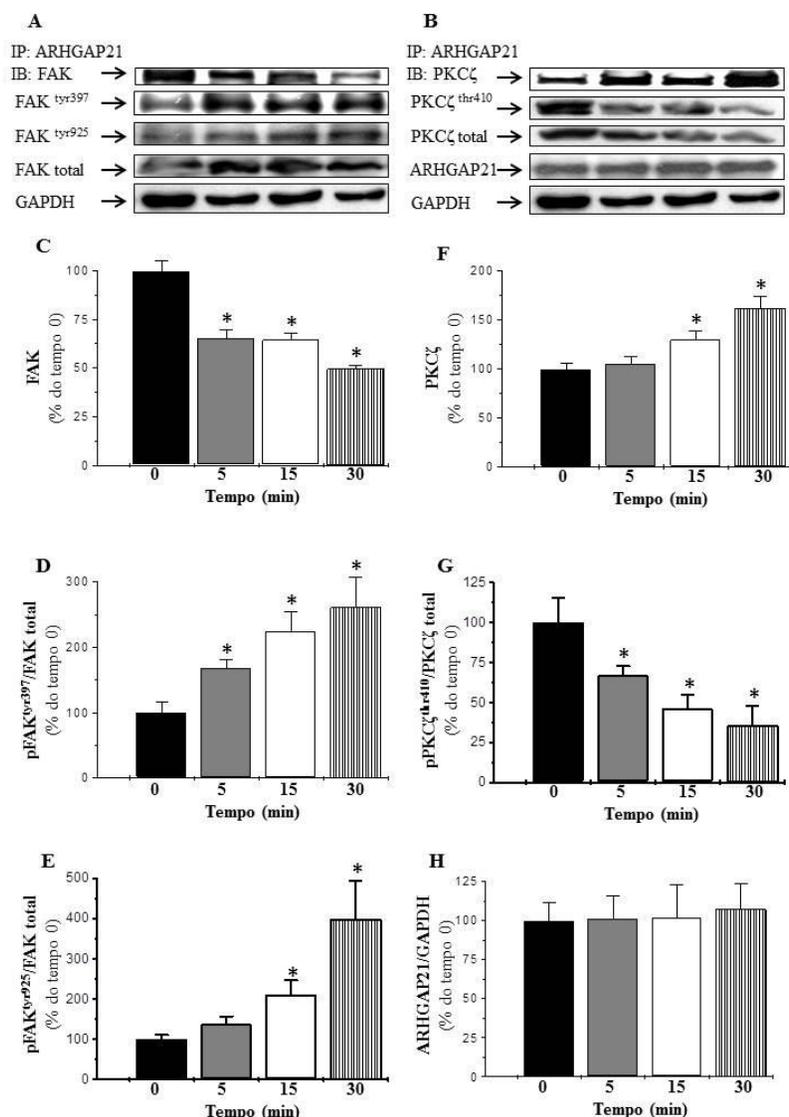


Figura 5. Ensaio de imunoprecipitação e fosforilação. Análise da associação de ARHGAP21/FAK e ARHGAP21/PKCζ e expressão protéica de FAK^{Tyr 397}, FAK^{Tyr 925}, PKCζ^{thr410} e ARHGAP21 de células MIN6 tratadas com 22 mM de glicose em 0, 5, 15 e 30 min. (A) Imagens representativas da associação de ARHGAP21/FAK e expressão proteica de FAK total, FAK^{Tyr 397}, FAK^{Tyr 925}, (B) Imagens representativas da associação ARHGAP21/ PKCζ e de expressão proteica de PKCζ total, PKCζ^{thr410} e ARHGAP21. (C) Níveis de associação entre ARHGAP21 e FAK (D) FAK^{Tyr 397} (FAK^{Tyr 397}/FAK). (E) FAK^{Tyr 925} (FAK^{Tyr 925}/FAK). (F) Níveis de associação entre ARHGAP21 e PKCζ. (G) PKCζ^{thr410} (PKCζ^{thr410}/ PKCζ). (H) ARHGAP21. Resultados apresentados em % em relação aos obtidos no tempo 0, *p<0,05 vs tempo 0. A figura representa 3 experimentos independentes.

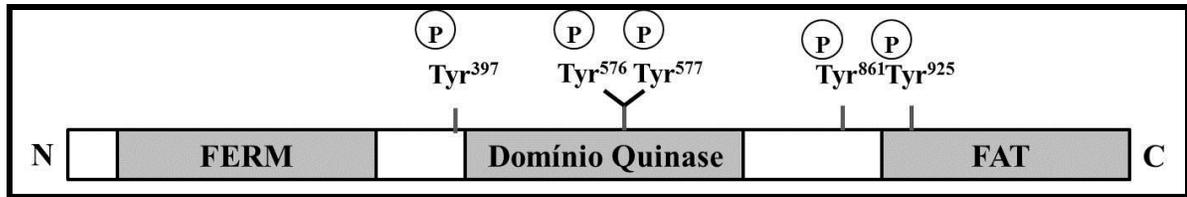


Figura 6. Esquema da estrutura primária da proteína FAK. Evidenciados o domínio FERM na região N-terminal, um domínio quinase central, o domínio FAT na região C-terminal e os resíduos de tirosina (Tyr) que quando fosforilados resultam em ativação da proteína.

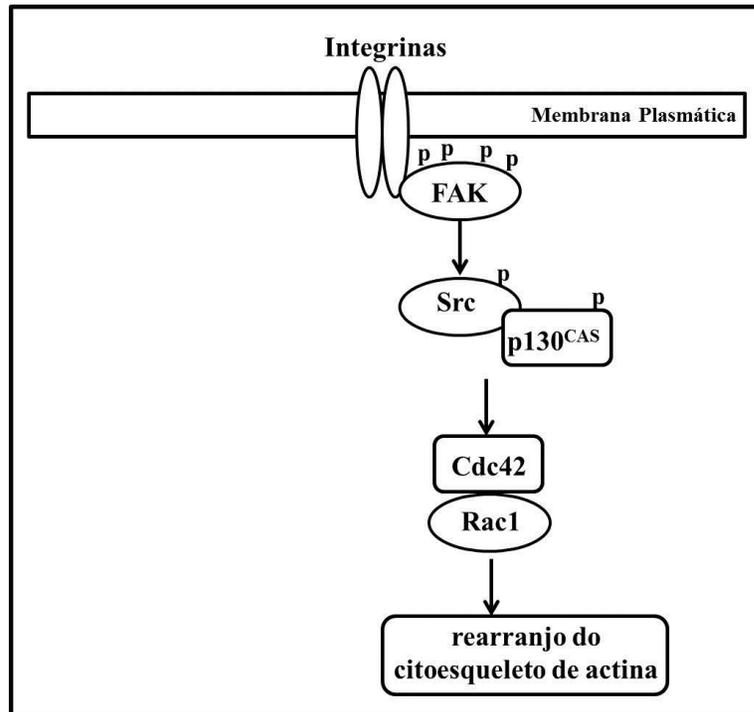


Figura 7. Esquema da via de ativação de FAK. A fosforilação de FAK ocorre quando as subunidades de integrinas se dimerizam devido à sinalização da matriz extracelular (ECM), uma vez fosforilada a FAK recruta e fosforila a proteína Src. A proteína p130^{CAS} se associa à FAK ativa e é fosforilada por Src e ativa proteínas da família RhoGTPase resultando em modificações do citoesqueleto de actina.

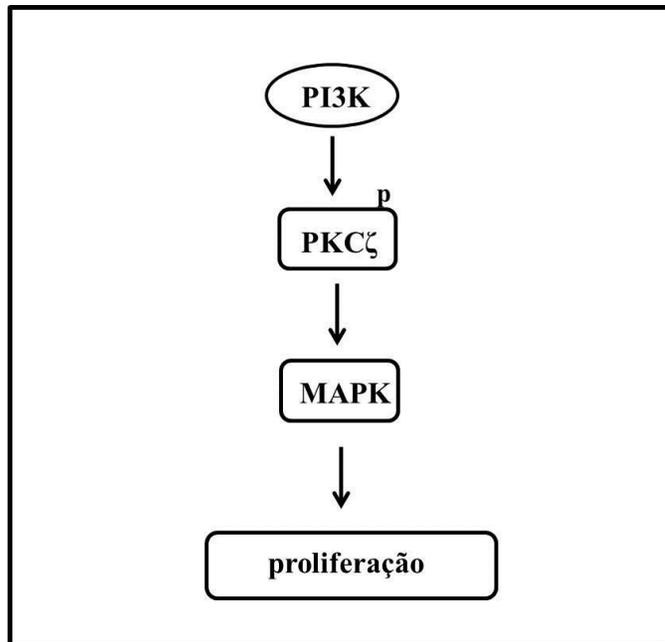


Figura 8. Esquema da via de ativação de PKC ζ . A PKC ζ é fosforilada em Thr 410 via PI3K e, uma vez fosforilada, a PKC ζ ativa a cascata de MAPK o que leva a proliferação celular.

Efeito da ARHGAP21 sobre a expressão FAK, PKC ζ e Cdc42

Avaliamos também um possível controle da ARHGAP21 sobre a expressão das proteínas FAK, PKC ζ e Cdc42 (Figura 9) em ilhotas pancreáticas de camundongos, através da redução na expressão de ARHGAP21 *in-vivo* por antisense específico.

Observamos que ilhotas pancreáticas de camundongos *knockdown* para ARHGAP21 apresentaram menor expressão de PKC ζ (Figura 9D) e maior expressão de Cdc42 (Figura 9E), sem alteração da FAK (Figura 9C), indicando que a ARHGAP21 exerce função importante na modulação da expressão das proteínas Cdc42 e PKC ζ e, provavelmente, também nos processos de rearranjo do citoesqueleto de actina, extrusão de grânulos e secreção de insulina uma vez que a Cdc42 está envolvida no remodelamento do citoesqueleto de actina e fusão do grânulo de insulina à membrana plasmática (6; 11; 13). A ação de ARHGAP21 sobre a atividade de Cdc42 já foi demonstrada em glioblastomas, células Vero (linhagem celular de rim de macaco) e em células HeLa em que a inibição de ARHGAP21 aumentou a atividade de Cdc42 o que levou a formação de protusões membranares (15) e regulação da motilidade de vesículas dependente de dineína (36; 37).

Papel da ARHGAP21 na secreção de insulina

Para testar a hipótese de que a ARHGAP21 seria um importante controlador da secreção de insulina, realizamos experimento com ilhotas de camundongos Controle (CTL) e ARHGAP21 *knockdown* (AS) em condições basal (2,8 mM) e estimulatória (16,7 mM) de Glicose. Observamos um aumento na secreção de insulina tanto basal quanto estimulada nas ilhotas AS (Figura 10), indicando que a ARHGAP21 é realmente um modulador da secreção de insulina estimulada por glicose, e mais ainda, que atua inibindo-a.

A glicose promove secreção de insulina, em parte remodelando o citoesqueleto de actina via ciclagem da Cdc42 da forma ativa para a forma inativa (24). Diante dos nossos resultados, é provável que a remodelação do citoesqueleto de actina induzido pela glicose ocorra via modulação da ARHGAP21. Desta forma, a glicose diminui a fosforilação da PKC ζ em Thr 410 que nessa situação se associa a ARHGAP21, que esta acoplada à FAK, levando a sua liberação. Quando livre, a FAK tem um aumento na fosforilação em Tyr 925, o que leva a uma ativação das RhoGTPases, culminando finalmente, no rearranjo do citoesqueleto de actina (Figura 11).

Sendo assim, concluímos que ARHGAP21 inibe o rearranjo do citoesqueleto de actina necessário à extrusão de grânulos de insulina, e conseqüentemente, a secreção de insulina estimulada por glicose. Além disso, é provável que a ARHGAP21 também esteja envolvida em processos de diferenciação, sobrevivência e proliferação celular em ilhotas, visto que modula as proteínas FAK e PKC ζ , relacionadas a esses processos (35). Finalmente, considerando o envolvimento e importância da ARHGAP21 em diversos mecanismos de controle da função de células-beta pancreáticas e a importância da função dessas para o controle glicêmico e desenvolvimento de Diabetes, seria de grande importância o estudo da função dessa proteína em modelos de Diabetes.

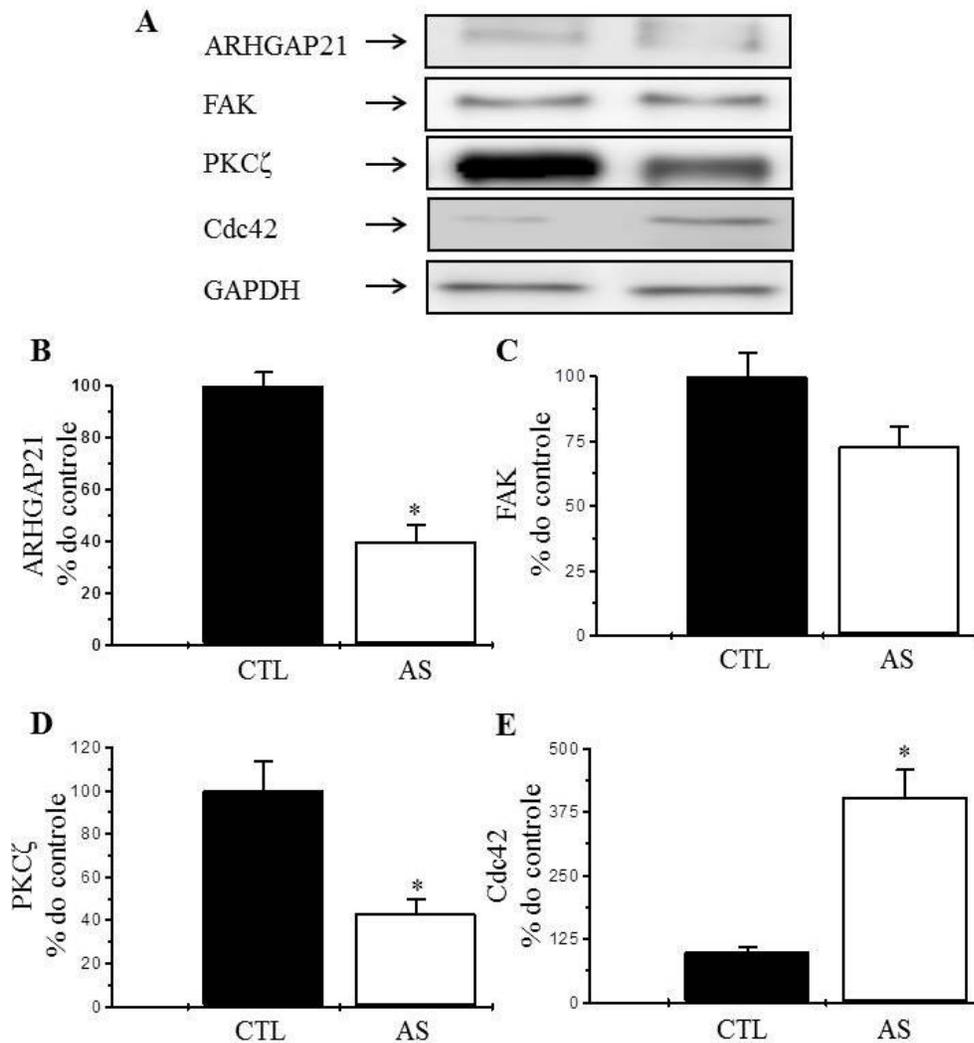


Figura 9. Expressão protéica de ARHGAP21, FAK, PKCζ e Cdc42. Expressão protéica de ARHGAP21, FAK, PKCζ e Cdc42 de ilhotas de camundongos Swiss neonato tratados com antisense 1nM de anti-ARHGAP21. (A) Imagens representativas da expressão proteica de ARHGAP21, FAK, PKCζ, Cdc42 e GAPDH. (B) Quantificação da expressão protéica de ARHGAP21, (C) FAK, (D) PKCζ, (E) Cdc42, resultados apresentados em relação aos obtidos no tempo 0, * $p < 0,05$ vc controle. A figura representa $n=4$.

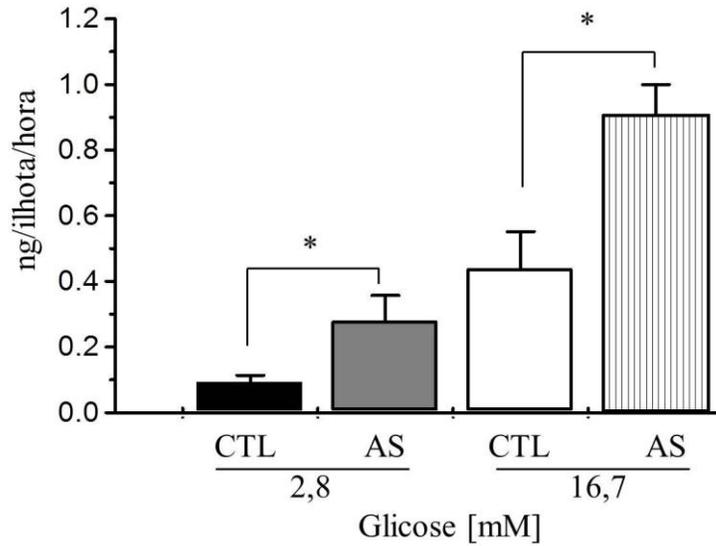


Figura 10. Secreção de insulina. Secreção de insulina estimulada com 2,8 ou 16,7 mM de glicose de ilhotas de camundongos Swiss neonatos com ARHGAP21 inibida, * $p < 0,005$; $n = 8$.

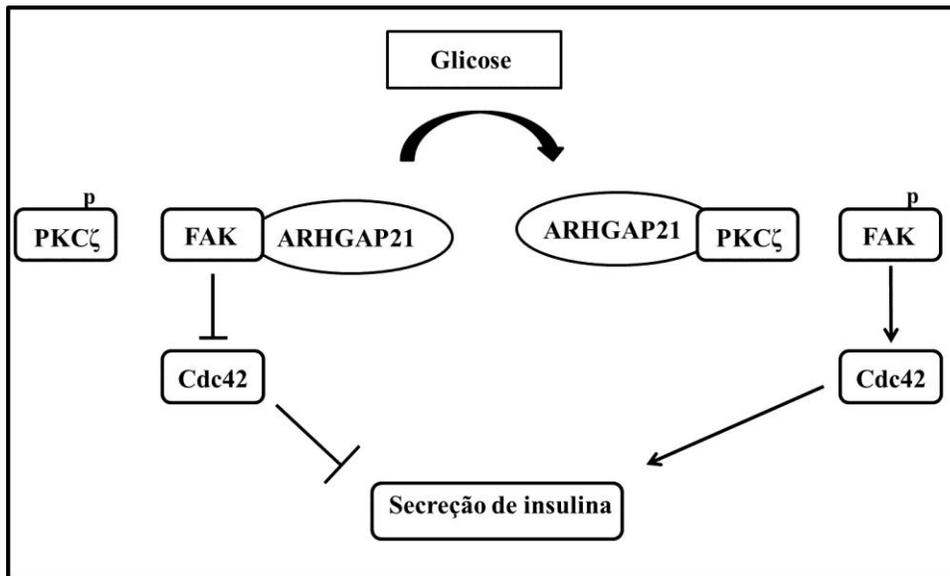


Figura 11. Modulação da ARHGAP21 pela glicose. Na ausência de glicose a ARHGAP21 está associada à FAK inibindo sua ativação e consequentemente a secreção de insulina. Na presença de glicose a ARHGAP21 se dissocia da FAK e associa à PKC ζ , assim a FAK se autofosforila e ativa vias que favorecem a secreção de insulina.

CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos podemos concluir que:

1. Em células MIN6 a ARHGAP21 tem localização citoplasmática, de forma acentuada na periferia, e está associada ao citoesqueleto de actina, indicando envolvimento no controle do rearranjo do citoesqueleto de actina.
2. A glicose modula a expressão de ARHGAP21 bem como sua interação com FAK e PKC ζ .
3. A ARHGAP21 interage e regula a expressão de PKC ζ indicando uma provável modulação da ARHGAP21 sobre a proliferação de células beta.
4. A ARHGAP21 inibe a secreção de insulina, tanto através da modulação direta da expressão de Cdc42, quanto indireta, via inibição da FAK que modula a atividade de Cdc42.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Meglasson M, Matschinsky F: Pancreatic islet glucose metabolism and regulation of insulin secretion. *Diabetes Metab Rev* 1986;2:163-214
2. Cook S, McCormick F: Ras blooms on sterile ground. *Nature* 1994;369:361-362
3. Satin L, Cook D: Voltage-gated Ca²⁺ current in pancreatic B-cells. *Pflugers Arch* 1985;404:385-387
4. Prentki M, Matschinsky F: Ca²⁺, cAMP, and phospholipid-derived messengers in coupling mechanisms of insulin secretion. *Physiol Rev* 1987;67:1185-1248
5. Henquin J: Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. *Diabetes* 2000;49:1751-1760
6. Wang Z, Thurmond DC: Mechanisms of biphasic insulin-granule exocytosis - roles of the cytoskeleton, small GTPases and SNARE proteins. *J Cell Sci* 2009;122:893-903
7. Varadi A, Tsuboi T, Johnson-Cadwell LI, Allan VJ, Rutter GA: Kinesin I and cytoplasmic dynein orchestrate glucose-stimulated insulin-containing vesicle movements in clonal MIN6 beta-cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;311:272-282
8. Liu Z, Zhang YW, Chang YS, Fang FD: The role of cytoskeleton in glucose regulation. *Biochemistry (Mosc)* 2006;71:476-480
9. Hall A: Small GTP-binding proteins and the regulation of the actin cytoskeleton. *Annu Rev Cell Biol* 1994;10:31-54
10. Lee SH, Dominguez R: Regulation of actin cytoskeleton dynamics in cells. *Mol Cells* 2010;29:311-325
11. Kowluru A: Small G proteins in islet beta-cell function. *Endocr Rev* 2010;31:52-78
12. Kowluru A, Seavey S, Li G, Sorenson R, Weinhaus A, Neshier R, Rabaglia M, Vadakekalam J, Metz S: Glucose- and GTP-dependent stimulation of the carboxyl methylation of CDC42 in rodent and human pancreatic islets and pure beta cells. Evidence for an essential role of GTP-binding proteins in nutrient-induced insulin secretion. *J Clin Invest* 1996;98:540-555
13. Nevins A, Thurmond D: A direct interaction between Cdc42 and vesicle-associated membrane protein 2 regulates SNARE-dependent insulin exocytosis. *J Biol Chem* 2005;280:1944-1952
14. Bassères D, Tizzei E, Duarte A, Costa F, Saad S: ARHGAP10, a novel human gene coding for a potentially cytoskeletal Rho-GTPase activating protein. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;294:579-585
15. Bigarella C, Borges L, Costa F, Saad S: ARHGAP21 modulates FAK activity and impairs glioblastoma cell migration. *Biochim Biophys Acta* 2009;1793:806-816
16. Sousa S, Cabanes D, Archambaud C, Colland F, Lemichez E, Popoff M, Boisson-Dupuis S, Gouin E, Lecuit M, Legrain P, Cossart P: ARHGAP10 is necessary for alpha-catenin recruitment at adherens junctions and for Listeria invasion. *Nat Cell Biol* 2005;7:954-960
17. Berra E, Díaz-Meco M, Lozano J, Frutos S, Municio M, Sánchez P, Sanz L, Moscat J: Evidence for a role of MEK and MAPK during signal transduction by protein kinase C zeta. *EMBO J* 1995;14:6157-6163
18. Borges L, Bigarella C, Baratti M, Crosara-Alberto D, Joazeiro P, Franchini K, Costa F, Saad S: ARHGAP21 associates with FAK and PKCzeta and is redistributed after cardiac pressure overload. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;374:641-646
19. Rorsman P, Eliasson L, Renström E, Gromada J, Barg S, Göpel S: The Cell Physiology of Biphasic Insulin Secretion. *News Physiol Sci* 2000;15:72-77
20. Bock J, Matern H, Peden A, Scheller R: A genomic perspective on membrane compartment organization. *Nature* 2001;409:839-841

21. McNew J, Parlati F, Fukuda R, Johnston R, Paz K, Paumet F, Söllner T, Rothman J: Compartmental specificity of cellular membrane fusion encoded in SNARE proteins. *Nature* 2000;407:153-159
22. Daniel S, Noda M, Cerione R, Sharp G: A link between Cdc42 and syntaxin is involved in mastoparan-stimulated insulin release. *Biochemistry* 2002;41:9663-9671
23. Rondas D, Tomas A, Halban PA: Focal adhesion remodeling is crucial for glucose-stimulated insulin secretion and involves activation of focal adhesion kinase and paxillin. *Diabetes* 2011;60:1146-1157
24. Nevins A, Thurmond D: Glucose regulates the cortical actin network through modulation of Cdc42 cycling to stimulate insulin secretion. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003;285:C698-710
25. Cox B, Natarajan M, Stettner M, Gladson C: New concepts regarding focal adhesion kinase promotion of cell migration and proliferation. *J Cell Biochem* 2006;99:35-52
26. Saleem S, Li J, Yee S, Fellows G, Goodyer C, Wang R: beta1 integrin/FAK/ERK signalling pathway is essential for human fetal islet cell differentiation and survival. *J Pathol* 2009;219:182-192
27. Hynes R: Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 2002;110:673-687
28. Schaller MD, Hildebrand JD, Shannon JD, Fox JW, Vines RR, Parsons JT: Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125FAK, directs SH2-dependent binding of pp60src. *Mol Cell Biol* 1994;14:1680-1688
29. Brunton VG, Avizienyte E, Fincham VJ, Serrels B, Metcalf CA, 3rd, Sawyer TK, Frame MC: Identification of Src-specific phosphorylation site on focal adhesion kinase: dissection of the role of Src SH2 and catalytic functions and their consequences for tumor cell behavior. *Cancer Res* 2005;65:1335-1342
30. Hirai T, Chida K: Protein kinase C zeta (PKCzeta): activation mechanisms and cellular functions. *J Biochem* 2003;133:1-7
31. Nakanishi H, Brewer K, Exton J: Activation of the zeta isozyme of protein kinase C by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem* 1993;268:13-16
32. Limatola C, Schaap D, Moolenaar W, van Blitterswijk W: Phosphatidic acid activation of protein kinase C-zeta overexpressed in COS cells: comparison with other protein kinase C isotypes and other acidic lipids. *Biochem J* 1994;304 (Pt 3):1001-1008
33. Müller G, Ayoub M, Storz P, Rennecke J, Fabbro D, Pfizenmaier K: PKC zeta is a molecular switch in signal transduction of TNF-alpha, bifunctionally regulated by ceramide and arachidonic acid. *EMBO J* 1995;14:1961-1969
34. Newton A: Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions. *Chem Rev* 2001;101:2353-2364
35. Hennige A, Fritsche A, Strack V, Weigert C, Mischak H, Borboni P, Renn W, Häring H, Kellerer M: PKC zeta enhances insulin-like growth factor 1-dependent mitogenic activity in the rat clonal beta cell line RIN 1046-38. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;290:85-90
36. Hehnly H, Xu W, Chen JL, Stamnes M: Cdc42 regulates microtubule-dependent Golgi positioning. *Traffic* 2010;11:1067-1078
37. Hehnly H, Longhini KM, Chen JL, Stamnes M: Retrograde Shiga toxin trafficking is regulated by ARHGAP21 and Cdc42. *Mol Biol Cell* 2009;20:4303-4312

ANEXO

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação de Mestrado/tese de Doutorado intitulada " ARHGAP21 inibe a secreção de insulina através da modulação da FAK, Cdc42 e PKCζ":

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

() CIBio – Comissão Interna de Biossegurança , projeto No. _____, Instituição:

(X) CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto No. projeto No. 1918-1, Instituição:
Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA/Unicamp.

() CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo No. _____, Instituição:

** Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*


Aluno: Sandra Mara Ferreira


Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Boschero

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura


Profa. Dra. ANA MARIA APARECIDA GUARALDO
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura