

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E  
MOLECULAR**

**FOSFODIESTERASE 2A FORMA UM COMPLEXO COM A  
CO-CHAPERONA XAP2 E REGULA O DESLOCAMENTO  
DO RECEPTOR ARIL HIDROCARBONETO PARA O NÚCLEO**

**SIMONE KÖBE DE OLIVEIRA**

**PORTO ALEGRE**

**2006**

**SIMONE KÖBE DE OLIVEIRA**

**FOSFODIESTERASE 2A FORMA UM COMPLEXO COM A  
CO-CHAPERONA XAP2 E REGULA O DESLOCAMENTO  
DO RECEPTOR ARIL HIDROCARBONETO PARA O NÚCLEO**

Tese apresentada como requisito à  
obtenção do título de doutora em  
Biologia Celular e Molecular, pelo  
programa de Pós-graduação em  
Biologia Celular e Molecular,  
Centro de Biotecnologia,  
Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul

**Orientadores:**

**Prof. Dr. Jorge Almeida Guimarães**

**Prof. Dr. Albert Smolenski**

**Porto Alegre  
2006**

Dedico este trabalho a toda minha família, especialmente às duas pessoas mais importantes da minha vida, minha mãe, Romilda Vieira Köbe e minha dinda, Rosanea Vieira Köbe, por todo apoio, compreensão e todo amor incondicional que elas sempre me dedicaram.

Meu querido tio Audizio, te dedico este trabalho, já que não pude desfrutar muito da tua companhia durante a tua vida aqui, mas mesmo longe eu sempre soube do teu amor e apoio.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Jorge Almeida Guimarães, pelo exemplo científico e pessoal e por sempre ter as palavras de conforto quando bate o medo da incerteza do futuro.

Ao meu co-orientador, Dr. Albert Smolenski, pela oportunidade, confiança e ensinamentos.

Aos professores Dra. Célia Carlini, Dr. Carlos Termignoni e Dra. Fabiana Horn pelos conhecimentos valiosos disponibilizados desde a minha iniciação científica.

Aos colegas e grandes amigos Alexandre José Macedo, Walter Beys, Lucélia Santi, Adriana Seixas, Renata Terra, Antônio Pinto, José Reck Júnior, Kátia Moura, Markus Berger e Andréia Estrela pela amizade e companheirismo.

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica Farmacológica do Grupo de Bioinformática Estrutural: Hermes Amorin, Cristina Russo, Fabiano Pasin e Camila Becker.

Aos demais amigos dos laboratórios 217 do Centro de Biotecnologia-UFRGS e 204 do Departamento de Biofísica-UFRGS, em especial German Wassermann, Deiber Severo e Diogo Demartini.

Aos demais colegas do Centro de Biotecnologia.

Aos colegas do Instituto de Bioquímica II da Uni-Frankfurt, em especial Oliver Danielewski, Olga Neumüller, Dra. Meike Hoffmeister, Pavel Riha, Debora Mascheroni, Metello Innocenti, Dalu Xu, Birgit Lipke e Milena Klumbies por toda ajuda científica e burocrática durante todo o período que passei na Alemanha.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM).

Aos secretários do PPGBCM, Silvia Centeno e Luciano Saucedo pela competência e paciência diante da incomodação de tantos alunos.

Ao professor Guido Lenz pela revisão deste trabalho.

Aos professores Robson Monteiro de Queiroz, Jamil Assreuy, Guido Lenz e Rafael Roesler por aceitarem gentilmente o convite pra comporem a banca julgadora desse trabalho.

Às minhas grandes amigas Tais Zago, Viviane Krucinski, Jacqueline Barreto, Betina Mattevi, Clarissa Perez Pereira e Janaina Gomes pelo companheirismo, amizade e compreensão.

À minha família pelo suporte e apoio necessários, além da infinita compreensão pela minha ausência durante todo período da minha pós-graduação.

A todas as pessoas que de alguma forma estiveram envolvidas neste trabalho e que não foram diretamente citadas, meus sinceros agradecimentos.

**“Todo mundo é um cientista maluco e a vida é o laboratório. A gente está sempre experimentando, tentando achar um jeito de viver, de resolver os problemas, de se livrar da loucura e do caos.”**

**(David Cronenberg, cineasta canadense)**

**“Liberdade... Liberdade para pensar, liberdade para agir, liberdade para criar. Qualquer um de vocês, qualquer pessoa, pode portar o germe, a semente de um conhecimento extraordinário, capaz de revolucionar o mundo e adiantar a história. Mas a semente precisa de condições adequadas no solo para brotar e desenvolver-se.”**

**(Albert Einstein)**

## RESUMO

As fosfodiesterases do tipo 2A (PDE2A) hidrolisam os nucleotídeos cíclicos cAMP e cGMP e por isso desempenham papel importante na sinalização intracelular. PDE2A é composta por uma região N-terminal, que ao contrário de outras famílias de PDEs, não possui função conhecida, dois domínios regulatórios, GAF A e GAF B, e um domínio catalítico localizado na porção C-terminal. Sabe-se que a hidrólise dos nucleotídeos cíclicos, pela PDE2A, é ativada pela ligação de cGMP ao domínio regulatório GAF B. Em uma triagem dois híbridos, identificamos XAP2 como a principal proteína interatora de PDE2A. XAP2 é um componente crucial do complexo multiprotéico do receptor Aril hidrocarboneto (Ahr), o principal fator de transcrição que controla a expressão de múltiplos genes envolvidos em detoxificação. Neste trabalho, foi determinado que XAP2 liga o domínio GAF B da enzima PDE2A. Ensaio de atividade fosfodiesterásica, utilizando proteínas purificadas, mostram que a ligação de XAP2 não interfere na atividade enzimática de PDE2A. Para analisar se PDE2A afeta a função de XAP2, foi investigado o deslocamento de Ahr para o núcleo. Sabe-se que a regulação da expressão dos genes alvos de Ah é iniciada pela ligação de tetraclorodibenzodioxina (TCDD) e por uma via, ainda pouco entendida, dependente de cAMP. Verificamos que a ligação de PDE2A à XAP2 inibe o deslocamento de Ahr para o núcleo, induzido por TCDD e por cAMP em células hepáticas Hepa1c1c7 em cultura. Em conclusão, mostramos neste trabalho que XAP2 recruta PDE2A para o complexo Ahr, causando a inibição da mobilidade de Ahr, possivelmente pela redução local da concentração de cAMP. Esses dados suportam o papel de cAMP no controle da função de Ahr.

## ABSTRACT

Phosphodiesterase type 2A (PDE2A) hydrolyzes cyclic nucleotides cAMP and cGMP thus efficiently controlling cNMP-dependent signaling pathways. PDE2A is composed of an N-terminal region, two regulatory GAF domains and a catalytic domain. Cyclic nucleotide hydrolysis is known to be activated by cGMP binding to GAF-B, however, other mechanisms may operate to fine-tune local cyclic nucleotide levels. In a yeast-two-hybrid screening we identified XAP2, a crucial component of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) complex, as a major PDE2A-interacting protein. We mapped the XAP2 binding site to the GAF-B domain of PDE2A. PDE assays with purified proteins showed that XAP2 binding does not change the enzymatic activity of PDE2A. To analyze if PDE2A could affect the function of XAP2 we studied nuclear translocation of AhR, i.e. the master transcription factor controlling the expression of multiple detoxification genes. Notably, regulation of AhR target gene expression is initiated by tetrachlorodibenzodioxin (TCDD) binding to AhR and by a poorly understood cAMP-dependent pathway, followed by the translocation of AhR from the cytosol into the nucleus. Binding of PDE2A to XAP2 inhibited TCDD- and cAMP-induced nuclear translocation of AhR in Hepa1c1c7 hepatocytes. We conclude that XAP2 targets PDE2A to the AhR complex thereby restricting AhR mobility, possibly by a local reduction of cAMP levels. Our results provide first insights into the elusive cAMP-dependent regulation of AhR.



## ÍNDICE

<b>APRESENTAÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>15</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
1.1 Os Nucleotídeos Cíclicos.....	17
1.2 As Fosfodiesterases.....	20
1.2.1 PDEs como Reguladores Fisiológicos e Alvos Terapêuticos.....	23
1.2.2 Fosfodiesterase 2A (PDE2A).....	26
1.3 XAP2 e a via do Receptor Aril Hidrocarboneto.....	29
1.3.1 A proteína XAP2.....	29
1.3.2 A Via do Receptor Aril Hidrocarboneto (Ahr).....	32
<b>2. OBJETIVOS DO TRABALHO.....</b>	<b>39</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>40</b>
3.1 Materiais.....	40
3.1.1 Cepa de Bactérias, Leveduras e Linhagens Celulares.....	40
3.1.2 Vetores, Plasmídeos e cDNAs.....	40
3.1.3 Oligonucleotídeos.....	41
3.1.4 Enzimas e Proteínas.....	42
3.1.5 Anticorpos.....	42
3.1.5.1 Anticorpos Primários.....	42
3.1.5.2 Anticorpos Secundários.....	43
3.1.6 Kits para isolar DNA .....	44
3.1.7 Kits Especiais.....	44
3.1.8 Substâncias químicas e reagentes especiais.....	44
3.1.9 Meios, Soluções e Reagentes Especiais para Cultura de Células.....	45
3.1.10 Meios, Soluções e Reagentes Especiais para a Triagem Dois-Híbridos.....	45
<b>3.2 Métodos:</b> .....	<b>47</b>
3.2.1 Métodos de Biologia Molecular.....	47
3.2.1.1 Eletroforese em Gel de Agarose para Análise de DNA.....	47
3.2.1.2 Reação de PCR.....	47
3.2.1.3 Clonagem dos Fragmentos de cDNA.....	48
3.2.1.4 Preparação das Construções que codificam N-PDE2A, GAF A, GAF A/B e GAF B.....	49
3.2.1.5 Sistema Dois-Híbridos em Levedura.....	49
3.2.1.5.1 Transformação das Leveduras <i>S.</i> <i>Cerevisae</i> com o híbrido BD-PDE2A.....	51
3.2.1.5.2 Teste de Autoativação.....	52

3.2.1.5.3	Transformação das Leveduras <i>S. Cerevisiae</i> com o híbrido AD-biblioteca de cDNA de cérebro humano.....	53
3.2.1.5.4	Extração de DNA das Leveduras.....	53
3.2.1.5.5	Transformação de bactérias <i>E coli</i> eletro-competentes.....	54
3.2.1.5.6	Retrasformação de Leveduras contendo o plasmídeo BD- PDE2A com plasmídeo AD isolado de bactérias <i>E.coli</i> .....	54
3.2.1.5.7	Análise Bioinformática.....	55
3.2.1.5.8	Seleção dos clones positivos ao final da triagem dois híbridos.....	55
3.2.2	Métodos de Biologia Celular.....	56
3.2.2.1	Transfecção de Células COS-1.....	56
3.2.2.2	Transfecção de Células T-REx™-Hela.....	56
3.2.2.3	Transfecção de Células Hepa1c1c7.....	57
3.2.3	Métodos Bioquímicos.....	57
3.2.3.1	Expressão das proteínas fusionadas a GST.....	57
3.2.3.1.1	Purificação das proteínas fusionadas a GST em Resina Glutathiona-sepharose.....	58
3.2.3.2	Ensaio GST <i>Pull-down</i> .....	59
3.2.3.3	Ensaio de Co-imunoprecipitação.....	59
3.2.3.4	Ensaio de Atividade Fosfodiesterásica.....	60
3.2.3.5	Ensaio de Fosforilação <i>in vitro</i> por PKA e PKG.....	61
3.2.4	Métodos Microscópicos.....	62
3.2.4.1	Ensaio de colocalização entre PDE2A e XAP2 em Células Hela.....	62
3.2.4.2	Ensaio de Migração de Ahr para o Núcleo em Células Hepa1c1c7.....	62
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>64</b>
4.1	Triagem Dois-Híbridos em leveduras para Identificação de Interatores da PDE2A.....	64
4.2	Ensaio GST <i>Pull-down</i> com as proteínas identificadas na triagem dois-híbridos em leveduras.....	66
4.3	Interação de PDE2A/HRS e PDE2A/XAP2 em células COS-1 intactas.....	68
4.4	Interação de PDE2A com XAP2 endógeno.....	68
4.5	Co-localização de PDE2A e XAP2 Células Hela.....	70
4.6	A região contendo o domínio GAF B da PDE2A é responsável pela ligação com XAP2.....	71
4.7	Influência de cGMP na interação entre PDE2A e XAP2.....	72
4.8	Ligação de PDE2A à região C-terminal de XAP2.....	74

4.9 PDE2A faz parte do complexo Ahr.....	76
4.10 Influência de XAP2 na atividade catalítica de PDE2A.....	78
4.11 Influência de PDE2A no deslocamento do complexo Ahr para o núcleo.....	78
4.12 Fosforilação de Ahr por PKA ou PKG.....	82
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>84</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>91</b>
<b>7. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>92</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>93</b>
<b>9. ANEXOS.....</b>	<b>101</b>
9.1 <i>Curriculum Vitae</i> .....	102
9.2 Manuscrito submetido ao periódico The Journal of Biological Chemistry.....	106

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

<b>Figura 1:</b> Diagrama esquemático mostrando as vias de sinalização de cAMP.....	18
<b>Figura 2:</b> Estrutura modular das PDEs.....	22
<b>Figura 3:</b> As PDEs e a intercomunicação entre diferentes vias de sinalização.....	24
<b>Figura 4:</b> Desenho esquemático da rede de PDEs responsáveis pelo controle da concentração de cAMP e cGMP em plaquetas humanas.....	24
<b>Figura 5:</b> Estrutura dos domínios GAF A e B da PDE2A de camundongo.....	28
<b>Figura 6:</b> Desenho esquemático da estrutura dos domínios de XAP2.	30
<b>Figura 7:</b> Desenho esquemático da estrutura dos domínios de Ahr.....	34
<b>Figura 8:</b> Modelo da via de sinalização de Ahr.....	36
<b>Figura 9:</b> O sistema dois-híbridos mostrado em esquema.....	54
<b>Figura 10:</b> Triagem Y2H.....	65
<b>Figura 11:</b> Ensaio GST <i>Pull-down</i> com as proteínas identificadas na triagem dois-híbridos.....	67
<b>Figura 12:</b> Ensaio de Co-imunoprecipitação entre PDE2A/XAP2.....	69
<b>Figura 13:</b> Ensaio de Co-imunoprecipitação entre PDE2A/HRS.....	69
<b>Figura 14:</b> Ensaio de Co-imunoprecipitação entre PDE2A e XAP2 endógeno.....	70
<b>Figure 15:</b> Ensaio de co-localização entre PDE2A e XAP2 em Células Hela.....	71
<b>Figura 16:</b> A região contendo o domínio GAF B da PDE2A é responsável pela ligação com XAP2. ....	73
<b>Figura 17:</b> A interação entre PDE2A e XAP2 não é influenciada pelo aumento na concentração de cGMP.....	74
<b>Figura 18:</b> PDE2A liga à região C-terminal de XAP2.....	75
<b>Figura 19:</b> PDE2A liga hsp90.....	76
<b>Figura 20:</b> PDE2A faz parte do complexo Ahr.....	77
<b>Figura 21:</b> XAP2 não interfere com a atividade catalítica de PDE2A.....	79
<b>Figura 22:</b> Localização celular de Ahr em células expressando PDE2A.....	81
<b>Figura 23:</b> Ahr não é fosforilado por quinases reguladas por nucleotídeos cíclicos (PKA e PKG).....	83

<b>Tabela 1:</b> Diferentes propriedades das famílias distintas de PDE.....	21
<b>Tabela 2:</b> Resultados da triagem dois-híbridos utilizando PDE2A como “isca” .....	65
<b>Tabela 3:</b> Proteínas identificadas na triagem dois-híbridos.....	66
<b>Tabela 4:</b> Avaliação quantitativa da inibição do deslocamento de Ahr em células expressando PDE2A.....	82

## APRESENTAÇÃO

A Tese Doutorado aqui apresentada é fruto de um trabalho desenvolvido pela parceria entre os grupos de Bioquímica Farmacológica (Centro de Biotecnologia, UFRGS) e o grupo de Sinalização Plaquetária (Instituto de Bioquímica II, Universidade de Frankfurt), sob a orientação e supervisão do prof. Dr Jorge Almeida Guimarães e prof. Dr. Albert Smolenski.

Ainda graduanda do curso de Ciências Farmacêuticas na UFRGS, iniciei minha trajetória científica como estudante de iniciação científica no laboratório de peptídeos e enzimas proteolíticas do Centro de Biotecnologia da UFRGS, sob a orientação do prof. Dr. Carlos Termignoni. Trabalhei durante a iniciação científica e na minha tese de mestrado na linha de pesquisa de anti-coagulantes presente na saliva do carrapato hematófago *Boophilus microplus*.

Durante o estágio de doutorado-sanduiche ingressei na linha de pesquisa em biologia celular, com enfoque em sinalização celular, trabalho que rendeu a presente tese de doutorado. O projeto inicial propunha a realização de uma triagem dois híbridos, utilizando como proteína “isca” a enzima fosfodiesterase A2 (PDE2A), com o objetivo de identificar proteínas interatoras da enzima PDE2A envolvidas na compartimentalização subcelular de componentes da via de sinalização dos nucleotídeos cíclicos ou proteínas interatoras da enzima PDE2A envolvidas na regulação de processos funcionais em plaquetas. No entanto, o resultado da triagem dois híbridos direcionou este trabalho para o sistema de detoxificação, que envolve complexos multiprotéicos responsáveis pela regulação da expressão de genes que codificam enzimas de metabolização e detoxificação.

## ABREVIATURAS

Ao longo do trabalho e em algumas figuras, palavras foram mantidas no idioma original inglês. A lista de abreviaturas a seguir contém a tradução de palavras contidas no texto. A tradução de palavras contidas em figuras estará na legenda.

AC: adenilil ciclase

AD: *activation domain*. Domínio de ativação

AhRR: Ahr repressor

ANP: *atrial natriuretic peptide*. peptídeo natriurético secretado pelo átrio

AKAP: *A kinase anchor protein*. Proteína ancoradora de proteína quinase A.

ARNT: *Ahr nuclear translocator*. Proteína de transporte nuclear do Ahr

ATP: adenosina tri-fosfato

$\beta$ -AR: Receptor  $\beta$ -adrenérgico

BD: *binding domain*. Domínio de ligação

cAMP: adenosina mono-fosfato cíclica

cGMP: guanosina mono-fosfato cíclica

CNG: *cyclic nucleotide gated channels*. canais iônicos dependentes de nucleotídeos cíclicos

DRE: *Dioxin regulatory elements*. Sequências regulatórias de dioxinas.

DTT: 1,4-ditiotreitol

EPACs: *Exchange protein directly activated by cAMP*. Proteína de troca de nucleotídeo de guanina diretamente ativada por cAMP

FCS: Soro Fetal Bovino

GC: guanilato ciclase

GDP: guanosina di-fosfato

GTP: guanosina tri-fosfato

HAH: hidrocarboneto aromático halogenado

IL-2: Interleucina 2

PBS: Tampão fosfato salina

PDE2A: fosfodiesterase 2A

PKA: proteína-quinase dependente de cAMP

PKG: proteína-quinase dependente de cGMP

IF: Imunofluorescência

IP: Imunoprecipitação

IPTG: isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranoside

NOS: Óxido nítrico sintase

PAH: hidrocarboneto aromático policíclico não halogenado

PMSF: Fenilmetilsulfonilfluoride

TCDD: 2,3,7,8 Tetraclorodibenzo-p-dioxina

TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral- $\alpha$

WB: *western blot*. Imunodeteção

XRE: *xenobiotics regulatory elements*. Sequências regulatórias de xenobióticos.

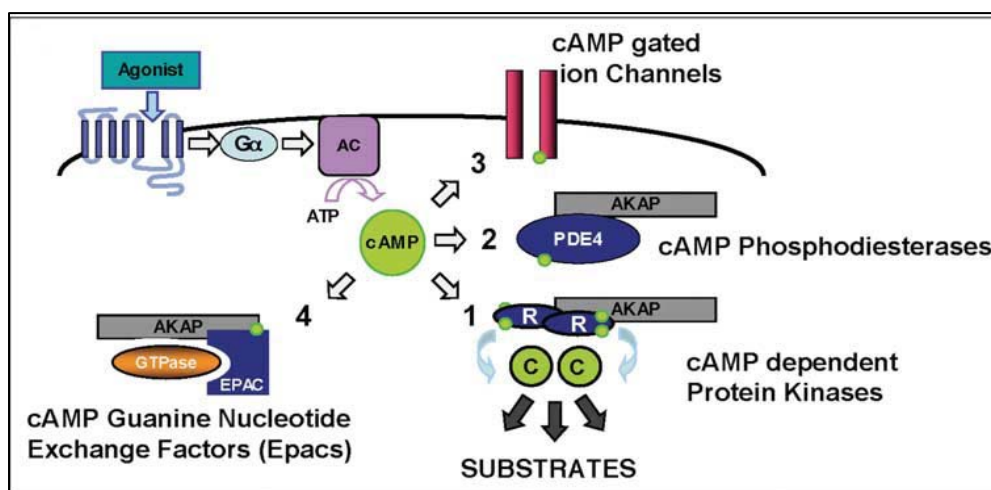


# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Os Nucleotídeos Cíclicos

O AMP cíclico (cAMP) foi identificado como um mediador intracelular em 1950. Desde que foi identificado, cAMP tem sido relacionado a uma ampla variedade de processos biológicos como contração do músculo cardíaco, agregação plaquetária, lipólise, glicogenólise, contração do músculo liso, condutância de canais iônicos e apoptose (Iffland et al, 2005). Na fisiologia celular o cAMP atua como importante mensageiro intracelular, sendo sua formação contínua garantida pela ação da enzima adenilato ciclase (AC) sobre ATP, junto à membrana plasmática. A ativação da AC ocorre como consequência da interação de hormônios, neurotransmissores ou outros agonistas, com receptores específicos acoplados ao complexo multiprotéico da proteína G. A subunidade  $G_{\alpha}$  da proteína G se dissocia do complexo e estimula a AC a catalisar a conversão de ATP em cAMP. O cAMP recém formado ativa proteínas efetoras intracelulares específicas. A principal proteína efetora é uma haloenzima chamada proteína quinase dependente de cAMP (PKA), um tetrâmero com duas subunidades regulatórias e duas subunidades catalíticas. A ligação de cAMP às subunidades regulatórias induz uma mudança conformacional, causando a dissociação das subunidades regulatórias, liberando, dessa forma, a atividade quinase das subunidades catalíticas. A subunidade catalítica ativada, fosforila proteínas-alvo no citoplasma ou pode migrar para o núcleo onde fosforila proteínas que regulam a expressão gênica. As células de mamíferos possuem pelo menos dois tipos de PKAs: tipo I, encontrada principalmente no citosol; e tipo II, ligada às membrana plasmática, membrana nuclear, membrana externa da mitocôndria e microtúbulos (Alberts, 2002). Além de PKA existem outros alvos intracelulares pelo qual cAMP exerce seus efeitos celulares, como canais iônicos dependente de nucleotídeos cíclicos e mais recentemente foram

identificadas as proteínas EPACs (*Exchange protein directly activated by cAMP*), que consistem de um domínio de ligação à cAMP fusionado ao fator de troca de nucleotídeos de guanina (GEF). Essa formação permite que cAMP module a troca de nucleotídeos de guanina (GDP e GTP) na GTPase Rap1 (Bailliea et al, 2005, Zaccolo et al, 2006). A figura 1 mostra um desenho esquemático dos componentes envolvidos na formação de cAMP e as proteínas efetoras, alvo do nucleotídeo cíclico.



**Figura 1: Diagrama esquemático mostrando as vias de sinalização de cAMP.** O cAMP recém formado pode ser utilizado por: (1) PKA; (2) cAMP-fosfodiesterases; (3) canais iônicos dependentes de nucleotídeo cíclicos; (4) EPACs. *Substrates*: substrato, *cAMP gated ion channels*: canais iônicos dependentes de cAMP, *Phosphodiesterase*: fosfodiesterase, *Agonist*: agonista e *cAMP guanine nucleotide exchange factors*: fatores trocadores de nucleotídeos de guanina dependentes de cAMP. Fonte: Baillie et al, 2005.

A especificidade de ação de cAMP é condicionada pela organização tridimensional das proteínas envolvidas na via de sinalização dentro da célula. De fato, a noção da ação localizada de cAMP foi primeiro descrita em 1983, com a observação de que diferentes receptores acoplados à proteína G podem ativar seletivamente os subtipos I e II da haloenzima PKA em cardiomiócitos (Buxton et al, 1983). Essa hipótese foi consolidada com a descoberta das

AKAPs (proteínas ancoradoras de PKA) que posicionam PKA em localizações subcelulares distintas em resposta ao aumento da concentração local de cAMP (Bailliea et al, 2005, Zaccolo et al, 2006). Estudos recentes com fosfodiesterases (PDEs) mostram uma proposta ainda mais sofisticada para o modelo de compartimentalização dos componentes da sinalização por cAMP. A ação combinada e localizada da adenilato ciclase, PKA e fosfodiesterases criam microdomínios de cAMP. Assim, uma rede de sinalização, que reúne enzimas ativadas por cAMP e aquelas que degradam cAMP é uma engenhosa maneira de controle espacial e temporal da sinalização por PKA. As AKAPs também contribuem para a especificidade da sinalização recrutando outras proteínas regulatórias, como fosfatases, proteína-quinases e proteínas efetoras de proteína G. Esses complexos fortalecem a intercomunicação entre as vias de sinalização e possibilitam um mecanismo de expansão dos limites dos processos influenciados por cAMP (Perry et al, 2002 e Bailliea et al, 2005).

A síntese de cGMP é controlada por dois tipos de enzimas guanilato ciclase (GCs) que diferem em sua localização subcelular e ativação por ligantes específicos: uma GC particulada (pGC), presente na membrana plasmática e ativada pelos peptídeos natriuréticos como o peptídeo natriurético atrial (ANP), o peptídeo natriurético cerebral (BNP) e o peptídeo natriurético tipo C (CNP); e uma GC solúvel (sGC) presente no citosol e ativada por óxido nítrico (NO). A ligação do agonista diretamente à GC estimula a enzima a produzir cGMP a partir de GTP. O cGMP sintetizado liga e ativa a proteína quinase dependente de cGMP (PKG), que fosforila proteínas substratos como canais iônicos, proteínas envolvidas na contração do músculo liso e fatores de transcrição que regulam funções celulares-chave (Jeon et al, 2005). Os peptídeos natriuréticos são uma família de peptídeos secretados, estruturalmente relacionados, que regulam o balanço entre sais e água, resultando na ação vasodilatadora. Células cardíacas musculares do átrio secretam ANP quando a pressão sanguínea aumenta. ANP, por sua vez, estimula células renais a secretar  $\text{Na}^+$  e água e induz o relaxamento das células

do músculo liso dos vasos sanguíneos causando a vasodilatação e redução da pressão arterial (Fischmeister et al, 2006).

## 1.2 As Fosfodiesterases

As fosfodiesterases (PDEs; EC 3.1.4.1) são metalofosfohidrolases ( $Mg^{2+}$  ou  $Zn^{2+}$ ) que catalisam a hidrólise dos nucleotídeos cíclicos, cAMP e/ou cGMP gerando os correspondentes nucleotídeos AMP e GMP, dessa forma terminalizando a via de sinalização dos nucleotídeos cíclicos. As PDEs agem em conjunto com as enzimas responsáveis pela síntese dos nucleotídeos cíclicos, AC e GC, no controle da amplitude e da duração da sinalização celular mediada pelos nucleotídeos cíclicos.

Até o momento, as PDEs de mamíferos são subdivididas em 11 famílias diferentes, tomando como base a seqüência primária de amino ácidos, a organização de domínios regulatórios e as características catalíticas e regulatórias. Cada família de PDE contém múltiplos genes que através de processamento alternativo de mRNA gera em torno de 50 isoenzimas distintas (Beavo et al, 1994, Maurice et al, 2003). Um sistema de nomenclatura permite a identificação das PDEs. Por exemplo “HSPDE4D3” identifica a enzima humana (HS, *Homo sapiens*) da família PDE4 codificada pelo gene D, variante de processamento de mRNA número 3 (Beavo et al, 1994).

A tabela 1 mostra as diferentes famílias de PDEs e as características bioquímicas próprias de cada uma delas, como especificidade à substratos, susceptibilidade a inibidores, número de genes que codificam a família e componentes regulatórios.

As PDEs possuem diferentes especificidades e afinidades aos nucleotídeos cíclicos, seus substratos, sendo que as enzimas PDE4, -7 e -8 hidrolisam especificamente cAMP; as enzimas PDE5, -6 e -9 hidrolisam especificamente cGMP; enquanto que as PDE1, -2, -3, -10 e -11 hidrolisam

cAMP e cGMP (Maurice et al, 2003 e Jeon et al, 2005). Além disso, as PDEs possuem características regulatórias diferentes, sendo que algumas delas são ativadas ou inibidas pelos próprios nucleotídeos cíclicos. Por exemplo, PDE1 é ativada pela ligação de Ca<sup>2+</sup>/calmodulina, PDE2 e -5 são ativadas por cGMP, PDE3 e -6 são inibidas por cGMP enquanto que PDE10 é inibida por cAMP.

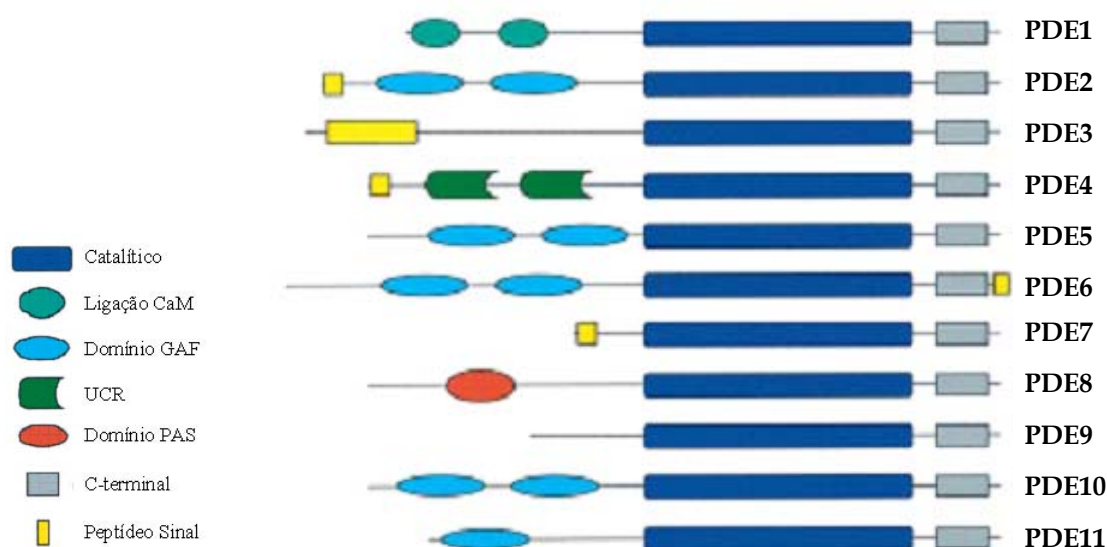
Tabela 1: Diferentes propriedades das famílias distintas de PDE.

Família PDE	Substrato(s)	Inibidores (Ki)	No de genes	Regulação
PDE1	cAMP e cGMP	Vimocetina (14 µM), W-7 (300 µM)	3	(+) Ca <sup>2+</sup> /CaM (-) PKA
PDE2	cAMP e cGMP	EHNA (1 µM)	1	(+) cGMP
PDE3	cAMP>cGMP	Cilostamide (20 nM), milrinone (150 nM), zardaverine (IC50 0,5-2 µM)	2	(+) PKA, PKB (-) cGMP
PDE4	cAMP	Rolipran (1 µM), piclamilast (1 nM), zardaverine (IC50 0,8-4 µM)	4	(+) PKA, ERK (-) caspases
PDE5	cGMP	Zaprinast (130 nM), sildenafil (10 nM), tadalafil (10 nM)	1	(+) cGMP, PKG, PKA (-) caspases
PDE6	cGMP	Zaprinast (400 nM), sildenafil (50 nM), dipiridamole (125 nM)	3	(+) transducina (-) cGMP
PDE7	cAMP	IBMX (4 µM), dipiridamole (600 nM)	2	(+/-) PKA
PDE8	cAMP	Dipiridamole (9 µM)	2	Domínios PAS
PDE9	cGMP	Zaprinast (35 µM)	1	
PDE10	cAMP<cGMP	Dipiridamole (1 µM)	1	(-) cAMP
PDE11	cAMP e cGMP	Zaprinast (12 µM), tadalafil (60 µM), dipiridamole (0,4 µM)	1	

Fonte: modificada de Maurice et al, 2003

Todas as fosfodiesterases possuem uma arquitetura modular, com um núcleo catalítico altamente conservado, de aproximadamente 270 aminoácidos (em torno de 50% de identidade de seqüência primária entre as PDEs distintas da mesma espécie), localizado na porção C-terminal e domínios regulatórios localizados na região N-terminal (Figura 2) (Conti, 2000, Maurice et al, 2003, Rybalkin et al, 2003).

A região N-terminal possui função regulatória em várias famílias de PDEs. Por exemplo, PDE1 contém na região N-terminal um domínio de ligação à calmodulina; PDE2 contém uma região alostérica de ligação à cGMP; as PDE1, -3, -4 e -5 possuem sítios de fosforilação para várias proteínas quinases e a PDE6 possui um domínio de ligação à transducina. A região N-terminal de algumas PDEs também contém um domínio de direcionamento à membrana, importante na determinação da compartimentalização celular e funcional. As funções específicas da região C-terminal ainda não estão claras (Torphy, 1998).

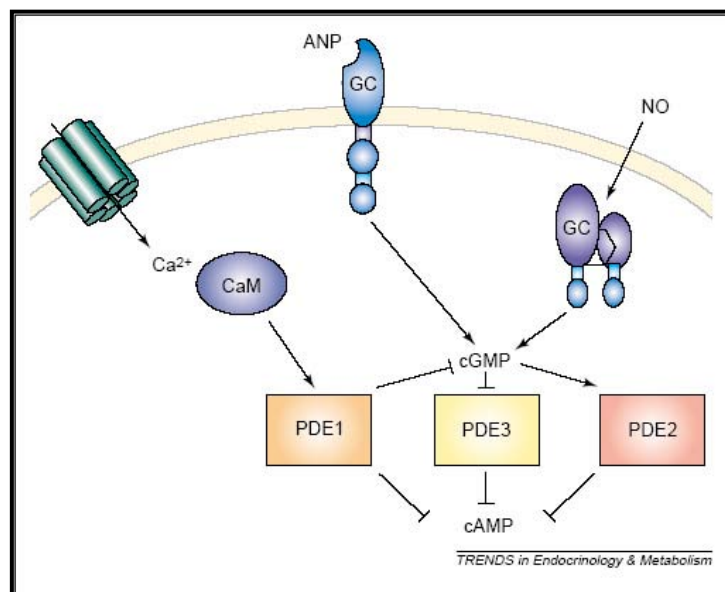


**Figura 2: Estrutura modular das PDEs.** Representação esquemática dos domínios das 11 famílias de PDEs identificadas em mamíferos. CaM: domínio de ligação à calmodulina; GAF: domínio inicialmente encontrado nas proteínas cGMP-fosfodiesterases, Adenilato ciclase e Fh1A; UCR: *upstream conserved region*; PAS: domínio inicialmente encontrado nas proteínas Per/ARNT/Sim. Fonte: Conti, 2000.

### 1.2.1 PDEs como Reguladores Fisiológicos e Alvos Terapêuticos

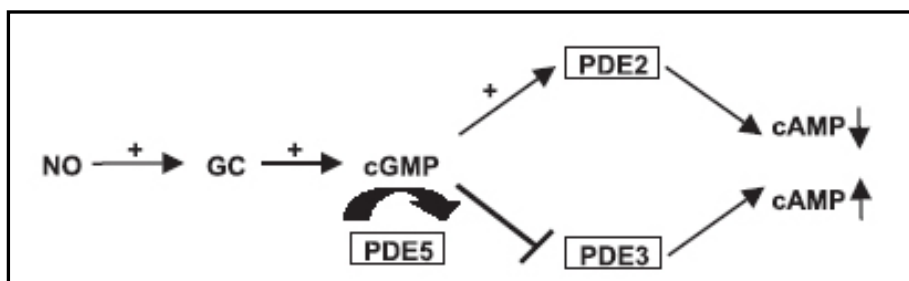
Como já relatado, os nucleotídeos cíclicos estão envolvidos em uma grande variedade de processos fisiopatológicos. Conseqüentemente, a concentração tanto de cAMP como de cGMP é finamente regulada, resultando em um balanceamento de ações entre as enzimas que sintetizam (AC e GC) e as enzimas que degradam (PDEs) ambos os nucleotídeos. Além disso, a presença de sítios alostéricos de ligação aos nucleotídeos cíclicos nas PDEs contribuem para a integração das vias de sinalização por cAMP e por cGMP.

Dentre os processos fisiopatológicos regulados pelos nucleotídeos cíclicos encontra-se a secreção de renina pelas células glomerulares renais. Nessas células, NO ativa GC solúvel causando aumento na concentração de cGMP. O aumento na concentração de cGMP leva à inibição da PDE3 e consequente elevação da concentração de cAMP, ativação de PKA e estimulação da secreção de renina. Além da modulação da secreção de renina, a intercomunicação entre as vias dos nucleotídeos cíclicos pode estar envolvida no mecanismo de controle da liberação de insulina dependente de glicose. Em células  $\beta$  pancreáticas, o metabolismo oxidativo da glicose leva ao aumento da concentração de  $Ca^{2+}$ , causando a ativação de PDE1 e diminuição da concentração de cAMP, resultando na redução da secreção de insulina (Mehats et al, 2002). A figura 3 resume alguns eventos de intercomunicação entre as vias de sinalização dos nucleotídeos cíclicos.



**Figura 3: As PDEs e a intercomunicação entre diferentes vias de sinalização.** Fonte: Mehats et al, 2002.

Em plaquetas, as isoformas PDE 2, -3 e -5 são altamente expressas, formando uma rede para o controle dos níveis de cGMP e cAMP, como mostra a figura 4. NO estimula a GC citosólica a sintetizar cGMP que é substrato para hidrólise por PDE5. Paralelamente, cGMP é ativador da PDE2 (estimulando a hidólise de cAMP) e inibidor da PDE3 (inibindo a hidólise de cAMP) (Dunkern and Hatzelmann, 2005).



**Figura 4: Desenho esquemático da rede de PDEs responsáveis pelo controle da concentração de cAMP e cGMP em plaquetas humanas.** Fonte: Dunkern and Hatzelmann, 2005)



Os avanços recentes nos estudos da farmacologia molecular das enzimas PDEs dão suporte à expectativa na aplicação de inibidores de PDEs para o tratamento de várias patologias. Assim, no caso da isoenzima PDE4, que é altamente expressa em células da resposta imune e inflamatória, seus inibidores cilomilast (Ariflo<sup>®</sup>, Glaxo Smith Kline) e roflumilast (Altana AG) já estão em triagem clínica para o manejo da inflamação característica de doenças inflamatórias do trato respiratório, como a asma e a DPOC (Chung, 2006). Além disso, o efeito antiinflamatório do inibidor de PDE4 rolipran (Korantin<sup>®</sup>, BASF) tem sido testado com sucesso em modelos animais de artrite reumatóide (Dyke and Montana, 1999).

A importância fisiológica de PDE5 na manutenção do tônus da musculatura lisa vascular tem sido demonstrada no tratamento da disfunção erétil pelo uso clínico dos inibidores específicos de PDE5, sildenafil (Viagra<sup>®</sup>, Pfizer), verdenafil (Levitra<sup>®</sup>, Bayer) e tadalafil (Cialis<sup>®</sup>, Lilly Icos). A inibição da PDE5 resulta na elevação da concentração de cGMP com consequente relaxamento da musculatura lisa vascular peniana (Ballard et al, 1998).

Inibidores de PDE3, como Pimobendan (Boehringer Ingelheim), Milrinone (SterlingWinthrop) e Anagrelide (Bristol-Myers Squibb), podem ser benéficos em tratamentos, a curto prazo, em pacientes com cardiomiopatias cuja contratilidade cardíaca está enfraquecida a ponto de causar choque cardiogênico ou hipotensão. No entanto, o tratamento a longo prazo não é efetivo em reverter as características patológicas da cardiomiopatia dilatada e o risco de morte dos pacientes em tratamento é aumentado. As causas específicas do aumento da mortalidade em pacientes tratados com inibidores de PDE3 a longo prazo ainda não foi estabelecida (Movsesian et al, 2002).

O inibidor de PDE1 vinpocetina (Richter Gedeon) foi desenvolvido, mostrando potente ação vasodilatadora e ação terapêutica no tratamento de doenças cerebrovasculares, no entanto foi retirado do mercado pela baixa eficácia observada em um estudo duplo-cego e pela presença de efeitos colaterais, como tontura. Mais tarde percebeu-se a inespecificidade do

composto, sendo ativo também contra PDE5. Esforços estão sendo feitos para o desenvolvimento de inibidores específicos contra a isoforma PDE1C, já que a inibição da isoenzima usando oligonucleotídeos antisense, suprime a proliferação de células do músculo liso de arteria com lesões arterosclerótica, além disso a isoenzima PDE1C está ausente em células musculares lisa de artérias normais (Rybalkin et al, 2002).

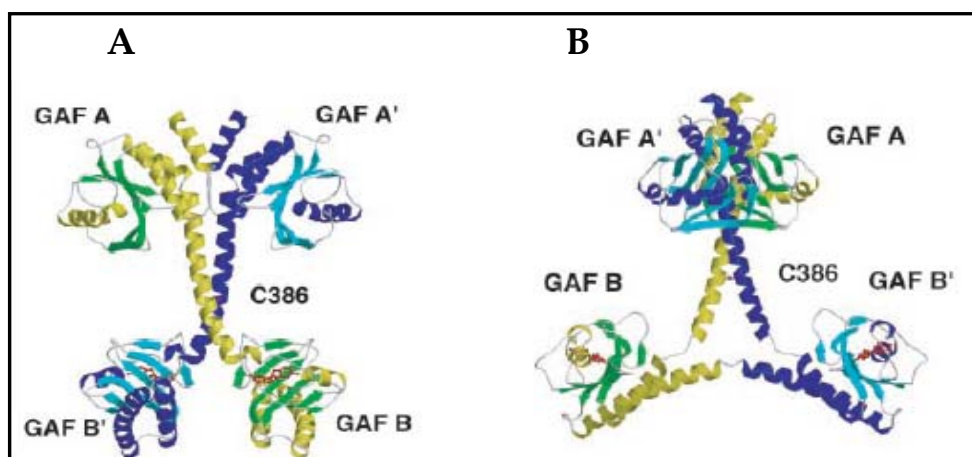
Existem ainda sete outras PDEs (PDE2, -6, -7, -8, -9, -10 e -11). Muito se sabe sobre a estrutura e função dessas enzimas, sua distribuição subcelular e controle. Elas têm sido estudadas como potencial alvo terapêutico em numerosas anormalidades fisiológicas, como por exemplo, inibidores de PDE2 e PDE9 têm sido estudados pela Bayer para terapia do déficit cognitivo. O grande sucesso comercial do inibidor de PDE5, o Viagra, apontou para o otimismo no conceito de terapia baseada na inibição de PDEs. O desenvolvimento de novos compostos inibidores contribuirá para o desenvolvimento de novas drogas para a terapia de muitas patologias importantes para a saúde pública (Jeon et al, 2005).

### **1.2.2 Fosfodiesterase 2A (PDE2A)**

Um único gene codifica a síntese de três isoformas de PDE2 (2A, 2B e 2C) que resultam da variação de processamento do mRNA (Tabela 1). Apenas uma variante de processamento de mRNA foi encontrada em humanos, homóloga à PDE2A3 de bovinos. A enzima PDE2A humana é um homodímero de massa molecular de aproximadamente 213 kDa e também é conhecida por PDE estimulada por cGMP (PDE cGMP-estimulada). Cada monômero da PDE2A contém um domínio N-terminal de função desconhecida, dois domínios GAF seguido um do outro (GAF A e GAF B) e um domínio catalítico C-terminal (Figura 2). Elas são capazes de hidrolisar cAMP e cGMP, com Km aparente levemente menor para cGMP. No entanto,

quando cGMP liga ao domínio GAF B, a enzima sofre uma mudança conformacional que resulta em Km aparente 10 vezes menor para cAMP (Iffland et al, 2005).

Os domínios GAF representam uma das maiores famílias de motivos ligadores de moléculas pequenas na natureza (Martinez et al, 2002a). A designação GAF surgiu a partir das iniciais dos nomes das proteínas em que foi primeiro identificado por homologia de sequências: cGMP-fosfodiesterases, Adenilato ciclase e Fh1A (um fator de transcrição de *E. coli*). Hoje sabe-se que 5 famílias de PDEs possuem domínios GAF (PDE2, -5, -6, -10 e -11) e que mais de 1360 proteínas contêm esses motivos, em organismos que variam desde esponjas até humanos. No entanto, muitas dessas proteínas não ligam nucleotídeos cíclicos. A estrutura cristalina da região N-terminal contendo os domínios GAF A e B da enzima PDE2A de camundongo, ligada à cGMP, foi recentemente determinada (Fig 5). A estrutura mostra que os domínios GAF A de cada monômero formam a interface do dímero, enquanto que os domínios GAF B estão distantes e são responsáveis pela ligação de cGMP (Martinez et al, 2002b). A estrutura dos domínios GAF A e B da PDE2A não sugere um mecanismo de ação para a ativação catalítica induzida pela ligação de cGMP, de forma que ainda não está claro como a mudança conformacional em GAF B causa a ativação do domínio catalítico e requer determinações estruturais da enzima com e sem cGMP ligado (Martinez et al, 2002a).



**Figura 5: Estrutura dos domínios GAF A e B da PDE2A de camundongo.** Cada subunidade contém um domínio GAF A e um domínio GAF B. (A) O domínio GAF A forma a interface do dímero enquanto que o domínio GAF B contém o sítio de ligação à cGMP. (B) Vista da interface do dímero num ângulo aproximadamente de 70° em relação à vista em A, mostrando a ponte dissulfeto em C386. cGMP está mostrado em vermelho. Fonte: Martinez et al, 2002b.

A PDE2A é altamente expressa em cérebro e coração, mas também é encontrada nos pulmões, rins e fígado. Uma das primeiras funções específicas atribuída à PDE2A é o controle da pressão arterial. PDE2A é altamente expressa em células da zona glomerulosa do córtex da adrenal, células responsáveis pela produção e secreção de aldosterona. Em condições de elevada pressão arterial, as células do músculo cardíaco secretam ANP produzindo aumento da concentração de cGMP através da estimulação da GC particulada nas células da zona glomerulosa. O cGMP sintetizado estimula a atividade catalítica da PDE2A, resultando na diminuição da concentração de cAMP e inibição da secreção de aldosterona, dessa forma reduzindo a pressão arterial (MacFarland et al, 1991 e Spät and Hunyady, 2004).

PDE2A também está envolvida no controle da contração do músculo cardíaco. Tem sido relatado em estudos recentes, o direcionamento de PDE2 a microdomínios da membrana plasmática chamados “raft de lípidos”, e sabe-se que o receptor adrenérgico ( $\beta$ -AR), a AC e a óxido nítrico sintase (NOS) residem em um subtipo cardíaco de microdomínios da membrana plasmática

chamado caoveolo e que PDE2A diminui a quantidade de cAMP limitada à região do caoveolo de cardiomiócitos de rato, dessa forma afetando a contração do músculo cardíaco (Mongillo et al, 2006b). Além disso, PDE2A parece regular a permeabilidade de células endoteliais em condições inflamatórias, já que estudos recentes mostram que a alta concentração dos nucleotídeos cíclicos previnem o aumento da permeabilidade nessas células e que TNF $\alpha$ , um importante marcador de processos inflamatórios, estimula a expressão de PDE2A, que hidrolisa cAMP, causando o aumento da permeabilidade de células endoteliais de veia umbilical (HUVEC) (Seybold et al, 2005).

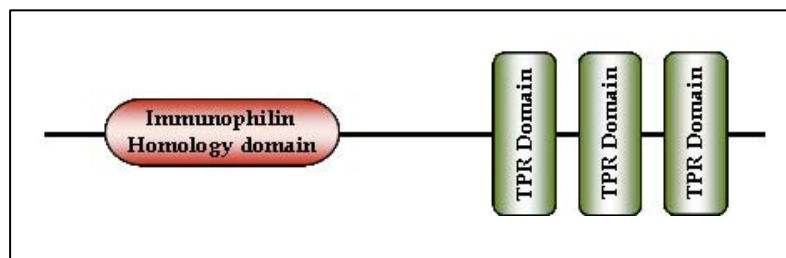
### **1.3. XAP2 e a via do Receptor Aril Hidrocarboneto**

#### **1.3.1 A proteína XAP2**

Como recentemente demonstrado (de Oliveira et al., manuscrito submetido), PDE2A associa-se com XAP2, um membro da família de proteínas conhecida por imunofilinas e um dos componentes do complexo multiprotéico do receptor citosólico Aril hidrocarboneto (Ahr).

XAP2 (também conhecido como ARA9 e AIP) é uma proteína de 38 kDa que foi inicialmente identificada como uma proteína ligadora da proteína X, um fator de transcrição do vírus da hepatite B, de onde surgiu a designação XAP2 (*X Associated Protein*). A ligação de XAP2 à proteína X parece inibir a expressão de genes regulados pela proteína X (Kuzhandaivelu et al, 1996). Em paralelo, XAP2 foi identificado, por diferentes grupos de pesquisa, como um dos componentes do complexo multiprotéico do receptor citosólico Aril hidrocarboneto (Ahr) (Ma and Whitlock, 1997, Carver and Bradfield, 1997 e Meyer et al, 1998). Estruturalmente, XAP2 possui na sua região N-terminal um

domínio de homologia a imunofilinas e na região C-terminal, três motivos estruturais chamados domínios TPR, como mostra a figura 6 (Carver et al, 1998 e Meyer et al, 1999).



**Figura 6: Desenho esquemático da estrutura dos domínios de XAP2.** Em vermelho o domínio de homologia à imunofilinas e em verde os três domínios TPR.

Devido a presença do domínio de homologia a imunofilinas, XAP2 é classificado como uma imunofilina. As imunofilinas compreendem uma família de proteínas que foram identificadas por sua habilidade de ligar drogas imunossupressoras como ciclosporina A (CsA), FK506 e rapamicina. As imunofilinas do tipo ciclofilinas ligam CsA, enquanto que as do tipo FKBP (proteínas ligadoras de FK506) ligam FK506 e rapamicina. Dentro de cada grupo, as ciclofilinas e as FKBP possuem alto grau de conservação estrutural ao longo da evolução, indicando funções celulares fundamentais para as proteínas membros desses grupos de imunofilinas. O alvo celular do complexo droga imunossupressora-imunofilina é a calcineurina, uma fosfatase  $\text{Ca}^{2+}$ -dependente. Em linfócitos T, a calcineurina é ativada pelo aumento da concentração da  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático, que ocorre após a estimulação de células T. Calcineurina então desfosforila a forma citoplasmática do fator de transcrição chamado fator nuclear de células T ativadas (NFAT), permitindo seu deslocamento para o núcleo, causando o estímulo da transcrição do fator de crescimento de células T, a IL-2. Os complexos FK506-FKBP e CsA-ciclofilina ligam e inibem calcineurina, dessa forma bloqueando a desfosforilação, a transcrição de IL-2 e a proliferação de células T, resultando em imunossupressão. Além disso, as imunofilinas possuem atividade

enzimática do tipo peptidil-prolil *cis/trans* isomerase (rotamase) inibida pela ligação da droga imunossupressora. No entanto, a inibição da atividade rotamase não está relacionada com a atividade imunossupressora (Marks, 1996). Curiosamente, XAP2 não possui nenhuma dessas funções: não liga drogas imunossupressoras até hoje testadas e não possui atividade enzimática de rotamase (Ma and Whitlock, 1997 e Carver et al, 1998).

Além do domínio de homologia a imunofilinas, XAP2 possui três motivos TPR seguido um do outro. Os domínios TPR são motivos estruturais presentes em grande número de proteínas e estão envolvidos em interações proteína-proteína e na formação de complexos multiprotéicos. Os motivos TPR variam de 3 a 16 repetições de 34 resíduos de amino ácidos, e o alinhamento de sequências de amino ácidos dos domínios TPR revela uma sequência consenso, definida por um padrão de amino ácidos pequenos e grandes. Os motivos TPR têm sido encontrados em vários organismos diferentes, incluindo desde bactérias a células humanas. Proteínas contendo motivos TPR estão envolvidas em uma variedade de processos biológicos, tais como, controle do ciclo celular, controle transcricional, transporte, neurogênese e enovelamento protéico (D'Andrea and Regan, 2003).

XAP2 exibe alta homologia de sequência com as imunofilinas FKBP12 e com FKBP52. Assim como XAP2, vários membros da família das imunofilinas interagem com hsp90 e fazem parte de complexos multiprotéicos envolvendo receptores citosólicos, como os receptores esteroidais. Por exemplo, FKBP52 liga hsp90 através de seus motivos TPR e faz parte dos complexos dos receptores de glicorticóides (GR), progesterona (PR), estrogênio (ER) e andrógenos (AR) (Meyer and Perdew, 1999).

Recentemente, Vierimaa et al demonstraram que indivíduos com predisposição a adenoma na glândula pituitária (PAP), possuem mutações no gene que codifica XAP2 resultando na expressão de XAP2 truncado. Ainda não está claro porque a perda da função de XAP2 resulta em PAP e a possível relação com a via do Ahr, no entanto o trabalho relatado por Vierimaa destaca

a importância de XAP2 e suas proteínas associadas na fisiopatologia celular (Vierimaa et al, 2006).

### **1.3.2 A Via do Receptor Aril Hidrocarboneto (Ahr)**

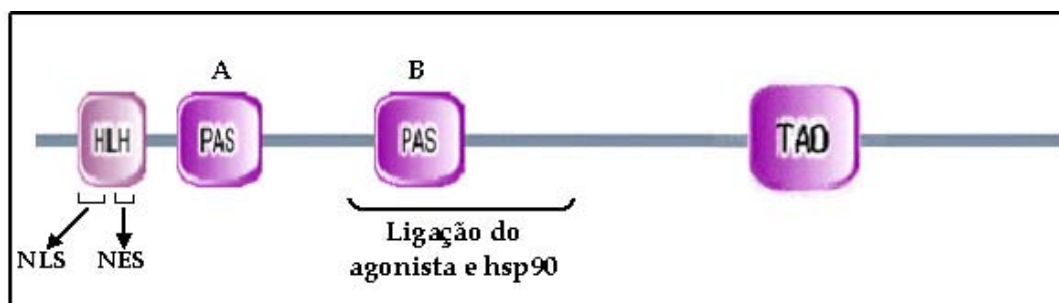
Os indivíduos estão constantemente expostos a uma variedade de compostos xenobióticos, tais como princípios tóxicos e venenos de origem animal, vegetal e de microorganismos, medicamentos, nicotina e a própria fumaça de tabaco, produtos e subprodutos industriais, etc. Por várias décadas, desde o começo do século passado, os cientistas admitiam a existência de mecanismos adaptativos para minimizar a toxicidade desses compostos ambientais. No entanto, a resposta metabólica a compostos aromáticos policíclicos (PAHs) só veio a ser descrita na década de 50 (Conney et al, 1956) com a observação de que a administração de xenobióticos à roedores induz a síntese de diversas enzimas microsossomais hepáticas, coletivamente referidas como aril hidrocarboneto hidroxilases (AHH). Sabe-se hoje que as atividades descritas por Conney refletem, basicamente, a atividade catalítica do citocromo P4501A1 e algumas enzimas de conjugação como a glutathione S-transferase. Essas observações levaram, mais recentemente, à predição e à descoberta do Ahr, como um receptor induzível que controla a expressão da atividade AHH (Hahn, 2002).

Ahr é um fator de transcrição induzível pelo ligante, responsável pela resposta celular a compostos xenobióticos que incluem uma ampla variedade de contaminantes ambientais hidrofóbicos, tais como: hidrocarbonetos aromáticos halogenados (HAHs) e os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos não-halogenados (PAHs). O TCDD (2,3,7,8 tetraclorodibenzo-*p*-dioxina) é um membro da classe dos HAHs, e é o mais potente e mais estudado ligante de Ahr, produzindo uma variedade de efeitos biológicos e tóxicos de maneira espécie- e tecido- específicos. A exposição de indivíduos à TCDD resulta em



efeitos danosos como enfraquecimento, cloracne, desordens sanguíneas e imunológicas, produção de tumores, defeitos reprodutivos e de desenvolvimento (Ramadoss et al, 2004 e Ramadoss and Perdew, 2005).

Ahr possui massa molecular que varia entre 95 e 140 kDa, dependendo da espécie de vertebrado (Ramadoss et al, 2004) e pertence à família de fatores de transcrição que contém os domínios básico *helix-loop-helix* (bHLH)/Per-ARNT-Sim (PAS), dois domínios altamente conservados ao longo da evolução (Kashuba et al, 2006). A porção N-terminal de Ahr contém o motivo bHLH que é a interface da dimerização com ARNT (*AhR Nuclear Translocator*), proteína estruturalmente relacionada com Ahr que contém os domínios bHLH/PAS e é fundamental na ativação da transcrição de genes regulados por Ahr. A região básica, também localizada na porção N-terminal de Ahr é responsável pela habilidade do heterodímero Ahr-ARNT de ligar-se a regiões do DNA conhecida como *Dioxin Regulatory Elements* (DRE) ou *Xenobiotics Regulatory Elements* (XRE). Os domínios PAS A e PAS B são formados basicamente por amino ácidos hidrofóbicos e são homólogos aos domínios presentes nas proteínas de *Drosophila* Per e Sim, envolvidas no controle do ritmo circadiano e no desenvolvimento, respectivamente. Esses motivos estão comumente envolvidos em interações proteína-proteína, contribuindo para a interface do heterodímero Ahr-ARNT. Além disso os domínios PAS são necessários para a ligação do agonista ao Ahr e para a ligação com hsp90 (Meyer and Perdew, 1999). O segmento carboxi-terminal de Ahr contém um domínio comumente encontrado em fatores de transcrição, chamado domínio de transativação (TAD), rico em resíduos de glutamina. Este domínio é responsável pela indução da transcrição dos genes regulados pelo fator de transcrição. A figura 7 mostra o arranjo dos domínios que formam o Ahr (Gu et al, 2000 e Denison et al, 2002) .

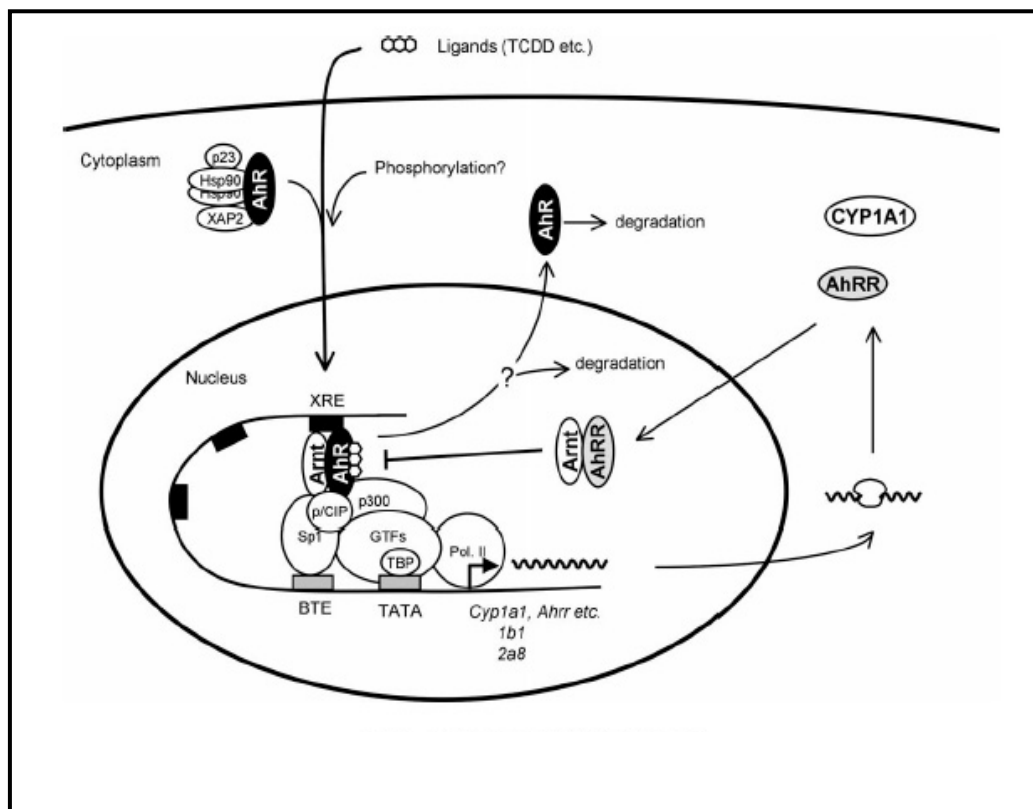


**Figura 7: Desenho esquemático da estrutura dos domínios de Ahr.** O domínio bHLH contém sequência de localização nuclear (NLS) e sequências de exportação nuclear (NES) e estão envolvidas com a ligação ao DNA. Os domínios PAS são os responsáveis pelas interações proteína-proteína e ligação do agonista ao receptor. Fonte: [http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set\\_mode.cgi?NORMAL=1](http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set_mode.cgi?NORMAL=1)

Ahr reside no citoplasma em uma conformação de alta afinidade de ligação pelo agonista, em um complexo tetramérico formado por duas moléculas da proteína chaperona hsp90, por um componente imunofilina, XAP2 e por uma co-chaperona, p23. A chaperona hsp90 parece ser necessária para o enovelamento correto de Ahr na conformação de alta afinidade pelo ligante e também estabiliza o receptor no citoplasma. XAP2 liga tanto hsp90 quanto o receptor, o que leva ao aumento da estabilidade do complexo (Ramadoss et al, 2004). Estudos mostram que a expressão transitória de Ahr de camundongo é predominantemente nuclear em células COS-1 em cultura, no entanto, a co-expressão de Ahr e XAP2 leva a localização citoplasmática de Ahr (LaPres et al, 2000 e Petrulis et al, 2000). Além disso, Ahr possui tanto o sinal de localização nuclear (NLS) quanto o sinal de exportação nuclear (NES), que capacita o receptor a trafegar entre o núcleo e o citoplasma. No entanto, a superexpressão de XAP2 é capaz de bloquear o deslocamento de Ahr para o núcleo na ausência de ligante, sugerindo que XAP2 é responsável por manter o complexo Ahr no citoplasma. Apesar disso, o papel preciso de XAP2 no complexo do Ahr ainda está por ser melhor elucidado (Ramadoss et al, 2004 e Pollenz et al, 2006).

A ativação da via de sinalização do Ahr ocorre quando o indivíduo entra em contato com compostos xenobióticos, como o TCDD. Este composto funciona como potente e seletivo agonista: atravessa a membrana plasmática, difunde-se pelo citoplasma, ligando-se, finalmente o Ahr. A ligação do agonista induz uma mudança conformacional no Ahr que expõe as sequências de localização nuclear (NLS), induzindo ao deslocamento do complexo para o núcleo onde ele forma um complexo transcricionalmente ativo com ARNT. A dimerização com ARNT induz a liberação de Ahr do complexo com hsp90, XAP2 e p23 e o complexo Ahr-ARNT liga-se ao DNA em regiões regulatórias chamadas XRE ou DRE. Esses domínios estão localizados na região promotora e regulam a transcrição de genes que codificam enzimas de metabolização de drogas de fase I e II. As de fase I são representadas pelas enzimas do citocromo P450: CYP1A1 e CYP1A2 e as de fase II são representadas pelas enzimas UGT1A1, GST-Ya e NADPH-quinona-oxido-redutase. (Carlson and Perdew, 2002 e Ramadoss and Perdew, 2005). A figura 8 mostra a via de sinalização do receptor Ah.

A via de sinalização do Ahr pode ser controlada por dois mecanismos: 1) pela transcrição, induzida por Ahr, de uma proteína bHLH/PAS dominante negativo, conhecida como *AhR Repressor* (AhRR) que compete com Ahr pela ligação com ARNT, dessa forma interferindo na ligação de Ahr ao DNA e inibindo a transcrição dos genes regulados por Ahr; 2) pela degradação de Ahr pela via do proteossomo 26S (Dunham et al, 2006).



**Figura 8: Modelo da via de sinalização de Ahr.** O modelo sugere que após a ligação do agonista, o complexo Ahr desloca para o núcleo onde o complexo se desfaz. Ahr dimeriza com ARNT, liga regiões do DNA chamada XRE, na região promotora de genes como CYP1A1 e do repressor AhRR. Fonte: Fujii-Kuriyama and Mimura, 2005.

A ativação da via de sinalização de Ahr por compostos xenobióticos, em modelos animais, produz numerosas conseqüências tóxicas ao organismo, incluindo carcinogênese, involução do timo, enfraquecimento severo e morte. Além disso, camundongos transgênicos expressando constitutivamente um mutante ativo de Ahr desenvolvem tumores de estômago, consistente com a função oncogênica do receptor ativado (Kashuba et al, 2006). Recentemente, tem sido proposto que o complexo transcricional Ahr/ARNT, e os genes regulados por ele, evoluíram para a defesa do organismo contra diversas toxinas de plantas e, seguindo essa hipótese, seria improvável que Ahr tivesse funções fisiológicas endógenas (Puga et al, 2005). No entanto, a participação de Ahr no desenvolvimento hepático, na nefrogênese, no funcionamento do

sistema imune, na proliferação e diferenciação celular, assim como no metabolismo do ácido retinóico, sugerem que Ahr pode ser ativado para regular esses processos na ausência de um ligante exógeno (Oesch-Bartlomowicz et al, 2005). Finalmente, a grande variedade de ligantes exógenos capazes de ativar Ahr, sugere a possibilidade da existência de múltiplos ligantes endógenos.

A existência de ligantes fisiológicos de Ahr é indiretamente suportada por numerosas observações que demonstram a ativação de Ahr, e de respostas dependentes de Ahr, na ausência de ligantes exógenos. Essas evidências indiretas incluem: 1) presença de Ahr nuclear em fatias de tecidos de animais não tratados com xenobióticos e também em células em cultura; 2) evidência de que Ahr tem papel no controle do ciclo celular na ausência de ligante exógeno e a observação experimental de que a supressão da expressão de Ahr resulta em diminuição do desenvolvimento de blastocistos em camundongos; 3) talvez a evidência mais importante para a existência de um ligante endógeno de Ahr surgiu de estudos com camundongo *knockout* de Ahr, que mostram um espectro de defeitos no desenvolvimento e mudanças fisiológicas nos camundongos Ahr<sup>-/-</sup>. No entanto, a identidade dos compostos que ativam Ahr em concentrações fisiológicas normais ainda é uma grande incógnita (Schmidt and Bradfield, 1996, Denison et al, 2002 e Bock and Köhle, 2006). De fato, ao longo dos últimos anos foram descritos na literatura inúmeros candidatos a ligantes endógenos de Ahr, incluindo vários produtos da foto-oxidação do amino ácido triptofano, lipoxina, indirubina, bilirubina, biliverdina e um derivado indólico isolado de pulmão de porco (Denison et al, 2003, Bittinger et al, 2003 e Puga et al, 2005). Nesse contexto, é possível que os efeitos biológicos de Ahr dependam da presença desses ou de outros ligantes endógenos, que podem ser distintos em diferentes tecidos e estágios do desenvolvimento e que os efeitos tóxicos dos ligantes xenobióticos pode ser devido à expressão gênica alterada em células suscetíveis. Além disso, já que a maioria dos efeitos tóxicos de TCDD/HAHs não são observados até semanas

após à exposição, provavelmente os efeitos tóxicos desses compostos resultem da expressão contínua e inapropriada de genes específicos, o que finalmente resulta na resposta tóxica (Denison et al, 2002). Alternativamente, os compostos xenobióticos podem causar os efeitos tóxicos de forma independente da via de Ahr (Puga et al, 2005).

Recentemente, Oesch-Bartlomowicz et al (2005) mostraram que cAMP, de maneira similar ao TCDD, é capaz de estimular o deslocamento de Ahr para o núcleo. Todavia, neste caso, Ahr nuclear não dimeriza com ARNT, mas forma complexo com outras proteínas ainda não identificadas. Além disso, cAMP não induz a transcrição do gene CYP1A1, utilizado como gene repórter. Esses resultados corroboram a idéia sobre a via endógena de Ahr, e que essa via endógena está diretamente ligada à concentração de cAMP intracelular e não envolve a expressão de enzimas de detoxificação de compostos xenobióticos (Oesch-Bartlomowicz et al, 2005).

## 2. OBJETIVOS DO TRABALHO

Iniciamos este projeto buscando identificar a compartimentalização subcelular da via NO/cGMP e o papel das fosfodiesterases nesse contexto. Utilizamos para tal a técnica da triagem dois-híbridos em levedura usando a enzima PDE2A como isca, com o objetivo de identificar proteínas associadas à PDE2A que poderiam justificar tal compartimentalização subcelular. Usar PDE2A como isca se justificava plenamente porque: a enzima é ativada por cGMP, hidrolisa cAMP e cGMP, sendo ademais altamente expressa em células do sistema cardiovascular, exercendo papel importante no controle da pressão arterial, tema de interesse para o nosso grupo de pesquisa. Detectamos, ao final da triagem dois-híbridos, a interação entre PDE2A e XAP2, indicando a intercomunicação entre as vias dos nucleotídeos cíclicos e a via do Ahr.

Assim, os objetivos desse trabalho passaram a ser:

- Comprovar a interação entre PDE2A e XAP2;
- Mapeamento dos sítios de ligação de XAP2 na enzima PDE2A;
- Identificar a região de ligação em XAP2;
- Determinar se a ligação entre PDE2A e XAP2 é influenciada por cGMP, um modulador alostérico da enzima PDE2A;
- Determinar se PDE2A faz parte do complexo do receptor Ah;
- Determinar se a ligação de XAP2 à PDE2A interfere na atividade fosfodiesterásica da enzima PDE2A;
- Sugerir um papel funcional para a presença de PDE2A na via de sinalização de Ahr;
- Entender o mecanismo de ação de cAMP na via de sinalização de Ahr.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Materiais:

##### 3.1.1 Cepa de Bactérias, Leveduras e Linhagens Celulares:

As cepas de bactérias *E. coli* TOP10 quimicamente e eletrocompetentes e *E. coli* BL21 Star™ (DE3) foram obtidas da Invitrogen, Karlsruhe, Alemanha e a cepa de *E. coli* XL10-Gold™ da Stratagene, La Jolla, EUA. A cepa da levedura *S. Cerevisiae* AH109 foi adquirida da BD Clontech, Palo Ato, EUA. As origens das linhagens celulares são as seguintes:

- T-REx™-Hela	Invitrogen, Karlsruhe, Alemanha
- COS-1	Coleção alemã de microorganismos e culturas de células (DSMZ), Braunschweig, Alemanha.
- Hepa1c1c7	Gentilmente cedida por Barbara Oesch-Bartlomowicz, Universidade de Mainz, Alemanha

##### 3.1.2 Vetores, Plasmídeos e cDNAs:

pSG8-VSV	cedido por Steffen Gross, Frankfurt
pGBKT7	BD Clontech, Palo Alto, EUA
pACT2	BD Clontech, Palo Alto, EUA



pGEX-4T-3	GE-Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Suécia
pcDNA4/TO	Invitrogen, Karlsruhe, Alemanha
pcDNA3-HRS	cedido por Daniela Höller, Frankfurt, Alemanha
pFlag-CMV1-HSP90	cedido por Sylke Pioch, Frankfurt, Alemanha
pEF-V5-HisC-Flag-Ahr	cedido por Gary H. Perdew, EUA
pcDNA4/TO-EGFP	cedido por A. Smolenski, Frankfurt, Alemanha
pcDNA3-GC-A	cedido por S. Gambaryan, Würzburg, Alemanha

PDE2A cDNA (Clone IRAKp961N0275Q2) foi obtido da RZPD, Alemanha.

A biblioteca de cDNA de cérebro humano utilizada na triagem dois-híbridos pertence ao sistema MATCHMAKER da Clontech, Paolo Alto, EUA e está clonada no vetor de expressão pGADT7.

### 3.1.3 Oligonucleotídeos:

pSG8-PDE2A-for	5'-ttcgatatcatggggcaggcatgcgccactcc-3'
pSG8-PDE2A-rev	5'-gataagctttcactcagcatcaaggctgcagc-3'
pGBKT7-PDE2-for	5'-ggccatggaggccatggggcaggcatgcgccactcc3'
pGBKT7-PDE2-rev	5'-gatgtcgactcactcagcatcaaggctgcagc-3'
pGEX-4T-3-XAP2-for	5'-tatcccgggggatggcgatatcatcgcaaga-3'
pGEX-4T-3-XAP2-rev	5'-tagcggccgctcaatgggagaagatcccccg-3'
pGEX-4T-3-HRS-for	5'-ataggatccatggggcaggcagcgccac-3'
pGEX-4T-3-HRS-rev	5'-tatctcgagtcagtcgaatgaatgagct-3'
pGEX-4T-3-TULIP-for	5'-taaggatccgtgtgcatt tctgaaaaac-3'
pGEX-4T-3-TULIP-rev	5'-ttactcgagttaatgatcgcatcatgatgg-3'
pGEX-4T-3-PLC-for	5'-ataggatccaagaattcaattgtggacc-3'
pGEX-4T-3-PLC-rev	5'-tatctcgagctagtctggaggagatct-3'
pGEX-4T-3-WDR13-for	5'-atagtcgacagcatctcagcccggtctg-3'
pGEX-4T-3-WDR13-rev	5'-tatgggcccacttctgctcccgcctcc-3'
pGEX-4T-3-TFCB-for	5'-tatggatccctccatcgctgagttcaag-3'

pGEX-4T-3-TFCB-rev	5'-atactcgagtcatactctgtccaaccgt-3'
pcDNA4/TO-XAP2-FLAG-for	5'-atataagcttggattatggcggatatcatcgcaaga-3'
pcDNA4/TO-XAP2-FLAG-rev	5'-attactcgagctacttatcgtcgtcatccttgtaactgcatgggagaagatcccccg -3'
pcDNA3.1/myc-HisB-XAP2-for	5'-tataagcttactatggcggatatcatcgactccg-3'
pcDNA3.1/myc-HisB-XAP2-rev	5'-tatctcgagcgtatgggagaagatccccggaac-3'
*pSG8-GafA/B-for	5'-gtatcgagccacctggccaattagatgatgatgtaccacatgaagg-3'
*pSG8-GafA/B-rev	5'-ccttcatgtgtacatcatcatctaatggccaggtggctgcatgac-3'
*pSG8-GAFA-for	5'-gagtgccaggctcttctctaaagtggcaaagaaccttca-3'
*pSG8-GAFA-rev	5'-tgaagaggttctttgccacttagagaagagcctggcactc-3'
*pSG8-N-PDE2A-for	5'-agggtgcaggtcctcagtagcgcggggcccaggaggctc-3'
*pSG8-N-PDE2A-rev	5'-gagcctccctgggcccgcgctactgcaggacctgcacct-3'
pSG8-GAFB-for	5'-tgtaagcttgctcttccaagtggcaaag-3'
pSG8-GAFB-rev	5'-atactcgagtcagtacatcatcatctcattgg-3'
pGEX-4T-3-XAP2(1-169)-for	5'-tatgtcgacatggcggatatcatcgcaag-3'
pGEX-4T-3-XAP2(1-169)-rev	5'-tatgcccggcggcccatgggtcctgctggt-3'
pGEX-4T-3-XAP2(170-330)-for	5'-tatgtcgacatgacagacgaagagaaggca-3'
pGEX-4T-3-XAP2(170-330)-rev	5'-atagcggccgctcaatgggagaagatcccccg-3'

\* Oligonucleotídeos gerados para reação de mutagênese sítio específica.

Todos os oligonucleotídeos foram sintetizados e purificados pela MWG-Biotech, Munique, Alemanha.

### 3.1.4 Enzimas e Proteínas

PCR Master Mix	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase	Stratagene, La Jolla, USA
Enzimas de Restrição	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
PEQGOLD Protein-Marker I	PEQLAB, Erlangen

### 3.1.5 Anticorpos

#### 3.1.5.1 Anticorpos Primários:

Camundongo anti-VSV (clone P5D4)	monoclonal. Sigma, Taufkirchen. Diluição para WB: 1:5000
-------------------------------------	---

Camundongo anti-FLAG M2	monoclonal. Sigma, Taufkirchen. Diluição para WB: 1:10000
red anti-FLAG M2 affinity gel	anti-FLAG M2 acoplado a agarose CL-4B. Sigma, Taufkirchen. Diluição: 1:70.
Camundongo anti-myc (clone 4 <sup>a</sup> 6)	monoclonal. Upstate, Lake Placid, USA. Diluição para WB: 1:1000
Coelho anti-myc (clone A-14)	polyclonal. Santa Cruz Biotechnology, Califórnia, EUA. Diluição para IF: 1:100.
Camundongo anti-XAP2 (clone ab468)	monoclonal. Abcam, Cambridge, UK. Diluição para WB: 1:1000
Cabra anti-Ah receptor (clone M20)	polyclonal. Santa Cruz Biotechnology, Califórnia, EUA. Diluição para IF: 1:50.
Camundongo anti-Ah receptor (clone ab2770)	monoclonal. Abcam, Cambridge, UK. Diluição para WB: 1:1000
Coelho anti-PDE2A (clone ab14604)	policlonal. Abcam, Cambridge, UK. Diluição para WB: 1:2000)

### 3.1.5.2 Anticorpos Secundários:

anti-Camundongo-IgG Peroxidase-conjugado	Policlonal produzido em cabras, Dianova, Hamburg, Alemanha. Diluição 1:10000
anti-Coelho-IgG Peroxidase-conjugado	Policlonal produzido em cabras, Dianova, Hamburg, Alemanha. Diluição 1:10000
anti-cabra-IgG Carbocianina-conjugado (Cy3)	policlonal produzido em macacos, Jackson ImmunoResearch, Baltimore. Diluição: 1:500

anti-camundongo-IgG  
Carbocianina-conjugado (Cy2)

policlonal produzido em cabras,  
Jackson ImmunoResearch, Baltimore.  
Diluição: 1:500

### 3.1.6 Kits para isolar DNA

EZNA Plasmid Miniprep Kit I

PEQLAB, Erlangen

QIAfilter Plasmid Giga Kit

Qiagen, Hilden

QIAquick Gel Extraction Kit

Qiagen, Hilden

### 3.1.7 Kits Especiais

Quick Ligation Kit

BioLabs, Ipswich, MA

ECL *western blotting detection reagents*

Amersham Biosciences,  
Freiburg

PDELIGHT™ HTS cAMP kit

Cambrex Bio Sciences,  
Rockland

### 3.1.8 Substâncias químicas e reagentes especiais

GSH Sepharose 4B  
Freiburg

Amersham Biosciences,

Protein A/G PLUS-Agarose

Santa Cruz Biotechnology, EUA

dNTP Mix

Invitrogen, Karlsruhe,

Alemanha

IPTG

Roth, Karlsruhe, Alemanha

GEL/MOUNT™

Biomed, Foster City, EUA

8-Br-cCMP

Biolog, Bremen, Alemanha

TCDD	Sigma, Taufkirchen
Forskolin	Sigma, Taufkirchen

Todas as substâncias químicas não citadas e as soluções usadas nesse trabalho foram preparadas com reagentes de qualidade P.A., como Applichem (Darmstadt), BD Clontech (Palo Alto, USA), Merck (Darmstadt), Sigma (Taufkirchen) ou Roth (Karlsruhe), e foi utilizada água bidestilada ou quando necessário água Milli Q (Millipore).

### 3.1.9 Meios, Soluções e Reagentes Especiais para Cultura de Células

Metafectene™	Biontex, Munique, Alemanha
Fugene 6	Roche Diagnostics,
DEAE-Dextran	Sigma, Taufkirchen
Cloroquina	Sigma, Taufkirchen
$\alpha$ -MEM	Invitrogen, Karlsruhe, Alemanha

DMEM-High-Glucose, FCS, PBS, Tripsina/EDTA, Penicilina/Estreptomicina foram adquiridos da PAA Laboratories, Pasching, Áustria

### 3.1.10 Meios, Soluções e Reagentes Especiais para a Triagem Dois-Híbridos.

ssDNA de esperma de arenque	BD Clontech, Palo Alto, USA
Minimal SD Base	BD Clontech, Palo Alto,

Minimal SD Agar Base	BD Clontech, Palo Alto,
-Trp-DO Supplement	BD Clontech, Palo Alto,
-Trp/-Leu-DO Supplement	BD Clontech, Palo Alto,
-Trp/-Leu/-His/-Ade-DO Supplement	BD Clontech, Palo Alto,
X- $\alpha$ -Gal	Glycosynth, Warrington, UK
Litiquase	Sigma, Taufkirchen
Solução de litiquase	Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM, litiquase 4,5U/ $\mu$ l
Esferas de vidro 425-600 $\mu$ m	Sigma, Taufkirchen
Meio SC-dropout -1	467 g/L de meio minimal SD base suplementado com 0,66 g/L de Trp-DO supplement, ausência de triptofano
Meio SC-dropout -2	467 g/L de meio minimal SD base suplementado com 0,64 g/L de Trp/- Leu-DO Supplement, ausência de triptofano e leucina
Meio SC-dropout -4	467 g/L de meio minimal SD base suplementado com 0,6 g/L de Trp/- Leu/-His/-Ade-DO Supplement, ausência de triptofano, leucina, histidina e adenina
Meio SC-dropout -4/x- $\alpha$ -Gal	467 g/L de meio minimal SD base suplementado com 0,6 g/L de Trp/- Leu/-His/-Ade-DO Supplement+40 mg/ml de x- $\alpha$ -Gal, ausência de triptofano, leucina, histidina e adenina

## 3.2 Métodos:

### 3.2.1 Métodos de Biologia Molecular

#### 3.2.1.1 Eletroforese em Gel de Agarose para Análise de DNA

Fragmentos de DNA foram aplicados em gel de agarose 0,8% em tampão TAE, (1 mM EDTA, 40 mM Tris/HOAc, pH 8,0), na presença de 10 µg/ml de brometo de etídeo. As amostras de DNA foram diluídas em tampão contendo 0,09% (m/v) de azul de bromofenol, 0,09% de xilenocianol e 60 mM de EDTA em 60% (v/v) de glicerol. As bandas de DNA foram visualizadas utilizando uma fonte de UV.

#### 3.2.1.2 Reação de PCR

Neste trabalho foram utilizadas duas estratégias para a técnica de PCR:

- Enzima Taq polimerase: Reação mais rápida, utilizada na confirmação da presença de fragmentos de DNA clonado. Neste tipo de reação podem ser usados como molde fragmentos de DNA isolados (50 ng) ou traços de colônias de bactérias. A mistura de reação contém: 10 µl de PCR Master Mix, 1µl de cada primer (verso e reverso; 0,5 µM concentração final) e água suficiente para 20 µl de reação. Eram executados 35 ciclos:

3'	95°C
30''	95°C
30''	55°C
3'	72°C
7'	72°C

- Enzima Pfu polimerase: Reação mais lenta (2min/1kb amplificado) o que significa menor taxa de erro de pareamento de bases. Utilizada para amplificação de insertos de DNA clonados em vetores de expressão. A mistura de reação contém: 5 µl de Tampão específico para Pfu polimerase, dNTPs (0,5 mM), 1µl de cada primer (verso e reverso; 0,5 µM concentração final), 0,5 µl de Pfu polimerase (1,25U) adicionados a 80°C após denaturação do molde de DNA e água suficiente pra 50 µl de reação. Eram executados 25 ciclos:

3'	95°C
1'	80°C
20''	95°C
20''	60°C
X'*	72°C
20'	72°C

\* O tempo de elongação depende do tamanho do inserto de DNA.

### 3.2.1.3 Clonagem dos Fragmentos de cDNA

Os fragmentos DNA amplificados por Pfu-PCR são submetidos a eletroforese em gel de agarose 0,8%. A análise eletroforética deve conter apenas uma banda no tamanho correspondente ao inserto de DNA amplificado. A banda de DNA é extraída do gel com auxílio do QIAquick Gel Extraction Kit. A quantidade de DNA é estimada espectrofotometricamente a 260 nm. A reação de ligação do inserto de DNA purificado do gel de agarose e o vetor é feita utilizando o Quick Ligation Kit de acordo com o protocolo do fabricante.



### 3.2.1.4 Preparação das Construções que codificam N-PDE2A, GAF A, GAF A/B e GAF B

Para introdução de pontos de mutação no fragmento de cDNA que codifica a enzima PDE2A tipo selvagem, foi utilizado o protocolo fornecido pelo kit *QuickChange Site-Directed Mutagenesis*. A construção pSG8-PDE2A foi utilizada como molde da reação de PCR para introduzir um ponto de mutação com o objetivo de formar um códon de terminação e gerar a enzima truncada em diferentes regiões. Os pares de primers utilizados na reação de mutagênese estão especificados na seção 3.1.3. Uma alíquota de 15 µl do produto de reação de PCR (tratado com a enzima de restrição DPNI para digestão do DNA original) foi utilizada para transformação de bactérias competentes *E.coli* XL10-Gold™. O plasmídeo de DNA mutado foi isolado utilizando EZNA Plasmid Miniprep Kit e sequenciado para comprovação da eficiência da reação de mutagênese.

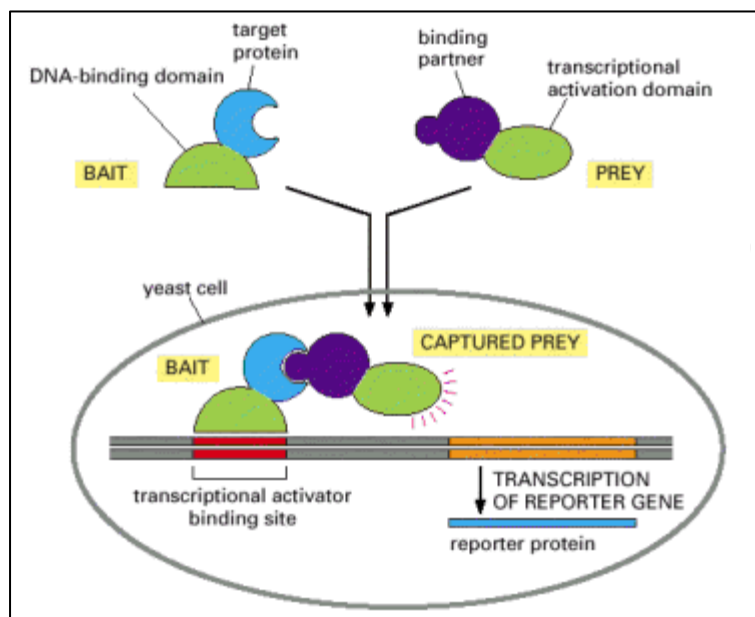
Para criar a construção que codifica apenas o domínio GAF B foram gerados primers que anelam nas regiões adjacentes ao domínio GAF B para a reação de PCR. O produto da reação é um inserto de 816 pb que foi clonado no vetor de expressão contendo a sequência do epítipo da glicoproteína do vírus da estomatite vesicular (VSV), pSG8.

### 3.2.1.5 Sistema Dois-Híbridos em Levedura

O sistema dois-híbridos é uma técnica genético-molecular criada em 1989 por Stanley Fields e Ok-Kyu Song (Fields and Song, 1983), utilizada para identificação de interações proteína-proteína e baseada na natureza modular dos fatores de transcrição, que consistem em dois domínios: Domínio de Ligação (BD, do inglês: *binding domain*) que se liga ao DNA em região *upstream*

ao gene repórter e o Domínio de Ativação (AD, do inglês, *activation domain*) que é responsável pela ativação da transcrição do gene repórter. Os domínios de ligação (BD) e os domínios de ativação (AD) dos fatores de transcrição agem de forma independente. De forma que duas proteínas quiméricas, uma fusionada ao BD e a outra fusionada ao AD, quando associadas em levedura, funcionam como fator de transcrição, ativando a transcrição do gene repórter. O fator de transcrição utilizado foi o GAL4, regulador da expressão de genes das enzimas envolvidas na metabolização de galactose à glicose, como a  $\beta$ -galactosidase. O gene da  $\beta$ -galactosidase foi utilizado como gene repórter.

A proteína *isca* (proteína de interesse) utilizada foi PDE2A que foi clonada no vetor de expressão pGBKT7 gerando uma proteína quimérica, constituída pelo domínio de ligação de GAL4 fusionada à porção N-terminal da enzima PDE2A. Para triagem foi utilizada uma biblioteca de cDNA de cérebro humano clonada no vetor de expressão pACT2 que gera a expressão de proteínas quiméricas, fusionadas ao domínio de ativação de GAL4. A cepa de levedura *S. cerevisiae* utilizada foi a AH109, geneticamente modificada de forma que a biosíntese dos aminoácidos triptofano, leucina e histidina, além da base nitrogenada adenina, estão significativamente reduzidas. As levedura *S. cerevisiae* foram transfectadas com o gene das proteínas quiméricas. A figura 9 mostra esquematicamente o sistema dois-híbridos.



**Figura 9:** O sistema dois-híbridos mostrado em esquema. *Target protein*: proteína alvo ou isca; *Bait*: isca; *DNA-binding domain*: domínio de ligação ao DNA; *yeast cell*: célula de levedura; *transcriptional activation domain*: domínio de ativação transcricional; *transcriptional activator binding site*: sítio de ligação do domínio de ativação; *transcription of reporter gene*: transcrição do gene repórter. Fonte: Alberts 2002.

### 3.2.1.5.1 Transformação das Leveduras *S. Cerevisiae* com o híbrido BD-PDE2A

Os experimentos foram elaborados segundo um protocolo em diversas etapas em dias seguidos de acordo com Agatep et al, 1998.

Dia 1: Colônias de leveduras AH109 foram inoculadas em 5 ml de meio YPAD (peptona 20g/L, extrato de levedura 10 g/L, adenina hemissulfato 0,003% e e glucose 2%, pH 6,5) a 30°C sob agitação (200 rpm), *overnight*.

Dia 2: A cultura de levedura foi diluída, com meio YPAD pré aquecido, a  $5 \times 10^6$  células/ml e incubada por 4 horas a 30°C sob agitação (200 rpm) até atingir duas divisões ( $2 \times 10^7$  células/ml). As células foram coletadas por centrifugação a  $3000 \times g$  por 5 minutos em tubo estéril e lavadas (por centrifugação) com água deslilada estéril. As células obtidas no pellet final

foram ressuspensas em 1 ml de LiAc 100 mM (acetato de lítio) e incubadas por 10 minutos a 30°C.

#### Mistura de Transformação

Polietilenoglicol (PEG) 50%	240 µl
LiAc 1M	36 µl
ss-DNA 10mg/ml	10 µl
pGBKT7-PDE2A	1 µg
água destilada estéril	x µl
volume total	360 µl

Alíquotas (100 µl) da suspensão de células em LiAc foram submetidas à centrifugação (13000rpm/1 minuto), as células ressuspensas na mistura de transformação e incubadas por 30 minutos a 30°C, seguida por choque térmico a 42°C por 30 minutos. A mistura de transformação foi removida por centrifugação e as células de leveduras ressuspensas em 100 µl de água, plaqueadas (placas de 10-cm) em meio *SC-dropout* -1 agar e mantidas a 30°C por 3 a 4 dias.

#### 3.2.1.5.2 Teste de Auto-ativação

Como controle da ativação intrínseca do sistema foi realizado o teste de auto-ativação em que colônias de leveduras foram transfectadas com a proteína quimérica BD-PDE2A e apenas o domínio de ativação de Gal4. Para isso, colônias de leveduras contendo o plasmídeo BD-PDE2A foram transfectadas com o plasmídeo pACT2 vazio (vetor que codifica o domínio de ativação) e plaqueadas em meio *SC-dropout* -4/x- $\alpha$ -Gal agar e mantidas a 30°C por 3 a 4 dias. Após o período de incubação não houve crescimento de colônias sobre a placa de cultura, indicando que PDE2A por si só não ativa a transcrição do gene repórter.

### 3.2.1.5.3 Transformação das Leveduras *S. Cerevisiae* com o híbrido AD-biblioteca de cDNA de cérebro humano

Dia 1: Colônias de leveduras AH109 transformadas com a quimera BD-PDE2A, que cresceram na placa contendo meio SC-dropout -1 agar, foram inoculadas em 5 ml de meio YPAD (peptona 20g/L, extrato de levedura 10 g/L, adenina hemissulfato 0,003% e e glucose 2%, pH 6,5) a 30°C sob agitação (200 rpm) *overnight*.

Dia 2: foi utilizado o mesmo protocolo de transformação descrito na secção 3.2.6.1, porém escalonado para um volume de cultura 60 vezes maior. As células foram plaqueadas (17 placas de 20 x 20 cm) em meio SC-dropout -4 agar e mantidas a 30°C por 14 dias. Em dias alternados, colônias de leveduras (brancas e circulares) foram coletadas, numeradas e em seguida plaqueadas em meio SC-dropout -4 agar contendo x- $\alpha$ -Gal, substrato da enzima  $\beta$ -galactosidase. O substrato cromogênico x- $\alpha$ -Gal foi hidrolisado pelas colônias de leveduras que expressaram o gene repórter da enzima  $\beta$ -galactosidase e tornaram-se azul.

### 3.2.1.5.4 Extração de DNA das Leveduras

Dia 1: as colônias com coloração azul foram inoculadas em 5 ml de meio líquido SC-dropout -4 e incubadas *overnight* a 30°C sob agitação constante (200 rpm).

Dia 2: As células foram coletadas por centrifugação (4000 rpm/10 minutos), ressuspensas em 30  $\mu$ l de solução de litiquase e incubadas por 1 hora a 37°C, sob agitação constante (650 rpm). Após o período de incubação, foram adicionados 200  $\mu$ l de tampão de lise (Triton X-100 2%, SDS 1%, NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 1mM), 200  $\mu$ l de esferas de vidro e

200 µl de fenol/clorofórmio. Após agitação (vórtex por 2 minutos) e centrifugação por 12 minutos a 13000rpm, a porção aquosa contendo o DNA foi recuperada e precipitada com 150 µl de isopropanol/20 µl de NH<sub>4</sub>Ac. O *pellet* de DNA foi lavado com etanol 70% e ressuspensão em 15 µl de água.

#### **3.2.1.5.5 Transformação de bactérias *E. coli* eletro-competentes**

Os fragmentos de DNA isolados das colônias de leveduras foram transformados e amplificados em bactérias *E. coli* Top10 eletro-competentes por eletroporação. As colônias de bactérias que continham o plasmídeo que codifica a proteína quimérica contendo o domínio de ativação cresceram em meio contendo ampicilina, enquanto que o DNA genômico das leveduras foi eliminado na placa de seleção contendo o antibiótico (LB agar/ampicilina 0,1 mg/ml). O plasmídeo AD foi isolado utilizando o kit EZNA Plasmid Miniprep Kits I.

#### **3.2.1.5.6 Retransformação de Leveduras contendo o plasmídeo BD-PDE2A com plasmídeo AD isolado de bactérias *E. coli*.**

Os plasmídeos AD, isolados das colônias de bactérias, como descrito em 3.2.1.5.5, foram transfectados em leveduras AH109 transformadas com a quimera BD-PDE2A de acordo com o protocolo descrito na seção 3.2.1.5.1. A triagem utilizando os clones AD isolados foi realizada utilizando o mesmo protocolo da triagem inicial utilizando a biblioteca de cDNA de cérebro humano, descrito em 3.2.1.5.3.

As colônias de leveduras que cresceram em meio SC-dropout -4 após a retransformação, tiveram o DNA isolado, purificado e amplificado de acordo com os procedimentos descritos nas seções 3.2.6.4 e 3.2.6.5.

### 3.2.1.5.7 Análise Bioinformática

Os clones positivos isolados ao final da triagem dois-híbridos foram sequenciados e analisados utilizando o programa BLAST (*B*asic *L*ocal *A*lignment *S*earch *T*ool) disponibilizado pelo NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Foram analisadas as sequências de nucleotídeos (BLAST-N) e as sequências de aminoácidos (BLAST-P), deduzidas da sequência de nucleotídeos, utilizando o programa ExPASy-*Translate-Tool* (<http://www.expasy.org/tools/dna.htm>). Os clones com informações redundantes a partir da análise das sequências de nucleotídeo e aminoácidos foram selecionados e analisados utilizando o programa SMART (*S*imple *M*odular *A*rchitecture *R*esearch *T*ool, <http://smart.embl-heidelberg.de>) para identificação de domínios funcionais e motivos protéicos.

### 3.2.1.5.8 Seleção dos clones positivos ao final da triagem dois híbridos

Os 141 clones isolados após a retransformação, foram sequenciados e analisados como descrito na seção 3.2.1.5.7. Após a análise utilizando o programa Blast, os clones com informações discrepantes entre análise de nucleotídeos e aminoácidos, as proteínas extracelulares e as proteínas desconhecidas foram eliminados, de forma que 25 proteínas foram selecionadas como “prováveis interatoras” da PDE2A. Após vasta análise da literatura referente às 25 proteínas selecionadas, foram selecionadas 6 proteínas para serem testadas.

### **3.2.2 Métodos de Biologia Celular**

#### **3.2.2.1 Transfecção de Células COS-1**

Células COS-1 foram cultivadas em meio DMEM suplementado com FCS 10%, e penicillin/streptomycin 1% e foram transfectadas utilizando o método DEAE-Dextran. As células ( $6 \times 10^5$ ) foram distribuídas em placas de cultura de 10 cm de diâmetro, após 24 horas, foram lavadas com PBS e incubadas por 2 horas a 37°C com a mistura de transfecção que consiste de 5,7 ml de meio DMEM sem FCS, 300 µl de DEAE-dextran (solução estoque 1 mg/ml), 12 µl de cloroquina (solução estoque 100 mM) e 8 µg de DNA. Após o período de incubação, a mistura de transformação foi removida e as células foram mantidas em DMEM com 10% de FCS e 1% de penicillin/streptomycin, a 37°C, 5% de pressão de CO<sub>2</sub> e 95% de umidade.

#### **3.2.2.2 Transfecção de Células T-REx™-Hela**

Células T-REx™-Hela foram cultivadas em meio DMEM suplementado com FCS 10%, e penicillin/streptomycin 1% e foram transfectadas utilizando o reagente Metafectene. As células ( $6 \times 10^5$ ) foram distribuídas em placas de cultura de 10 cm de diâmetro. A mistura de transfecção consiste de: solução A: 8µg de DNA em 700 µl de meio DMEM sem FCS; solução B: 20 µl de metafectene em 680 µl de meio DMEM sem FCS. As soluções A e B foram misturadas, cuidadosamente agitadas e mantidas por 20 minutos à temperatura ambiente e em seguida a mistura de transfecção foi adicionada à placa de cultura. Para experimentos de imunofluorescência as células foram distribuídas em lamínulas (2 x 1 cm) sendo que, neste caso, a



mistura de transfecção consiste de: solução A: 0,6 µg de DNA em 50 µl de meio DMEM sem FCS; solução B: 1,5 µl de metafectene em 48,5 µl de meio DMEM sem FCS. As células foram mantidas a 37°C, 5% de pressão de CO<sub>2</sub> e 95% de umidade.

### **3.2.2.3 Transfecção de Células Hepa1c1c7**

Células Hepa1c1c7 foram cultivadas em meio α-MEM suplementado com FCS 10%, e penicillin/streptomycin 1% e foram transfectadas utilizando o reagente Fugene. Alíquotas do meio de cultivo contendo 3x10<sup>5</sup> células foram espalhadas em placas de cultura de 6 cm de diâmetro. Após 48 horas, foi adicionado à placa de cultura a mistura de transfecção (20 µl de Fugene, 500 µl de meio α-MEM sem FCS e 3 µg de DNA). Para experimentos de imunofluorescência as células foram espalhadas em lamínulas (2 x 1 cm) e a mistura de transfecção consistia em 4 µl de Fugene, 100 µl de meio α-MEM sem FCS e 0,6 µg de DNA. As células foram mantidas a 37°C, 5% de pressão de CO<sub>2</sub> e 95% de umidade.

## **3.2.3 Métodos Bioquímicos**

### **3.2.3.1 Expressão das proteínas fusionadas a GST**

As proteínas identificadas pela triagem dois-híbridos: fosfolipase C (PLC), HRS, Tulip, WDR13, XAP2 e TFCB foram clonadas no vetor de expressão pGEX-4T-3. Essa construção gera a expressão das proteínas citadas acima fusionadas a GST na extremidade N-terminal. Bactérias *E.coli* BL21 Star™ foram transfectadas com as construções citadas acima e cultivadas em

100 ml de meio LB (10 g/l de triptona, 5 g/l de extrato de levedura, 5 g/l de NaCl) com 100 µg/ml ampicilina a 37 °C sob agitação constante (220 rpm) até a suspensão atingir densidade ótica (D.O. 600 nm) de 0,6-0,7. Em seguida, foram adicionados 40 µl de solução de IPTG 1M e a cultura permanecia sob incubação a 37 °C/220 rpm por 4 horas. As células foram coletadas por centrifugação (5000 x g/10 minutos/4°C), ressuspensas em 10 ml de tampão de lise (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM pH 8,0, NaCl 300 mM, lisosima 1 mg/ml, 1 mM de PMSF, 1 µg/ml de leupeptina, 2 µg/ml de aprotinina), mantidas no gelo por 1 hora e sonicadas 10 vezes por 10 segundos. O lisado foi centrifugado (12000 x g/40 minutos/4°C) e utilizado para a purificação das proteínas recombinantes em resina glutationa-sepharose.

#### **3.2.3.1.1 Purificação das proteínas fusionadas a GST em Resina Glutaciona-Sepharose**

Os lisados de bactérias contendo as proteínas recombinantes fusionadas à GST foram incubados a 4°C, por 1 hora com 100 µl da suspensão da resina glutaciona-sepharose e mantida sob constante agitação. A resina foi lavada quatro vezes (por ciclos de centrifugação) com tampão de lise e armazenada a 4°C, por no máximo três dias.

Para os ensaios de atividade enzimática da PDE2A, as GST-proteínas: GST-XAP2, GST-N-xap2, GST-C-xap2 ou GST foram eluídas da resina glutaciona-sepharose com uma solução de glutaciona reduzida (GSH) 10 mM em tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,5. A GSH foi removida por diálise contra tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, utilizando membrana com limite de exclusão de 10.000 Da. A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

### 3.2.3.2 Ensaios GST Pull-down

Células COS-1 foram transfectadas com VSV-PDE2A. Após 48 horas as células foram lisadas com tampão de lise (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,12 mM DTT, 50 µM cloroquina, 2 µg/ml aprotinina, 1 µg/ml leupeptina, 1 µg/ml PMSF), o lisado centrifugado (12000 x g/20 minutos/4°C) e uma alíquota de 1 ml do lisado foi incubada com 10 µl de cada uma das GST-proteínas (secção 3.2.3.1.1) ligadas a resina GSH-sepharose por 3 horas a 4°C sob rotação constante. Após o período de incubação, a resina foi lavada quatro vezes (por ciclos de centrifugação) com tampão de lise. As proteínas foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 10%), transferidas para membrana de nitrocelulose 0,45 µm (Schleider & Schuell, Kassel, Alemanha) e imunocoradas utilizando anti-VSV como anticorpo primário e anti-Camundongo-IgG Peroxidase-conjugado, como anticorpo secundário. As bandas de proteína foram reveladas utilizando o kit ECL *western blotting detection reagents* e expondo a membrana a um filme de raio-X.

### 3.2.3.3 Ensaios de Co-imunoprecipitação

Células COS-1 foram co-transfectadas com VSV-PDE2A e FLAG-XAP2 ou com VSV-PDE2A e pcDNA3-HRS (HRS fusionada a myc). Após 48 horas da transfecção, as células foram lisadas com 1 ml de tampão de lise (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,12 mM DTT, 50 µM cloroquina, 2 µg/ml aprotinina, 1 µg/ml leupeptina, 1 µg/ml PMSF). A imunoprecipitação foi realizada incubando 1 µl de anticorpo anti-FLAG M2 (imunoprecipita Flag-XAP2) ou 1 µl de anticorpo anti-myc (imunoprecipita HRS) por duas horas a 4°C sob rotação constante, seguida da

adição de 10  $\mu$ l da suspensão agarose-proteína A/G. A resina de agarose foi lavada quatro vezes com tampão de lise e as proteínas foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 10%), transferidas para membrana de nitrocelulose 0,45  $\mu$ m (Schleider & Schuell, Kassel, Alemanha) e imunocoradas utilizando anti-VSV como anticorpo primário e anti-Camundongo-IgG Peroxidase-conjugado, como anticorpo secundário. As bandas de proteína foram reveladas utilizando o kit ECL *western blotting detection reagents* e expondo a membrana a um filme de raio-X.

### 3.2.3.4 Ensaio de Atividade Fosfodiesterásica

Para os ensaios de atividade catalítica da PDE2A foi utilizado o kit de quimioluminescência PDELIGHT™ baseado na reação de oxidação da luciferina pela luciferase. A hidrólise de cAMP pela PDE2A gera AMP que é fosforilado a ATP, fornecendo energia para a reação luciferina/luciferase com consequente emissão de luz. A luz emitida é diretamente proporcional a quantidade de AMP gerado pela hidrólise de cAMP.

Células COS-1 (5 placas de 10-cm cada) transfectadas com VSV-PDE2A ou com o vetor pSG8 (mock) vazio foram lisadas com 5 ml de tampão de lise; PDE2A foi imunoprecipitada com 10  $\mu$ l de anticorpo anti-VSV por duas horas, seguida da adição de 200  $\mu$ l da suspensão agarose-proteína A/G. Os grânulos de agarose foram lavados quatro vezes (por ciclos de centrifugação) com tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,5. Os grânulos de agarose-proteína A/G contendo PDE2A imobilizada foram utilizados para os experimentos de atividade catalítica da enzima imobilizada. Cinco  $\mu$ l da suspensão de grânulos contendo PDE2A imobilizada (aproximadamente 2,5 nM, concentração final no ensaio) foram incubados com 125 nM de cada uma das GST-proteínas: GST-XAP2, GST-Cxap2, GST-N-xap2 ou GST em tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, MgCl<sub>2</sub> 5 mM por 10 minutos à temperatura

ambiente, seguido pela adição de cAMP 25  $\mu$ M (concentração final no ensaio) e incubação de uma hora a 30°C. Após o tempo de incubação, a reação foi interrompida e a luminiscência medida usando um leitor de microplaca de 96-poços Wallac Victor<sup>3</sup> 1420 Multilabel Counter (Perkin Elmer, USA).

### 3.2.3.5 Ensaio de Fosforilação *in vitro* por PKA e PKG

Células COS-1 foram transfectadas com o plasmídio contendo FLAG-Ahr. Após dois dias, as células foram lavadas duas vezes com PBS e lisadas com 1 ml de tampão de lise. Ahr foi precipitado com anticorpo anti-FLAG M2 e agarose-proteína A/G. A reação de fosforilação *in vitro* foi realizada pela incubação de Ahr imobilizado em agarose-proteína A/G com 50 ng da subunidade catalítica da proteína quinase A (PKA) ou 50 ng de proteína quinase G (PKG) (ambas previamente purificadas de acordo com Smolenski et al, 2000) em tampão contendo 10 mM HEPES (pH 7,4), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 0,2 mM EDTA, 4 mM ATP, 1  $\mu$ Ci de [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP, por 30 minutos a 30°C, em volume total de reação de 25  $\mu$ l. A reação foi interrompida com a adição de 12,5  $\mu$ l de tampão de amostra SDS-PAGE 3X e imediatamente fervida por cinco minutos. A análise da expressão de Ahr foi realizada por *Western Blot* utilizando anticorpo anti-FLAG M2 seguido de anticorpo secundário anti-camundongo acoplado à peroxidase e ECL reagente. Em seguida, a membrana de nitrocelulose foi lavada para retirar o reagente ECL e a incorporação de <sup>32</sup>P em Ahr foi analisada por autoradiografia por 24 horas a -80°C. Rap1Gap2 foi utilizado como controle positivo da reação de fosforilação por PKA e PKG.

### **3.2.4 Métodos Microscópicos**

#### **3.2.4.1 Ensaios de co-localização entre PDE2A e XAP2 em células Hela**

Células Hela ( $0,6 \times 10^5$  células/ml/compartimento) foram mantidas por 24 horas em lamínulas com 4 compartimentos, a  $37^\circ\text{C}$  and 5%  $\text{CO}_2$  e em seguida transfectadas com os plasmídeos codificando VSV-PDE2A e myc-XAP2. Um dia após a transfecção, as células foram fixadas com solução de paraformaldeído 3,7%, permeabilizadas com tampão PBS contendo 0,2% de Triton X-100, incubadas com anticorpos primários anti-VSV (camundongo) e anti-myc (coelho) por uma hora a  $37^\circ\text{C}$ , seguido da incubação com anticorpos secundários conjugados à carbocianina (Cy2-anti-camundongo e Cy3-anti-coelho). As lamínulas foram lavadas com PBS e as células analisadas em microscópio laser confocal Zeiss LSM 510 equipado com objetivas Plan-Apochromat 63 /1.4 óleo DIC e software LSM 510 META (Carl Zeiss)

#### **3.2.4.2 Ensaios de Migração de Ahr para o Núcleo em Células Hepa1c1c7**

Células Hepa1c1c7 ( $0,3 \times 10^5$  células/ml/compartimento) foram mantidas por 48 horas em lamínulas com quatro compartimentos, a  $37^\circ\text{C}$  and 5%  $\text{CO}_2$  e em seguida transfectadas com os plasmídeos codificando VSV-PDE2A. Vinte e quatro horas após a transfecção, as células foram tratadas com TCDD 5 nM, forskolin 20  $\mu\text{M}$  ou 8-Br-cAMP 2mM por 1 hora a  $37^\circ\text{C}$ . Em seguida as células foram fixadas com solução de paraformaldeído 3,7%, permeabilizadas com tampão PBS contendo 0,2% de Triton X-100, incubadas com anticorpos primários anti-VSV (camundongo) e anti-Ahr (cabra) por duas

horas a 37°C, seguido da incubação com anticorpos secundários conjugados à carbocianina (Cy2-anti-camundongo e Cy3-anti-cabra). As lamínulas foram lavadas com PBS e as células analisadas em microscópio laser confocal Zeiss LSM 510 equipado com objetivas Plan-Apochromat 63 /1.4 óleo DIC e software LSM 510 META (Carl Zeiss). Para avaliação quantitativa do efeito da enzima PDE2A sobre a migração de Ahr para o núcleo foram analisadas de 70 a 200 células individualmente, de pelo menos três experimentos diferentes. As células exibindo uma marcação para Ahr distribuídas no citoplasma e núcleo foram designadas “difusa” enquanto que as células exibindo uma marcação para Ahr exclusiva ou basicamente nuclear foram designadas “nuclear”.

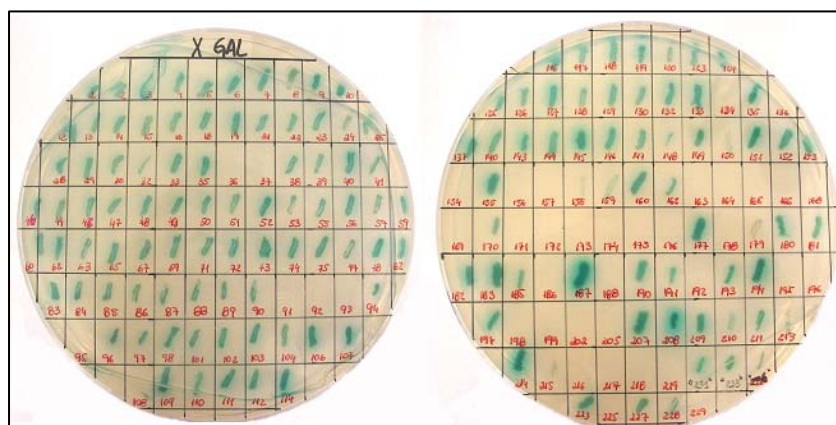
## 4. RESULTADOS

### 4.1 Triagem Dois-Híbridos em Leveduras para Identificação de Interatores da PDE2A

Para identificar proteínas interatoras da enzima PDE2A, foi realizada uma triagem dois-híbridos em leveduras *Sacharomices cerevisiae*. Para isso, PDE2A humana foi utilizada como “isca” e uma biblioteca de cDNA de cérebro humano foi analisada. PDE2A foi clonada no vetor de expressão pGBKT7, construção essa que gera uma proteína híbrida constituída pelo domínio de ligação (PDE2A-BD) do fator de transcrição GAL4 fusionada a porção N-terminal da enzima PDE2A. A biblioteca de cDNA analisada na triagem foi clonada no vetor de expressão pACT2, uma construção que gera proteínas híbridas constituídas pelo domínio de ativação (AD)-Biblioteca de cDNA do fator de transcrição Gal4. Os clones positivos na triagem dois-híbridos foram retransformados em *S. cerevisiae* e as leveduras foram plaqueadas em meio dropout -4 contendo o substrato X-Gal. As colônias azuis indicam clones positivos quanto a expressão do gene repórter da  $\beta$ -galactosidase. A figura 10 mostra os 141 clones X-Gal positivos obtidos ao final da triagem.

Os clones positivos foram sequenciados e analisados como descrito na seção 3.2.6.7. A tabela 2 mostra os resultados da triagem dois-híbridos e a tabela 3, a listagem das proteínas selecionadas como interatora da enzima PDE2A





**Figura 10: Triagem Y2H.** As colônias que cresceram após retransformação com o plasmídeo AD isolado da triagem inicial foram coletadas, numeradas e plaqueadas em meio SC-dropout -4 agar contendo x- $\alpha$ -Gal, substrato da enzima  $\beta$ -galactosidase. O substrato cromogênico x- $\alpha$ -Gal foi hidrolisado pelas colônias de leveduras que expressaram o gene repórter da enzima  $\beta$ -galactosidase e tornaram-se azul.

Tabela 2: Resultados da triagem dois-híbridos utilizando PDE2A como “isca”.

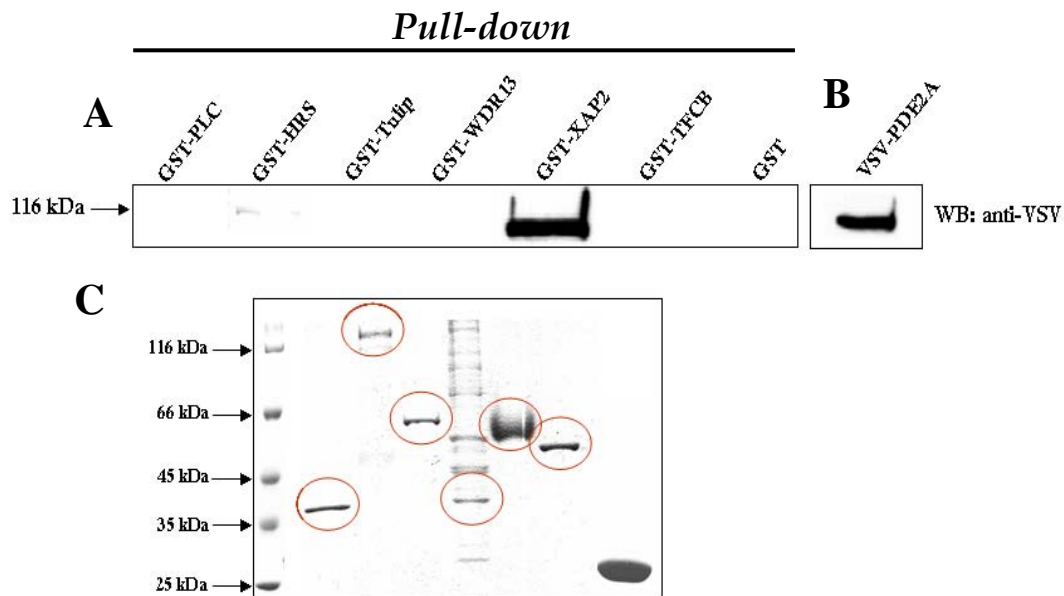
Parâmetro	Número
clones independentes da biblioteca de cDNA	3,5x10 <sup>6</sup>
colônias isoladas	236
colônias X-Gal positivas	192
colônias após retransformação	148
colônias X-Gal positivas	141
prováveis interatores	25
clones testados	6

Tabela 3: Proteínas identificadas na triagem dois-híbridos.

Nome
fosfolipase C delta 1 (PLC)
<i>hepatocyte growth factor-reg. tyr kinase substrate</i> (HRS)
GARNL1/proteína tipo tuberina (TULIP1)
WDR13
HBV-X associated protein (XAP2)
co-fator B de enovelamento de tubulina (TFCB)

#### 4.2 Ensaio GST *Pull-down* com as proteínas identificadas na triagem dois-híbridos em leveduras

Para confirmar a interação de PDE2A com as proteínas identificadas na triagem dois-híbridos, o cDNA das proteínas indicadas na tabela 2 e isolados de acordo com os procedimentos descritos nas seções 3.2.1.5.4 e 3.2.1.5.5 foram clonados no vetor de expressão de proteínas em bactérias *E. coli*, pGEX-4T-3. Essas construções geraram proteínas híbridas, fusionadas ao C-terminal da GST. Os experimentos GST *Pull-down* foram realizados utilizando lisado de células COS-1 transfectadas com cDNA da enzima PDE2A. A figura 11 mostra que apenas duas, das seis proteínas testadas, interagem com PDE2A. A figura 11A mostra a fraca interação entre *hepatocyte growth factor-reg. tyr kinase substrate* (HRS) e a forte interação entre HBV-X associated protein (XAP2). Como controle negativo foi utilizado GST para o qual não foi detectada ligação de GST à PDE2A. A figura 11B mostra o controle da expressão de PDE2A no lisado de células COS-1 utilizado no ensaio GST *Pull-down* enquanto que a figura 11C mostra a quantidade de cada GST-proteína utilizada no ensaio.



**Figura 11: Ensaio GST Pull-down com as proteínas identificadas na triagem dois-híbridos.** A: As GST-proteínas ligadas à GSH-sepharose foram incubadas, (60 min. a 4°C) com lisado de células COS-1 expressando PDE2A. Os grânulos de sepharose foram lavados com tampão de lise e analisados por *Western blot* utilizando anticorpo anti-VSV; B: *Western blot* controle da expressão de PDE2A no lisado de células COS-1 utilizado no experimento GST Pull-down mostrado em A; C: quantidade de cada GST-proteína utilizada no experimento mostrado em A. Corante de Ponceau

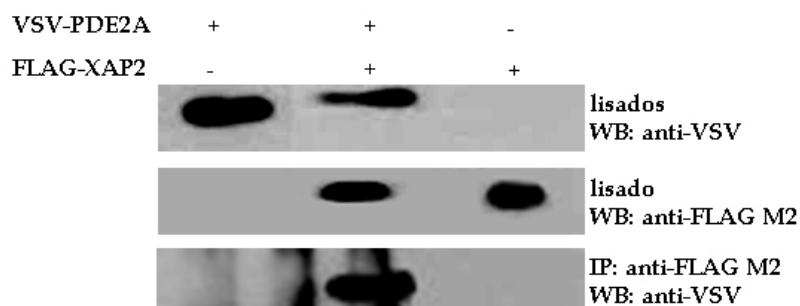
### **4.3 Interação de PDE2A/HRS e PDE2A/XAP2 em células COS-1 intactas.**

Para confirmar a interação entre PDE2A/XAP2 e PDE2A/HRS em células intactas, foram realizados ensaios de co-imunoprecipitação. Para isso, células COS-1 foram co-transfectadas com os plasmídeos contendo VSV-PDE2A/myc-HRS ou com os plasmídeos contendo VSV-PDE2A/flag-XAP2 e o ensaio de co-imunoprecipitação foi feito como descrito na seção 3.2.3.3. As figuras 12 e 13 mostram que FLAG-XAP2 e myc-HRS, respectivamente, foram capazes de precipitar VSV-PDE2A indicando que a interação entre PDE2A/XAP2 e PDE2A/HRS ocorre em células intactas.

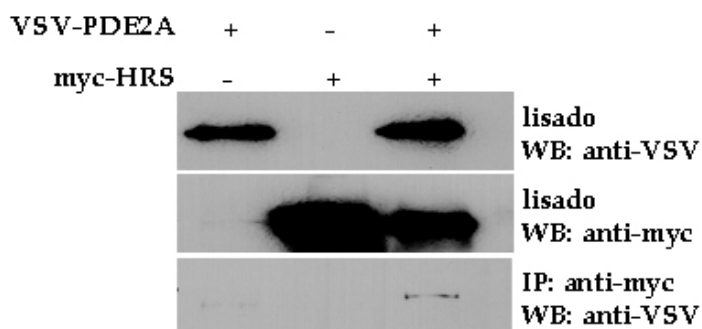
### **4.4 Interação de PDE2A com XAP2 endógeno.**

Para checar a interação entre PDE2A e XAP2 endógeno, foram realizados ensaios de co-imunoprecipitação em células Hepa1c1c7. As células Hepa1c1c7 são uma linhagem de células de hepatoma de camundongo que expressam constitutivamente Ahr e XAP2.

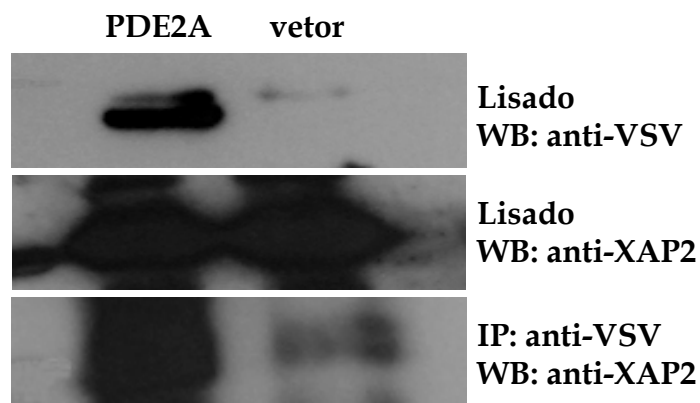
Hepa1c1c7 foram transfectadas com plasmídeo contendo VSV-PDE2A ou com vetor vazio, como descrito na seção 3.2.2.3. Após a transfecção, as células foram lisadas, PDE2A foi imunoprecipitada com anticorpo anti-VSV e analisada por Western blot utilizando anticorpo anti-XAP2. A figura 14 mostra que PDE2A foi capaz de ligar XAP2 endógeno, constitutivamente expresso em células Hepa1c1c7.



**Figura 12: Ensaio de Co-imunoprecipitação entre PDE2A/XAP2.** Células COS-1 foram co-transfectadas com VSV-PDE2A e FLAG-XAP2. Decorridos 48h após a transfecção as células foram lisadas e XAP2 foi imunoprecipitado com anticorpo anti-FLAG M2 por 2 horas a 4°C seguido por incubação com agarose-proteína A/G por 1 hora a 4°C. Os precipitados foram lavados e analisados por Western blot usando anticorpo anti-VSV. Experimento típico de 5 repetições.



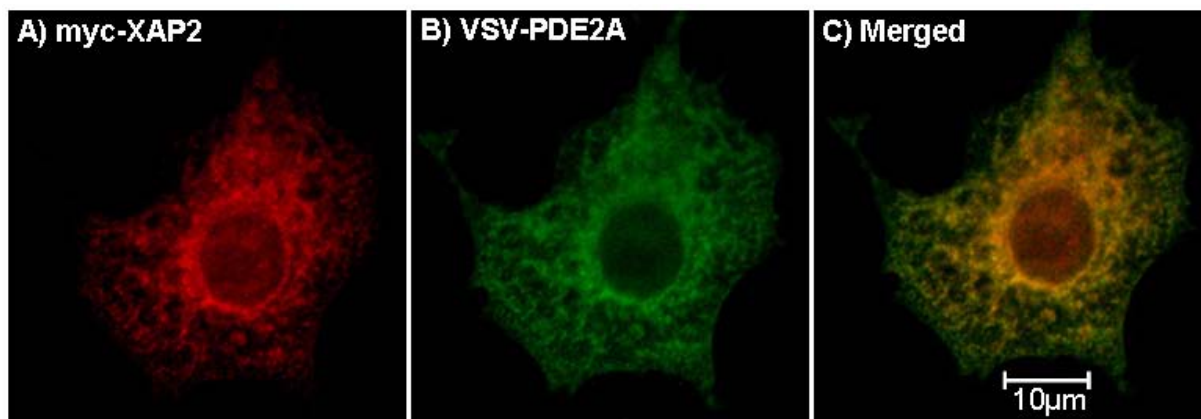
**Figura 13: Ensaio de Co-imunoprecipitação entre PDE2A/HRS.** Células COS-1 foram co-transfectadas com VSV-PDE2A e myc-HRS. Decorridos 48 após a transfecção as células foram lisadas e HRS foi imunoprecipitado com anticorpo anti-myc por 2 horas a 4°C seguido por incubação com agarose-proteína A/G por 1 hora a 4°C. Os precipitados foram lavados e analisados por Western blot usando anticorpo anti-VSV. Experimento típico de 3 repetições.



**Figura 14: Interação de PDE2A com XAP2 endógeno.** Células Hepa1c1c7 foram transfectadas com VSV-PDE2A ou com vetor vazio. Após a transfecção as células foram lisadas e PDE2A foi imunoprecipitado com anticorpo anti-XAP2 por 2 horas a 4°C seguido por incubação com agarose-proteína A/G por 1 hora a 4°C. Os precipitados foram lavados e analisados por *Western blot* usando anticorpo anti-XAP2. Experimento típico de 3 repetições.

#### 4.5 Co-localização de PDE2A e XAP2 em células Hela

Para investigar a localização subcelular de PDE2A e XAP2 foram realizados experimentos de microscopia de imunofluorescência confocal. Células Hela foram co-transfectadas com plasmídeos contendo VSV-PDE2A e myc-XAP2. O ensaio foi realizado como descrito na seção 3.2.4.1. A figura 15 mostra que PDE2A e XAP2 localizam-se no citoplasma de forma reticulada com distribuição homogeneamente similar das duas proteínas, mostrando, claramente a co-localização sub-celular dessas duas proteínas em células Hela (figura 15C).



**Figura 15. Ensaio de co-localização entre PDE2A e XAP2 em Células Hela.** Células Hela foram co-transfectadas com myc-XAP2 e VSV-PDE2A. Após 24 horas da transfecção, as células foram fixadas, permeabilizadas e incubadas com os anticorpos primários anti-myc (coelho) e anti-VSV (camundongo), seguido de incubação com os anticorpos secundários (Cy3-anti-coelho e Cy2-anti-camundongo). As células foram analisadas por microscopia confocal. Os quadros A e B mostram myc-XAP2 em vermelho e VSV-PDE2A em verde, respectivamente. O quadro C é a sobreposição dos quadros A e B. A região amarela indica co-localização entre as duas proteínas. *Merged*: sobreposição.

#### 4.6 A região contendo o domínio GAF B da PDE2A é responsável pela ligação com XAP2

Para identificar a região da PDE2A envolvida na ligação com XAP2 foram geradas, por mutagênese sítio-dirigida, construções contendo os diferentes domínios da enzima como descrito na seção 3.2.1.4. Uma cauda VSV foi fusionada a cada uma das construções da PDE2A. A figura 16A mostra de forma esquemática as diferentes construções utilizadas no ensaio *GST Pull-down* com GST-XAP2. A figura 16B mostra que apenas as construções contendo os domínios GAF A/B e a contendo o domínio GAF B foram capazes de ligar XAP2 com a mesma intensidade que PDE2A, enquanto que as construções contendo a região N-terminal e a contendo apenas o domínio GAF

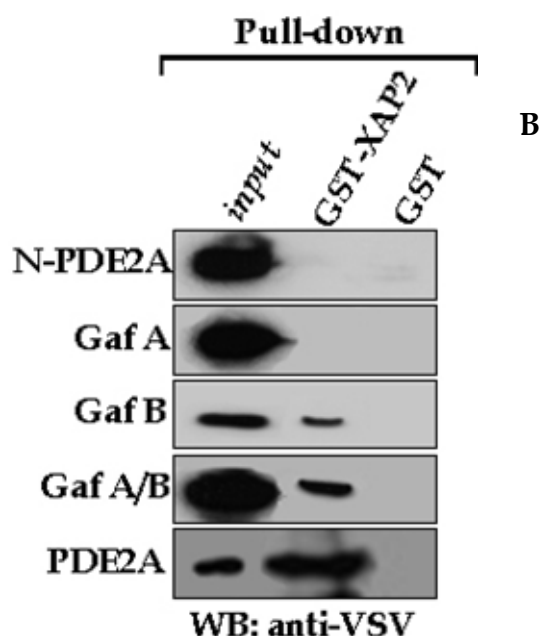
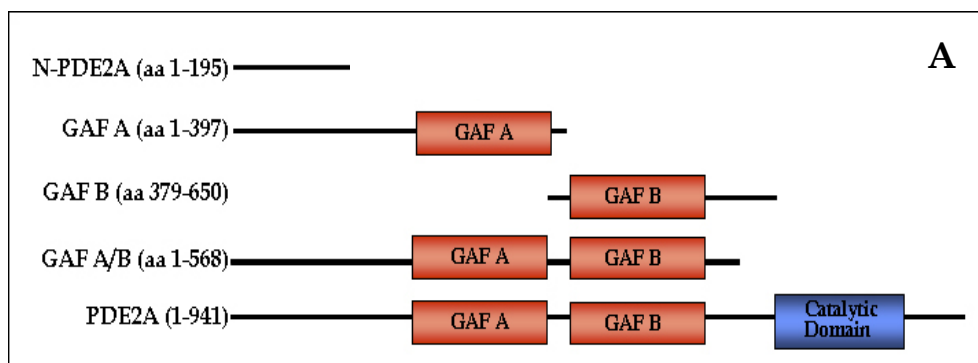
A não ligam XAP2, indicando que a região contendo o domínio GAF B é suficiente para a ligação de PDE2A a XAP2.

#### **4.7 Influência de cGMP na interação entre PDE2A e XAP2**

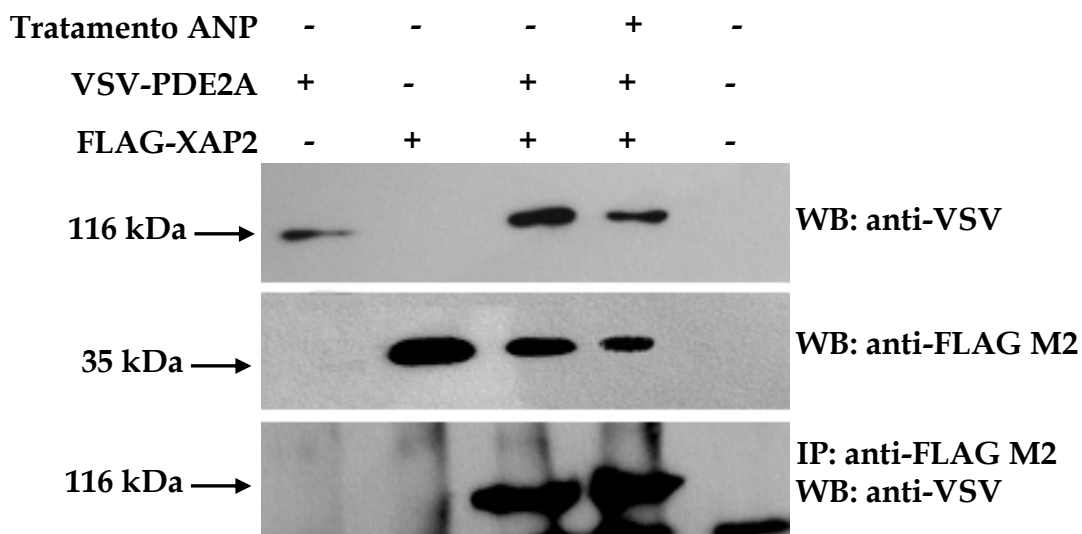
PDE2A hidrolisa tanto cAMP quanto cGMP, no entanto quando cGMP liga o domínio GAF B da enzima, a atividade catalítica é estimulada na ordem de 10 vezes. Já o ANP é um peptídeo com ação vasodilatadora que interfere no tônus da musculatura lisa através da ativação da guanilato ciclase com consequente elevação da concentração de cGMP e ativação da proteína quinase G (PKG) (Rybalkin *et al*, 2003). Em células da zona glomerulosa, a elevação da concentração de cGMP induzida por ANP estimula a ação de PDE2A e o decréscimo da concentração de cAMP com consequente inibição da produção e secreção de aldosterona (MacFarland, 1991).

Considerando que XAP2 liga o domínio GAF B ou uma região próxima ao domínio GAF B da enzima PDE2A, foram feitos experimentos de co-immunoprecipitação entre PDE2A e XAP2, em células tratadas com ANP, com o objetivo de determinar se o aumento da concentração de cGMP influenciaria a interação entre PDE2A e XAP2. A figura 17 mostra que a interação entre PDE2A e XAP2 não foi alterada pelo aumento da concentração de cGMP em células COS-1 em cultura, indicando que o aumento na concentração de cGMP não interfere na interação entre PDE2A e XAP2.





**Figura 16. A região contendo o domínio GAF B da PDE2A é responsável pela ligação com XAP2.** A) o esquema mostra a organização dos domínios da PDE2A e indica o tamanho das diferentes construções utilizadas no experimento mostrado em B; B) células COS-1 foram transfectadas com as diferentes construções indicadas em A. 48 horas após a transfecção, as células foram lisadas (*input*) e incubadas com GST-XAP2 ou GST acopladas aos grânulos de GSH-sepharose por 4 horas a 4°C. Os grânulos foram lavados por 4 vezes com tampão de lise antes da adição de tampão de amostra SDS-PAGE e fervidas. As proteínas foram resolvidas por SDS-PAGE 10% e identificadas por *imunoblot* com anticorpo anti-VSV. Experimento típico de 3 repetições.

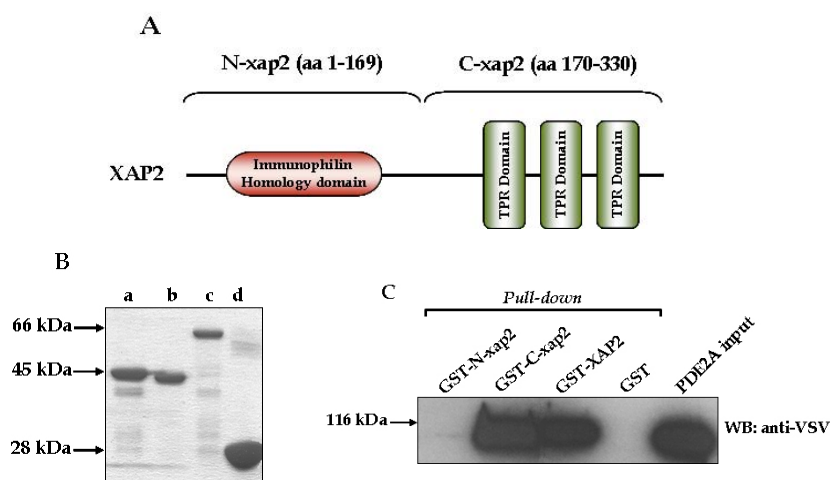


**Figura 17: A interação entre PDE2A e XAP2 não é influenciada pelo aumento na concentração de cGMP.** Células COS-1 foram co-transfectadas com VSV-PDE2A, FLAG-XAP2 e com o receptor de ANP, GC-A. Após a transfecção as células foram tratadas com ANP 5nM por 10 minutos a 37°C e lisadas. XAP2 foi imunoprecipitado com anticorpo anti-FLAG-M2 por 2 horas a 4°C seguido por incubação com agarose-proteína A/G por 1 hora a 4°C. Os precipitados foram lavados e analisados por Western blot usando anticorpo anti-VSV. Experimento típico de 3 repetições.

#### 4.8 Ligação de PDE2A à região C-terminal de XAP2

A região N-terminal de XAP2 contém um domínio de homologia às imunofilinas, enquanto que a região C-terminal de XAP2 contém domínios TPR. Para identificar a região em XAP2 responsável pela ligação a PDE2A, foram geradas duas construções truncadas de XAP2 fusionadas à GST (figura 18A). Uma construção contém a região N-terminal (GST-N-xap2) e a outra contém a região C-terminal (GST-C-xap2) de XAP2. As proteínas foram expressas em bactérias *E. coli*, purificadas com Sepharose-GSH e utilizadas para experimentos GST Pull-down com lisados de células COS-1 transfectadas

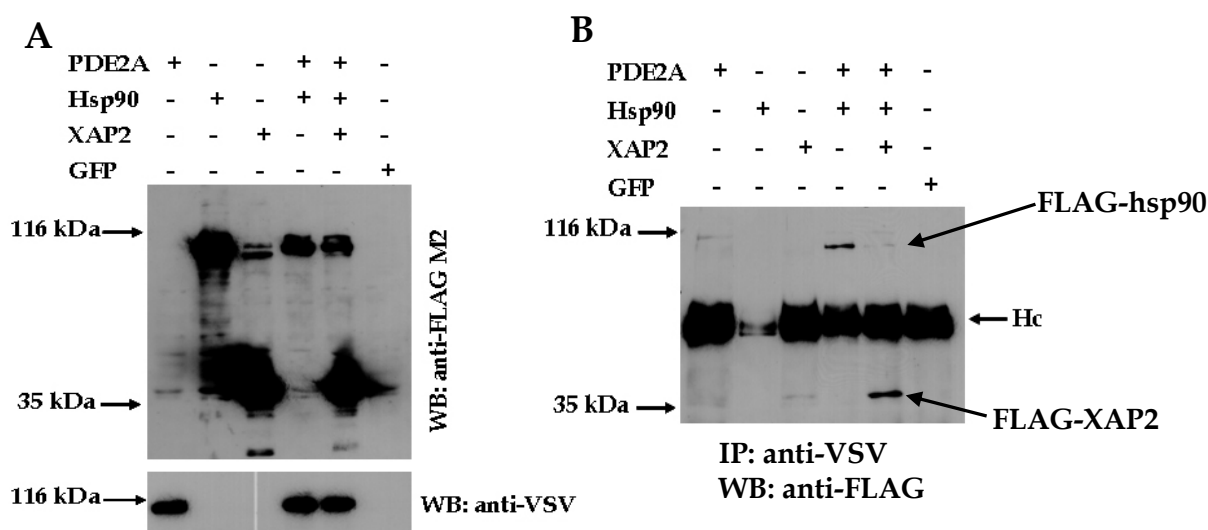
com VSV-PDE2A. GST-XAP2 e GST foram utilizados como controles positivo e negativo, respectivamente. A figura 18B apresenta a análise em SDS-PAGE, mostrando que cada mutante migrou de acordo com a massa molecular esperada. A figura 18C mostra que apenas GST-C-xap2 e GST-XAP2 foram capazes de ligar PDE2A, enquanto que GST-N-xap2 e GST mostraram-se desprovidas de tal atividade. Os resultados indicam que a região C-terminal de XAP2 é responsável pela interação com PDE2A, provavelmente através dos motivos TPR. O domínio TPR é formado por motivos estruturais presentes em inúmeras proteínas e que estão comumente envolvidos em interações proteína/proteína e na formação de complexos multiprotéicos (Lamb et al, 1995 and D'Andrea and Regan 2003).



**Figura 18: PDE2A liga-se à região C-terminal de XAP2.** A) representação esquemática dos domínios de XAP2, indicando as regiões amino- (N-xap2) e carboxi-terminal (C-xap2) utilizadas nos experimentos mostrado na figura C; B) SDS-PAGE das proteínas fusionadas à GST coradas com Coomassie brilhante blue. Linha a: GST-Nxap2, b: GST-C-xap2, c: GST-XAP2 e d: GST; C) Células COS-1 foram transfectadas com VSV-PDE2A, 48 horas após a transfecção as células foram lisadas (PDE2A *input*) e incubadas com GST-Nxap2, GST-Cxap2, GST-XAP2 e GST. As proteínas precipitadas foram analisadas por SDS-PAGE e PDE2A ligada foi identificada por *imunoblot* com anticorpo anti-VSV. Experimento típico de 3 repetições.

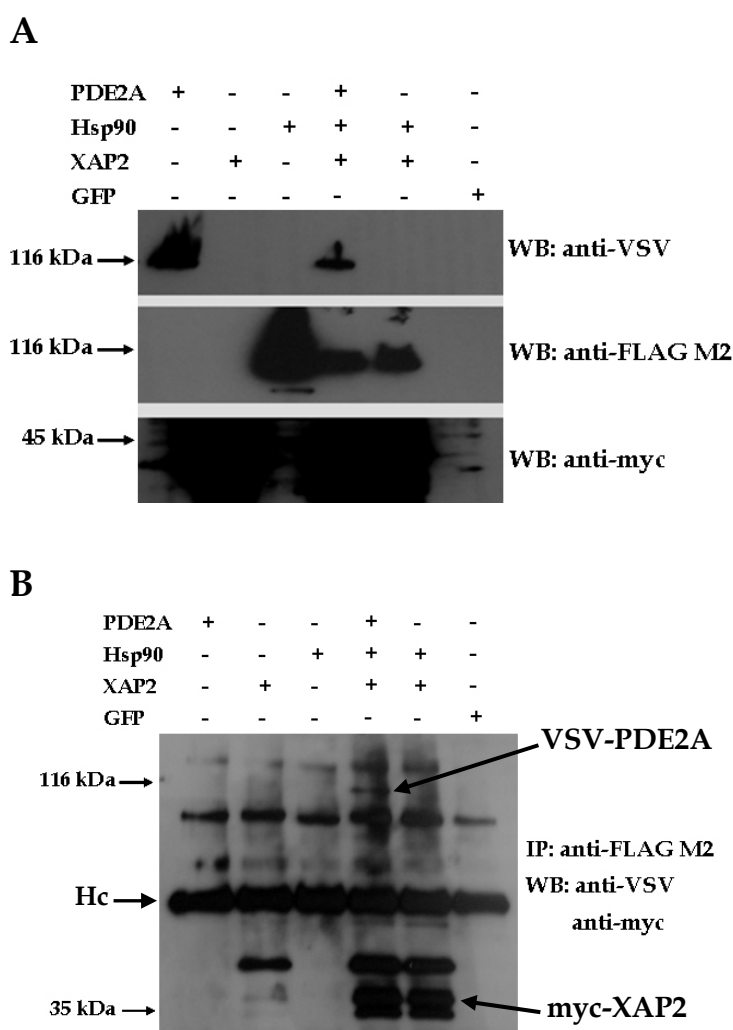
#### 4.9 PDE2A faz parte do complexo Ahr.

Ahr é um fator de transcrição ativado pela presença de ligante que pertence à família de proteínas PAS e localiza-se no citoplasma como um complexo multiprotéico formado por XAP2, um dímero de hsp90, p23 e Ahr (Meyer and Perdew, 1999). Para determinar se PDE2A faz parte do complexo Ahr foram realizados ensaios de co-imunoprecipitação na presença dos componentes do complexo (XAP2 e hsp90). A figura 19 mostra que PDE2A liga não apenas XAP2, mas também a chaperona hsp90. No entanto, na presença de XAP2, PDE2A liga preferencialmente XAP2, indicando que PDE2A faz parte do complexo Ahr.



**Figura 19: PDE2A liga hsp90.** A) Células COS-1 foram co-transfectadas com VSV-PDE2A, FLAG-hsp90 e FLAG-XAP2. Após transfecção as células foram lisadas e a expressão das proteínas foi analisada por *Western blot* utilizando anticorpos anti-FLAG M2 e anti-VSV; B) PDE2A foi imunoprecipitada do lisado das células COS-1, analisado em A, com anticorpo anti-VSV e agarose-proteína A/G. Os precipitados foram lavados e analisados em SDS-PAGE seguido por *imunoblot* utilizando anticorpo anti-FLAG M2.

Para saber se XAP2 liga PDE2A e hsp90 ao mesmo tempo, foi gerada uma construção em que XAP2 está fusionado à cauda myc na porção N-terminal da proteína e, em seguida foram realizados ensaios de co-imunoprecipitação. A figura 20B mostra que hsp90 foi capaz de imunoprecipitar PDE2A e XAP2 com a mesma intensidade, sugerindo que PDE2A faz parte do complexo multiprotéico Ahr e não compete pela ligação com XAP2.



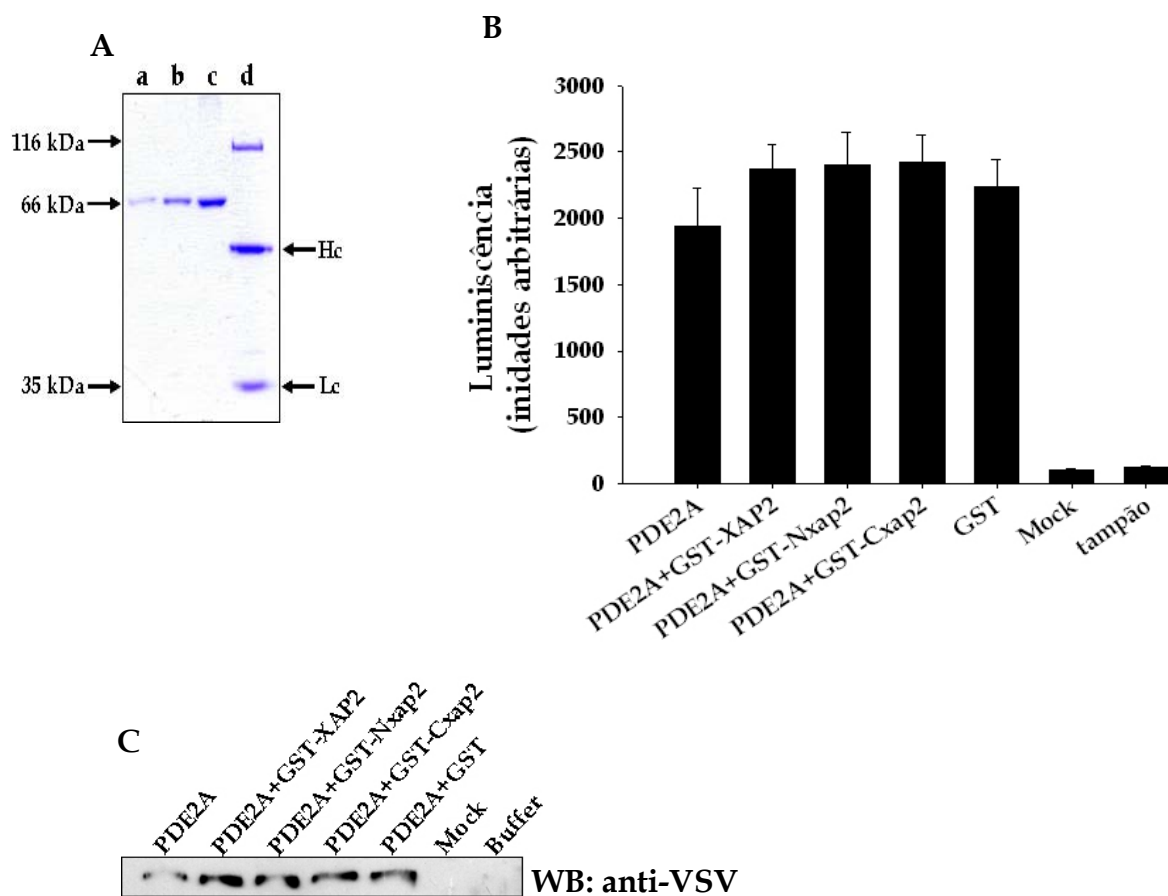
**Figura 20: PDE2A faz parte do complexo Ahr.** A) Células COS-1 foram co-transfectadas com VSV-PDE2A, FLAG-hsp90 e myc-XAP2. Após transfecção as células foram lisadas e as expressões das proteínas foram analisadas por *Western blot* utilizando anticorpos anti-VSV, anti-FLAG M2 e anti-myc; B) FLAG-hsp90 foi imunoprecipitada do lisado das células COS-1, analisado em A, com anticorpo anti-FLAG M2 e agarose-proteína A/G. Os precipitados foram lavados e analisados em SDS-PAGE seguido por *imunoblot* utilizando anticorpo anti-VSV. A membrana de nitrocelulose foi lavada e imunomarcada com anticorpo anti-myc.

#### 4.10 Influência de XAP2 na atividade catalítica de PDE2A.

Para analisar possíveis consequências funcionais da interação entre PDE2A e XAP2, a atividade catalítica da PDE2A foi medida *in vitro* na presença e ausência de XAP2 e dos mutantes truncados de XAP2. Para isso, VSV-PDE2A foi expressa em células COS-1 e purificada do lisado celular, por imunoprecipitação, utilizando anticorpo anti-VSV seguido de incubação com grânulos de agarose-proteína A/G. O grau de pureza da preparação foi estimado por SDS-PAGE. Concentrações crescentes de BSA foram analisadas no mesmo gel, para estimar a concentração de PDE2A (Figura 21A). XAP2, N-xap2 e C-xap2 fusionados à GST foram expressos em bactérias *E. coli* seguido da purificação em resina de afinidade, como descrito na seção 3.2.3.1.1. A figura 21 mostra que XAP2, N-xap2 ou C-xap2 não interferiram na atividade catalítica da PDE2A, mesmo em excesso molar em torno de 50 vezes, concluindo que XAP2 liga PDE2A sem afetar sua atividade catalítica.

#### 4.11 Influência de PDE2A no deslocamento do complexo Ahr para o núcleo.

O complexo multiprotéico Ahr é formado por XAP2, um dímero de hsp90, p23 e Ahr. A ligação de compostos xenobióticos, como TCDD, à Ahr provoca o deslocamento do complexo para o núcleo, onde o complexo se desfaz. Ahr dimeriza-se com uma proteína chamada Arnt, e o dímero Ahr-Arnt regula a expressão de genes envolvidos em processos de detoxificação (Meyer and Perdew *et al*, 1999). Recentemente foi demonstrado que cAMP induz o deslocamento de Ahr para o núcleo (Oesch-Bartlomowicz *et al*, 2005). Para avaliar se a ligação de PDE2A à XAP2 influencia o deslocamento do complexo Ahr para o núcleo foram utilizadas células Hepa1c1c7 que expressam Ahr e XAP2 constitutivamente. As células foram transfectadas com



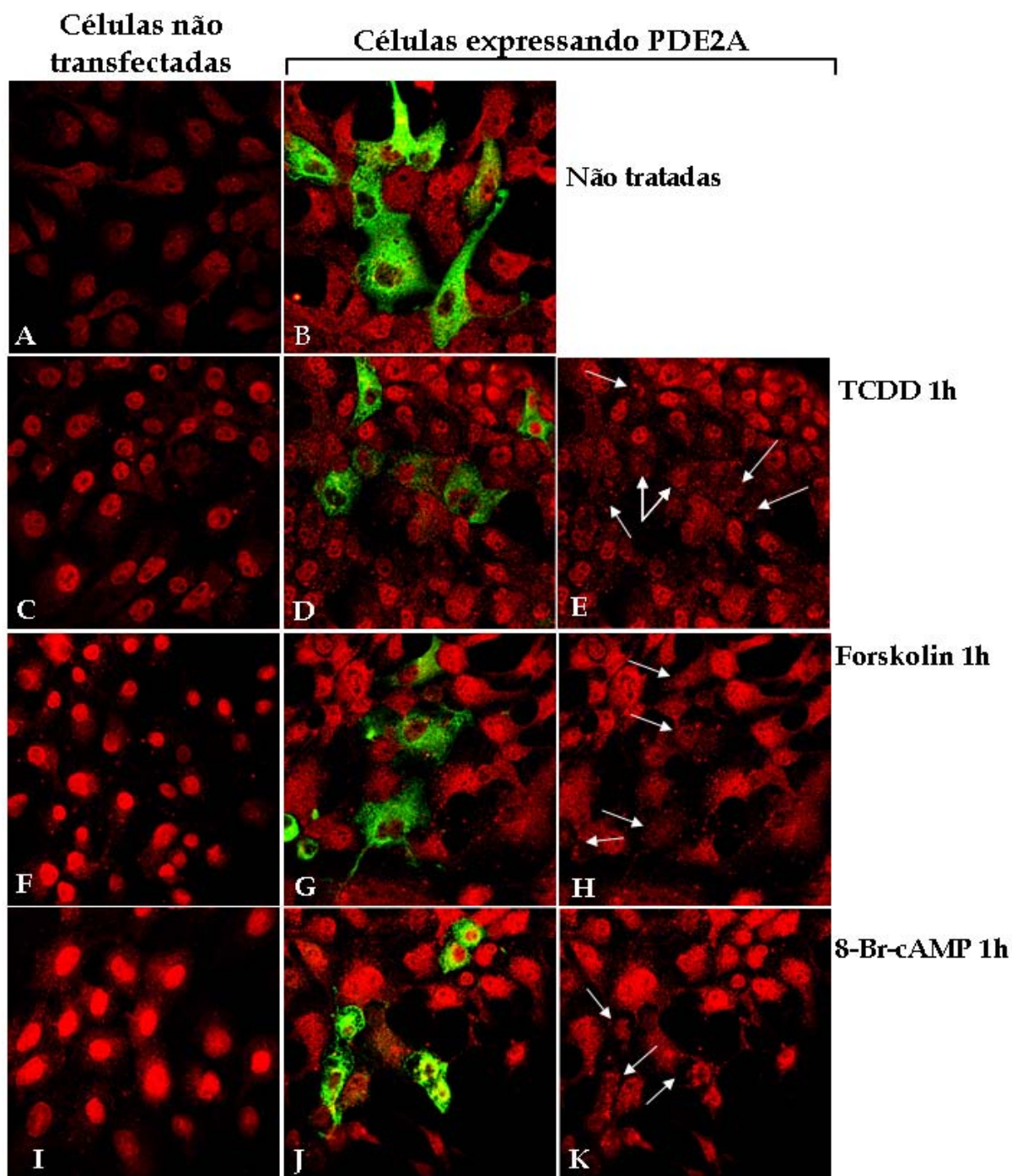
**Figura 21: XAP2 não interfere com a atividade catalítica de PDE2A recombinante.**

A) Células COS-1 foram transfectadas com VSV-PDE2A, lisadas e PDE2A foi imunoprecipitada com anticorpo anti-VSV e agarose-proteína A/G. PDE2A precipitada foi analisada por SDS-PAGE e coradas com Coomassie brilhante blue. Linhas a: 0.2 µg BSA; b: 0.5 µg BSA; c: 1 µg BSA e linha d: 50 µl de PDE2A-ligada aos grânulos de agarose-proteína A/G. A migração de PDE2A corresponde à massa de 110 kDa, sendo as bandas de 50 kDa e 35 kDa correspondentes às cadeias pesada e leve (Hc e Lc) do anticorpo anti-VSV. B) cinco µl de PDE2A ligado aos grânulos de agarose-proteína A/G (aproximadamente 2,5 nM, concentração final da proteína) foram incubados com 125 nM de cada uma das GST-proteínas (GST-XAP2, GST-Nxap2, GST-Cxap2 e GST) por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, cAMP foi adicionado (25 µM concentração final) e a mistura de reação incubada por 1 hora à 30°C. Como controles foram utilizados imunoprecipitados de células COS-1 transfectadas com vetor vazio (mock) e apenas tampão. C) Após o ensaio de atividade fosfodiesterásica foi adicionado tampão de amostra SDS-PAGE e a quantidade de PDE2A em cada meio reacional foi estimada por *Western blot* utilizando anticorpo anti-VSV. Experimento típico de quintuplicata realizado 3 vezes

VSV-PDE2A ou com vetor vazio, e tratadas com TCDD (5nM), forskolin (20  $\mu$ M) ou 8-Br-cAMP 2 mM por 1 hora a 37°C como descrito na seção 3.2.4.2. A localização de Ahr endógeno foi avaliada por imunofluorescência em microscopia confocal. Células não tratadas exibem Ahr localização difusa pelo citoplasma e núcleo, de forma que não é possível distinguir os dois compartimentos (figura 22, painel A).

Como esperado, TCDD, forskolin e 8-Br-cAMP induziram o deslocamento de Ahr para o núcleo (figura 22, painel C, F I). Em células expressando PDE2A (coradas de verde no painel D) a localização de Ahr permaneceu difusa mesmo após o tratamento com TCDD (figura 22, painéis D e E, onde as células estão indicadas por setas brancas). Em seguida foram testados forskolin, um ativador da adenilato ciclase, e 8-Br-cAMP, um análogo de cAMP. Como já relatado por Oesch-Bartlomowicz *et al.* 2005, forskolin e o análogo de cAMP induzem deslocamento de Ahr para o núcleo (figura 22, painéis F e I). Em células expressando PDE2A, o deslocamento de Ahr para o núcleo induzido por cAMP foi significativamente inibido (figura 22, painéis G, H, J e K, células indicadas pelas setas brancas). A avaliação quantitativa dos experimentos mostrado na figura 22 mostram que TCDD, forskolin e 8-Br-cAMP induzem deslocamento de Ahr para o núcleo em 82%, 78% e 80% das células analisadas, respectivamente (Tabela 4). Em células expressando PDE2A, o deslocamento de Ahr induzido por TCDD foi reduzido em quase 50% quando comparado a células não transfectadas, enquanto que o deslocamento de Ahr induzido por forskolin e 8-Br-cAMP foi reduzido em 71% e 78%, respectivamente.





**Figura 22: Localização celular de Ahr em células expressando PDE2A.** Células Hepa1c1c7 foram transfectadas com VSV-PDE2A. 24 horas após a transfecção, as células foram tratadas com TCDD 5 nM (C, D e E), forskolin 20  $\mu$ M (F, G e H) ou 8-Br-cAMP 2 mM (I, J e K) por 1 hora a 37°C, fixadas, permeabilizadas e incubadas com anticorpos anti-Ahr M20 (cabra) para visualizar Ahr endógeno e anti-VSV (camundongo) para detectar PDE2A transfectada seguida pela incubação dos anticorpos secundários (Cy3-anti-cabra e Cy2-anti-camundongo). Células não tratadas são apresentadas como controles (A e B). A figura mostra as células efetivamente transfectadas com VSV-PDE2A em verde e as setas indicam as células transfectadas que perderam efeito de deslocamento de Ahr induzido pelos respectivos tratamentos. Os quadros D/E, G/H e J/ H são a mesma foto, sendo que as fotos do lado direito estão com a fluorescência verde da enzima PDE2A omitida para a visualização do efeito.

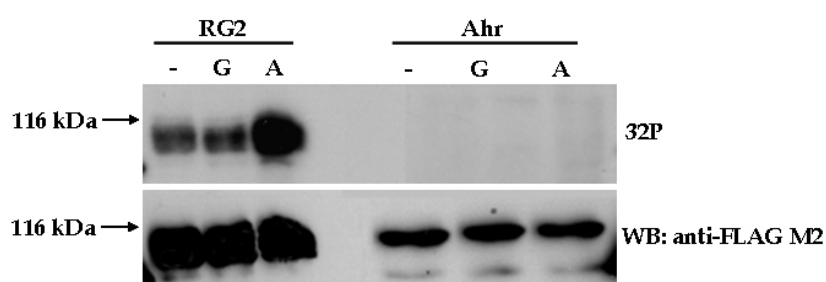
Tabela 4: Avaliação quantitativa da inibição do deslocamento de Ahr em células expressando PDE2A. As células foram ordenadas em dois grupos de acordo com a distribuição subcelular de Ahr. O grupo “difusa” compreende as células em que a marcação de Ahr se encontra localizada no citoplasma e núcleo, enquanto que no grupo “nuclear” a marcação concentra-se no núcleo.

	Localização de Ahr em células não transfectadas		% Ahr deslocamento	Localização de Ahr em células transfectadas com PDE2A		% Ahr deslocamento
	difusa	nuclear		difusa	nuclear	
Não tratadas	195/202	7/202	3.5	170/174	4/174	2.3
TCDD	36/207	171/207	<b>82.6</b>	100/177	77/177	<b>43.5</b>
forskolin	40/187	147/187	<b>78.6</b>	91/119	28/119	<b>23.5</b>
8-Br-cAMP	38/194	156/194	<b>80.4</b>	59/72	13/72	<b>18.0</b>

#### 4.12 Fosforilação de Ahr por PKA ou PKG

cAMP é um mensageiro intracelular ubíquo, que ativa proteína quinase A (PKA), uma serina/treonina proteína quinase que é capaz de fosforilar diversos substratos diferentes dentro da célula (Asirvatham *et al*, 2004). Em resposta a cAMP, Ahr desloca para o núcleo adotando uma conformação singular capaz de interagir com proteínas ainda não identificadas de forma independente da presença de ligante. O mecanismo pelo qual cAMP induz o deslocamento de Ahr para o núcleo e suas conseqüências funcionais ainda não é conhecido, mas sabe-se que a inibição de PKA bloqueia o efeito de cAMP sobre a via de sinalização de Ahr (Oesch-Bartlomowicz *et al*, 2005). Com o objetivo de elucidar o mecanismo desencadeado por cAMP sobre a via do Ahr, foram realizados ensaios de fosforilação *in vitro* com PKA e PKG como descrito na seção 3.2.3.5.

A figura 23 mostra que Ahr não é fosforilado por PKA ou PKG, mesmo após 24 horas de exposição ao filme de raio X como forma de detecção de  $^{32}\text{P}$ . Como controle positivo da fosforilação por PKA, foi utilizada Rap1GAP2, uma proteína ativadora de GTPase (GAP) específica para Rap1, uma proteína ligadora de nucleotídeos de guanina do tipo Ras (Schultess *et al*, 2005).



**Figura 23. Ahr não é fosforilado por quinases reguladas por nucleotídeos cíclicos (PKA e PKG).** Células COS-1 foram transfectadas com FLAG-Ahr e FLAG-Rap1Gap2 (como controle positivo de PKA). As proteínas expressas foram precipitadas com anticorpo anti-FLAG M2 e fosforiladas *in vitro* utilizando  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ , PKG e a subunidade catalítica de PKA purificadas. Para detectar a incorporação de  $^{32}\text{P}$ , as amostras foram resolvidas por SDS-PAGE, transferida para membrana de nitrocelulose e expostas ao filme por 24 horas à  $-80^\circ\text{C}$ . Em seguida, a quantidade de proteína foi determinada por Western blot utilizando anticorpo anti-FLAG M2. Experimento típico de 2 repetições.

## 5. DISCUSSÃO

cAMP é um mensageiro intracelular ubíquo, envolvido em diversos sinais intracelulares em células eucarióticas, das leveduras às células dos animais superiores, incluindo o sistema celular humano. A interação de ligantes específicos (hormônios, neurotransmissores e moléculas odorantes) aos seus respectivos receptores dispara a produção de cAMP, que por sua vez, ativa efetores intracelulares tais como os canais iônicos CNG (*cyclic nucleotide-gated*), as proteínas de troca de nucleotídeos de guanina ativadas por cAMP (EPACs) e a proteína quinase A (PKA). Mesmo promovendo a ativação de tão limitado grupo de efetores, cAMP regula um surpreendente número de cascatas de eventos celulares, aí incluídas, entre outras, a ativação de canais iônicos, contração e relaxamento do músculo liso e cardíaco, secreção glândular, plasticidade neuronal, resposta imune, agregação plaquetária, lipólise, glicogenólise, proliferação celular e apoptose (Zaccolo *et al*, 2006). Por sua vez, as fosfodiesterases (PDEs) são a única via de degradação do cAMP, logo elas funcionam como enzimas-chave na regulação de tais processos. Além disso, PDEs podem ser direcionadas a compartimentos subcelulares específicos, como a membrana plasmática, ou ser recrutada para complexos multiprotéicos de sinalização, consequentemente regulando a concentração local de cAMP (Martin and Cooper, 2006 e Zaccolo *et al*, 2006).

As PDEs estimuladas por cGMP (PDE2s) compoem umas das famílias de PDEs cujas estruturas protéicas contém domínios regulatórios conhecidos como domínios GAF A e GAF B (Martinez *et al*, 2002a). O domínio GAF A é responsável por dimerização enquanto que o domínio GAF B liga cGMP. A presença de cGMP ligado ao domínio GAF B estimula alostericamente a atividade catalítica da enzima na ordem de 10 vezes sobre a hidrólise de cAMP (Martinez *et al* 2002b, Wu *et al*, 2004).

XAP2 contém em seu N-terminal um domínio de homologia a imunofilinas e por isso é um membro da superfamília dessas proteínas. As imunofilinas são o alvo seletivo de drogas imunossupressoras, tais como as ciclosporinas, FK506 ou rapamicina (Marks 1996). No entanto, XAP2 não é capaz de ligar drogas imunossupressoras (Carver *et al*, 1998). Vários membros da família das imunofilinas também possuem função de chaperona e interagem com hsp90. Por exemplo, FKBP52 (uma das proteínas ligadoras de FK506) forma complexo com os receptores citosólicos dos hormônios esteroidais glucocorticóide (GR), progesterona (PR), estrogênio (ER) e andrógeno (AR) (Meyer and Perdew, 1999).

Neste trabalho, foi identificada a interação entre PDE2A e XAP2, o componente imunofilina do complexo multiprotéico Ahr. Esta é a primeira vez que foi descrita a identificação de uma proteína ligadora de PDE2A. Bentley *et al*, 2001 haviam indicado que fosfoproteínas ainda não caracterizadas e mesmo desconhecidas, poderiam funcionar como potenciais ligadoras de PDE2A em células neuronais PC12 quando tratadas com NGF (fator de crescimento de nervos). Todavia, no presente trabalho foi, pela primeira vez descrita, identificada e caracterizada uma proteína (XAP2) ligadora de PDE2A (de Oliveira et al, **manuscrito submetido**).

A interação entre PDE2A e XAP2 foi identificada pela técnica dois-híbridos em leveduras *S. cerevisiae*. No entanto, a técnica dois-híbridos normalmente gera considerável número de clones falso-positivos (Pedrazzi and Stagljar, 2004). Assim a interação entre PDE2A e XAP2 foi confirmada em experimentos *in vitro* e *in vivo* como GST Pull-down (Fig. 11) e coimunoprecipitação em células COS-1 e Hepac1c7 em cultura (Fig 12 e 14). Além disso em experimentos de determinação da compartimentalização celular utilizando a técnica de microscopia confocal, foi confirmada a co-localização citosólica entre PDE2A e XAP2, em células Hela em cultura, basicamente ao redor do núcleo e em algumas regiões ao longo do citoplasma (Figura 15).

HRS e STAM são proteínas que se encontram unidas, ligadas à membrana do endossomo. Estudos recentes mostram que o complexo HRS/STAM possui papel chave na regulação negativa de receptores tirosina-quinase (RTKs). O complexo HRS/STAM liga porções de ubiquitina e age como maquinaria de escolha (degradação ou reciclagem) reconhecendo receptores ubiquitinados e os transferindo para o lisossomo (Komada and Kitamura, 2005). A interação entre PDE2A e HRS também foi confirmada por ensaios de co-imunoprecipitação em células COS-1 em cultura (Fig 13), no entanto as características estruturais e as consequências biológicas dessa interação não foram o foco de estudo desse trabalho.

Identificamos também a região contendo o domínio GAF B da PDE2A como a responsável pela ligação com XAP2. Os domínios GAF presentes em certas proteínas, representam um dos maiores e mais difundidos sítios de ligação de moléculas pequenas e têm sido conservado por mais de 2 bilhões de anos de evolução, já que foi identificado em espécies desde cianobactérias até mamíferos. Mais de 1300 proteínas contêm domínios GAF e estão envolvidas em diversas vias de transdução de sinais (Martinez et al, 2002a). No caso das PDEs, os domínios GAF estão presentes em cinco das 11 famílias de PDEs de mamíferos. cGMP liga-se ao domínio GAF das PDEs 2, 5, 6 e 11, enquanto que cAMP liga-se ao domínio GAF da PDE10 (Gross-Langenhoff *et al*, 2006). Até hoje não foi relatada a ligação proteína-proteína mediada pelos domínios GAF. Neste trabalho foi mostrado claramente que a região contendo o domínio GAF B da enzima PDE2A é suficiente para mediar a interação com XAP2 (figura 16). No entanto, PDE2A é capaz de interagir com cGMP e com XAP2 ao mesmo tempo, já que células tratadas com o hormônio ANP (que aumenta a concentração de cGMP através da estimulação da guanilato ciclase) não interfere na ligação entre PDE2A e XAP2 em experimentos de co-imunoprecipitação em células COS-1 em cultura (figura 17).

Para determinar a região de XAP2 responsável pela interação com PDE2A, foram gerados duas construções truncadas de XAP2 contendo a região

N- e a C- terminal fusionadas à GST. Verificamos, como mostrado na figura 18, que a região C-terminal de XAP2 foi capaz de ligar PDE2A, com a mesma intensidade que liga XAP2 tipo selvagem. Esses resultados indicam, que a interação é mediada pelos domínios TPR presentes na região C-terminal de XAP2, uma vez que os motivos estruturais TPR, presentes em diversas proteínas, servem de mediador nas interações proteína-proteína e na formação dos complexos multiprotéicos (Lamb et al, 1995 and D'Andrea and Regan 2003). A exigência de sequências C-terminal de XAP2 para ligação com PDE2A é redundante com o requerimento de sequências C-terminal de XAP2 para ligar hsp90 no complexo Ahr. Para elucidar se XAP2 liga PDE2A e hsp90 ao mesmo tempo, foram realizados experimentos de co-imunoprecipitação. Os resultados mostram claramente (figura 20) que hsp90 é capaz de precipitar PDE2A e XAP2, sugerindo que XAP2 liga PDE2A e hsp90 ao mesmo tempo e que PDE2A faz parte do complexo Ahr e não compete pela ligação à XAP2 (de Oliveira et al). Além disso, PDE2A também liga hsp90, no entanto a interação é fortemente reduzida na presença de XAP2, indicando que PDE2A faz parte do complexo Ahr por ligar-se preferencialmente à XAP2 (figura 19). A relação entre o número de motivos TPR e a afinidade e especificidade com que liga a proteína-alvo ainda não está clara. Um exemplo interessante do emprego de motivos TPR é a especificidade dupla de ligação a uma única proteína, como a proteína Hop (*hsp70/hsp90 organizing protein*), uma chaperona que tem 3 motivos TPR e liga duas proteínas alvo, hsp70 e hsp90, facilitando a formação de complexos multiprotéico como os do receptor de progesterona e o receptor de glicocorticóides (D'Andrea and Regan, 2003 and Carrigan et al, 2006).

Face aos resultados seqüenciais acima descritos, tornou-se necessário investigar se XAP2 exerceria alguma interferência sobre a atividade catalítica de PDE2A, uma vez que XAP2 liga e regula outros fatores de transcrição, além de Ahr. Por exemplo, XAP2 interage com a proteína X do vírus da hepatite B e inibe seu deslocamento para o núcleo (Kuzhandaivelu et al, 1996). Além disso, XAP2 liga proteínas que não estão envolvidas diretamente com o controle

transcricional, como o receptor do hormônio da tireóide (Froidevaux, *et al* 2006). Para entender as possíveis consequências funcionais da interação entre PDE2A e XAP2, a atividade catalítica da PDE2A foi medida *in vitro* na presença e ausência de XAP2. Os resultados obtidos (ver figura 21) mostram, indubitavelmente, que XAP2 não interfere com a atividade catalítica de PDE2A, mesmo em excesso molar em torno de 50 vezes. XAP2 também liga a isoenzima PDE4A5 especificamente (Bolger *et al*, 2003). Todavia, ao contrário do resultado apresentado neste trabalho, a ligação de XAP2 à PDE4A5 reduziu a atividade catalítica da enzima. No entanto, no trabalho relatado por Bolger *et al*, a concentração de PDE4A5 utilizada nos ensaios de atividade não foi especificada, assim a razão molar de XAP2 sobre PDE4A5 pode ser significativamente alta, o que coloca em dúvida a relevância fisiológica da inibição relatada. Adicionalmente foi relatado pelos autores, que interessantemente, a ligação de XAP2 à PDE4A5 aumenta a sensibilidade da enzima ao inibidor rolipram e atenua a habilidade de PKA fosforilar PDE4A5. Possíveis efeitos de PDE4A5 sobre a via do Ahr não foram estudados.

A partir do conjunto de dados acima relatados, pode-se afirmar que este trabalho fornece evidências para um novo papel da enzima PDE2A na regulação do fator de transcrição Ahr. Além dos dados relatados acima, verificamos ainda outras funções relevantes da PDE2A ao comprovarmos que a enzima inibe o deslocamento do complexo Ahr para o núcleo (de Oliveira *et al*.). Ahr é um fator de transcrição induzível por ligante que serve de mediador às respostas celulares induzidas por compostos xenobióticos, tais como poluentes ambientais como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e dioxinas policloradas (TCDD). Na ausência de ligante, o receptor latente está associado a um dímero da chaperona hsp90 e à duas proteínas ligadoras de hsp90, as co-chaperonas p23 e XAP2 (Kashuba *et*, 2006). Em resposta à ligação de xenobióticos, Ahr é deslocado para o núcleo onde dimeriza com ARNT. O heterodímero Ahr-ARNT liga regiões de DNA chamadas “elementos de controle transcricional induzível por xenobióticos (XRE: *xenobiotics regulatory*



*elements*)” que controlam a transcrição de genes que codificam enzimas envolvidas na metabolização de drogas, como citocromo P450-1A1, P450-1A2, GST-A2, entre outras (Meyer and Perdew *et al*, 1999, Bock and Köhle, 2006). A participação de Ahr no desenvolvimento hepático, na nefrogênese, no sistema imune, na proliferação e diferenciação celular (Schmidt and Bradfield, 1996, Carlson and Perdew, 2002) sugere que a via Ahr pode estar envolvida na regulação desses processos na ausência de ligantes exógenos. No entanto, ainda não são conhecidos os sinais endógenos que levam à ativação dessa via. Recentemente, cAMP foi identificado como um mediador da indução do deslocamento de Ahr para o núcleo, agindo como um repressor, ao invés de estimulador, da expressão de genes do citocromo P450 regulados por Ahr (Oesch-Bartlomowicz *et al*, 2005).

Para avaliar se a ligação de PDE2A à XAP2 influencia o deslocamento do complexo Ahr para o núcleo, induzido por cAMP, foram utilizadas células Hepa1c1c7, que expressam Ahr e XAP2 constitutivamente, transfectadas ou não com PDE2A. A localização subcelular de Ahr foi avaliada por imunofluorescência em microscopia confocal. Os resultados apresentados nesse trabalho (ver figura 22) mostram claramente a inibição do deslocamento de Ahr para o núcleo induzida por TCDD, forskolin (um ativador da adenilato ciclase) e 8-Br-cAMP (um análogo de cAMP permeável à membrana celular) em células transfectadas com PDE2A. No entanto, a inibição por PDE2A do deslocamento para o núcleo de Ahr induzido por TCDD não é tão intenso quando comparada com o tratamento com forskolin e com o análogo de cAMP.

Para estudar a possível fosforilação de Ahr por PKA ou PKG, verificamos, inicialmente, que as sequências de Ahr humano e de camundongo revelam a presença de sítios de fosforilação por PKA (Bock and Köhle, 2006). No entanto, o resultado apresentado neste trabalho (ver figura 23) mostra claramente que nem PKA nem PKG foram capazes de fosforilar Ahr, apesar de H89 (inibidor de PKA) ser capaz de bloquear os efeitos nucleares de Ahr

induzidos por cAMP (Oesch-Bartlomowicz et al, 2005). Uma explicação para esses resultados discrepantes seria a mudança conformacional sofrida por Ahr com conseqüente exposição do sítio de fosforilação por PKA. Ressalve-se, no entanto, que a natureza do estímulo permanece desconhecida.

Os resultados desse trabalho em conjunto indicam que PDE2A liga XAP2 e faz parte do complexo multiprotéico de Ahr, como um componente regulatório, responsável por manter Ahr no citoplasma, já que a presença de PDE2A poderia inibir o aumento da concentração local de cAMP, necessária para o deslocamento do complexo Ahr para o núcleo. Grande número de evidências sugerem que PDEs contribuem para a compartimentalização da sinalização por cAMP. Por exemplo, em ventriculócitos de rato neonatos, PDE4 está envolvida em regular o nível de cAMP em domínios contendo alta concentração de  $\beta$ -adrenoceptor e adenilato ciclase, de forma que o acoplamento funcional de PDEs à receptores específicos fornece uma via eficiente de controle do nível de cAMP de forma estímulo-específica (Zaccolo *et al*, 2006, Mongillo *et al*, 2006b). No entanto, ainda não está claro o papel de PDE2A na via de Ahr induzido por TCDD e 8-Br-cAMP (um análogo de cAMP resistente à hidrólise por PDEs). Uma possibilidade seria a regulação negativa da transcrição ou expressão de Ahr ou a regulação positiva das vias de degradação de Ahr, já que foram observados em algumas células transfectadas com PDE2A o enfraquecimento do sinal de Ahr. Estudos adicionais ainda são necessários visando esclarecer o mecanismo de ação de PDE2A sobre o deslocamento de Ahr para o núcleo celular, assim como quanto à formação do complexo multiprotéico de Ahr, já que não foi determinado se PDE2A é parte constitutiva do complexo ou é recrutada mediante um determinado sinal. Além disso, o mecanismo pelo qual cAMP estimula o deslocamento para o núcleo de Ahr ainda não foi determinado, o que é de total importância para compreensão da conexão entre a via dos nucleotídeos cíclicos e a via do Ahr.

## 6. CONCLUSÕES

Ao final deste trabalho, podemos concluir que:

- A enzima PDE2A interage com XAP2 *in vitro* e *in vivo*

- A região contendo o domínio GAF B da PDE2A é responsável pela interação com XAP2

- PDE2A liga à região C-terminal de XAP2, provavelmente no domínio TPR

- PDE2A faz parte do complexo multiprotéico da via de sinalização do Ahr

- XAP2 não interfere com a atividade catalítica de PDE2A

- PDE2A regula a via de sinalização de Ahr inibindo o deslocamento do receptor para o núcleo

- Ahr não é fosforilado por PKA ou PKG nas condições testadas, apesar da existência de sequência de fosforilação por PKA

## 7. PERSPECTIVAS

As próximas etapas deste trabalho referem-se a elucidação dos mecanismos celulares e moleculares que envolvem a ativação da via de sinalização do Ahr por cAMP e o papel da enzima PDE2A. Para isso, os objetivos são:

- Produção em larga escala da enzima PDE2A recombinante
- Produção de anticorpos policlonais contra a enzima PDE2A recombinante
- Determinar se PDE2A é parte integrante constitutivamente do complexo multiprotéico do receptor Ah. Se não for, identificar o(s) sinal(s) que recrutam PDE2A ao complexo
- Identificar as proteínas nucleares associadas ao Ahr, quando ativado por cAMP
- Identificar os genes regulados por Ahr quando ativado por cAMP
- Identificar o mecanismo pelo qual cAMP induz ativação do receptor Ah

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agatep, R., Kirkpatrick, R.D., Parchaliuk, D. L., Woods, R. A. and Gietz, R. D. *Technical Tips Online*. 1(51), 01525, 1998.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M. Roberts, K., Walter, P. *Molecular Biology of the Cell* 4th ed New York and London: Garland Science; 2002
- Asirvatham, A. L., Galligan, S. G., Schillace, R.V., Davey, M. P., Vasta, V., Beavo, J. A. and Carr, D. W. A-Kinase Anchoring Proteins Interact with Phosphodiesterases in T Lymphocyte Cell Lines<sup>1</sup>. **The Journal of Immunology**, 73(8), p: 4806-14, 2004
- Bailliea, G. S., Scottb, J. D. and Houslaya, M.D. Compartmentalisation of phosphodiesterases and protein kinase A: opposites attract. **FEBS Letters**, 579, p. 3264–3270, 2005.
- Ballard S. A., Gingell C. J., Tang K., Turner L. A., Price M. E. and Naylor A. M. Effects of sildenafil on the relaxation of human corpus cavernosum tissue in vitro and on the activities of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes. **J. Urol.**, 159, p. 2164–2171, 1998.
- Beavo, J. A., Conti, M. and Heaslip, R. J. Multiple Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases. **Molecular Pharmacology**, 46, p:399-405, 1994.
- Bentley, J. K., Juilfs, D.M. and Uhler, M.D. Nerve growth factor inhibits PC12 cell PDE2 phosphodiesterase activity and increases PDE2 binding to phosphoproteins. **Journal of Neurochemistry**, 76, p. 1252-1263, 2001.
- Bittinger MA, Nguyen LP, Bradfield CA. Aspartate aminotransferase generates proagonists of the aryl hydrocarbon receptor. **Mol Pharmacol**, 64, p. 550–6, 2003.
- Bock, K. W. and Köhle, C. Ah receptor: Dioxin-mediated toxic responses as hints to deregulated physiologic functions. **Biochemical pharmacology**, 72, p. 393–404, 2006.
- Bolger, G. B., Peden, A. H., Steele, M. R., MacKenzie, C., McEwan, D. G., Wallace, D. A., Huston, E., Baillie, G. S. and Houslay, M. D. Attenuation of the Activity of the cAMP-specific Phosphodiesterase PDE4A5 by Interaction with the Immunophilin XAP2. **The Journal of Biological Chemistry**, 278 (35), p. 33351–33363, 2003.

- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**; 72, p. 248-54, 1976
- Buxton, I. L. O. and Brunton, L. L. Compartments of Cyclic AMP and Protein Kinase in Mammalian Cardiomyocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, 258 (17), p. 10233-10239, 1983.
- Carlson, D.B. and Perdew, G.H. A Dynamic Role for the Ah Receptor in Cell Signaling? Insights from a Diverse Group of Ah Receptor Interacting Proteins. **J. Biochem Molecular Toxicology**, 16 (6), p. 317-325, 2002
- Carrigan PE, Sikkink LA, Smith DF, Ramirez-Alvarado M. Domain: domain interactions within Hop, the Hsp70/Hsp90 organizing protein, are required for protein stability and structure. **Protein Sci**, 15(3), p. 522-32, 2006.
- Carver, L. A. and Bradfield, C. A. Ligand-dependent Interaction of the Aryl Hydrocarbon Receptor with a Novel Immunophilin Homolog *in Vivo*\*. **The Journal of Biological Chemistry**, Vol. 272, No. 17, Issue of April 25, pp. 11452-11456, 1997
- Carver, L.A., LaPres, J.J., Jaini, S., Dunham, E.E., and Bradfield, C.A. Characterization of the Ah Receptor-associated Protein, ARA9. **The Journal of Biological Chemistry**, Vol. 273 (50), pp. 33580-33587, 1998
- Chung, K. F. Phosphodiesterase inhibitors in airways disease. **European Journal of Pharmacology**, 533, p. 110-117, 2006.
- Conney AH, Miller EC, Miller JA. The metabolism of methylated aminoazo dyes. V. Evidence for induction of enzyme synthesis in the rat by 3-methylcholanthrene. **Cancer Res.**, 16, p. 450-59, 1956.
- Conti, M. Phosphodiesterases and Cyclic Nucleotide Signaling in Endocrine Cells. **Molecular Endocrinology**, 14(9), p: 1317-1327, 2000.
- D'Andrea, LD and Regan, L. TPR proteins: the versatile helix. **Trends Biochem Sci**. 28(12):655-62, 2003
- de Oliveira, S.K., Hoffmeister, M., Müller-Esterl, W., Guimaraes, J. A. and Smolenski, A. Phosphodiesterase 2A forms a complex with the co-chaperone XAP2 and regulates nuclear translocation of the aryl hydrocarbon receptor. **Manuscrito submetido ao JBC**, dezembro de 2006.

- Denison, M. S., Pandini, A., Nagy, S. R., Baldwin, E. P. and Bonati, L. Ligand binding and activation of the Ah receptor. **Chemico-Biological Interactions**, 141, p. 3-24, 2002.
- Denison MS, Nagy SR. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. **Ann Rev Pharmacol Toxicol**, 43, p. 309-34, 2003.
- Dunham, E. E., Stevens, E. A., Glover, E. and Bradfield, C. A. The Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling Pathway is Modified through Interactions with a Kelch Protein. **Molecular Pharmacology**, 70(1), p. 8-15, 2006.
- Dunkern, T. R. and Hatzelmann, A. The effect of Sildenafil on human platelet secretory function is controlled by a complex interplay between phosphodiesterases 2, 3 and 5. **Cellular Signalling**, 17, p. 331-339, 2005.
- Dyke H. J. and Montana J. G. The therapeutic potential of PDE4 inhibitors. **Expert Opin. Investig. Drugs**, 8, p. 1301-1325, 1999.
- Fields, S. and Song, O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. **Nature**, vol 340, 20 July, p. 245-246, 1989.
- Fischmeister, R., Castro, L. R. V., Abi-Gerges, A., Rochais, F., Jurevic'ius, J., Leroy, J., Vandecasteele, G. Compartmentation of Cyclic Nucleotide Signaling in the Heart. The Role of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases. **Circ. Research**, 99, p. 816-828, 2006.
- Froidevaux MS, Berg P, Seugnet I, Decherf S, Becker N, Sachs LM, Bilesimo P, Nygard M, Pongratz I, Demeneix BA. The co-chaperone XAP2 is required for activation of hypothalamic thyrotropin-releasing hormone transcription in vivo. **EMBO Rep**. 2006 Oct; 7(10): 1035-9. Epub 2006 Aug 25.
- Fujii-Kuriyama, Y. and Mimura, J. Molecular mechanisms of AhR functions in the regulation of cytochrome P450 genes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 338, p. 311-317, 2005.
- Gross-Langenhoff M, Hofbauer K, Weber J, Schultz A, Schultz JE. cAMP is a ligand for the tandem GAF domain of human phosphodiesterase 10 and cGMP for the tandem GAF domain of phosphodiesterase 11. **J Biol Chem**. 281(5), p. 2841-6, 2006.

- Gu YZ, Hogenesch JB, Bradfield CA. The PAS superfamily: Sensors of environmental and developmental signals. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, 40, p. 519-561, 2000.
- Hahn, M. E., Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution. **Chemico-Biological Interactions**, 141, p. 131-160, 2002.
- Iffland, A. Kohls, D., Low, S., Luan, J., Zhang, Y., Kothe, M., Cao,, Q., Kamath, A. V. Ding, Y. and Ellenberger, T. Structural Determinants for Inhibitor Specificity and Selectivity in PDE2A Using the Wheat Germ In Vitro Translation System. **Biochemistry**, 44, p. 8312-8325, 2005.
- Jeon, Y. H., Heo, Y. S., Kim, C. M., Hyun, Y. L., Lee, T. G., Ro, S. and Cho, J. M. Phosphodiesterase: overview of protein structures, potential therapeutic applications and recent progress in drug development. **Cell. Mol. Life Sci.**, 62, p. 1198-1220, 2005.
- Kashuba, E. V., Gradin, K., Isagulians, M., Szekely, L., Poellinger, L., Klein, G., and Kazlauskas, K. Regulation of Transactivation Function of the Aryl Hydrocarbon Receptor by the Epstein-Barr Virus-encoded EBNA-3 Protein. **The Journal of Biological Chemistry**, 281 (2), p. 1215-1223, 2006.
- Komada, M. and Kitamura, N. The Hrs/STAM Complex in the Downregulation of Receptor Tyrosine Kinases. **J. Biochem.** 137, p. 1-8, 2005.
- Kuzhandaivelu, N., Cong, Y., Inouye, C., Yang, W. and Seto, E. XAP2, a novel hepatitis B virus X-associated protein that inhibits X transactivation. **Nucleic Acids Research**, 24 (23), p. 4741-4750, 1996.
- Lamb JR, Tugendreich S, Hieter P. Tetratricopeptide repeat interactions: to TPR or not to TPR? **Trends Biochem Sci.**; 20(7): 257-9, 1995
- LaPres, J. J., Glover, E., Dunham, E. E., Bunger, M. K. and Bradfield, C. A. ARA9 Modifies Agonist Signaling through an Increase in Cytosolic Aryl Hydrocarbon Receptor. **The Journal of Biological Chemistry**, 275(9), p. 6153-6159, 2000
- Ma, Q. and Whitlock Jr., J. P. A Novel Cytoplasmic Protein That Interacts with the Ah Receptor, Contains Tetratricopeptide Repeat Motifs, and Augments the Transcriptional Response to 2,3,7,8-



- Tetrachlorodibenzo-p-dioxin. **The Journal of Biological Chemistry**, 272 (14), p. 8878-8884, 1997
- MacFarland, R.T., Zelus, B.D. and Beavo, J.A. High Concentrations of a cGMP-stimulated Phosphodiesterase Mediate ANP-induced Decreases in cAMP and Steroidogenesis in Adrenal Glomerulosa Cells. **The journal of Biological Chemistry**. 266 (1), p. 136-142, 1991.
- Marks, A.R. Cellular functions of immunophilins. **Physiological Reviews**, 76 (3), p. 631-649, 1996.
- Martin, A.C.L and Cooper, D.M.F. Layers of organization of cAMP microdomains in a simple cell. **Biochemical Society Transactions**, 34 (4), p. 480-483, 2006.
- Martinez SE, Beavo JA, Hol, WG. GAF Domains: Two-Billion-Year-Old Molecular Switches that Bind Cyclic Nucleotides. **Mol Interv**, Sep; 2(5): 317-23, 2002a
- Martinez, S. E, Wu, A. Z., Glavas, N.A., Tang, X., Turley, S., Hol, W. G. J. and Beavo, J. A. The two GAF domains in phosphodiesterase 2A have distinct roles in dimerization and in cGMP binding. **PNAS**, 99 (20), p. 13260-13265, 2002b.
- Maurice, D. H., Palmer, D., Tilley, D. G., Dunkerley, H. A., Netherton, S. J., Raymond, D. R., Elbatarny, H. S. and Jimmo, S. L. Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase Activity, Expression, and Targeting in Cells of the Cardiovascular System. **Mol Pharmacol**, 64, p: 533-546, 2003.
- Meyer, B. K., Pray-Grant, M. G., Heuvel, J. P. V. and Perdew, G. H. Hepatitis B Virus X-Associated Protein 2 Is a Subunit of the Unliganded Aryl Hydrocarbon Receptor Core Complex and Exhibits Transcriptional Enhancer Activity. **Molecular and Cellular Biology**, 18 (2), p. 978-988, 1998.
- Mehats, C., Andersen, C. B., Filopanti, M., Jin, S. C. and Conti, M. Cyclic nucleotide phosphodiesterases and their role in endocrine cell signaling. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, 13 (1), p. 29-35, 2002.
- Meyer, B.K. and Perdew, G.H. Characterization of the AhR-hsp90-XAP2 Core complex and the Role of the Immunophilin-Related Protein XAP2 in AhR Stabilization. **Biochemistry**, 38, p. 8907-8917, 1999.

- Mongillo, M. and Zaccolo, M. A complex phosphodiesterase system controls  $\beta$ -adrenoceptor signalling in cardiomyocytes. **Biochemical Society Transactions**, 34 (4), p. 510-511, 2006a.
- Mongillo, M. Tocchetti, C. G., Terrin, A., Lissandron, V., Cheung, Z., Dostmann, W. R., Pozzan, T., Kass, D. A., Paolocci, N., Houslay, M. D. and Zaccolo, M. Compartmentalized Phosphodiesterase-2 Activity Blunts  $\beta$ -Adrenergic Cardiac Inotropy via an NO/cGMP-Dependent Pathway. **Circulation Research**, 98; p. 226-234, 2006b
- Movsesian M.A. and Alharethi R. Inhibitors of cyclic nucleotide phosphodiesterase PDE3 as adjunct therapy for dilated cardiomyopathy. **Expert Opin. Investig. Drugs**, 11, p. 1529-1536, 2002.
- Oesch-Bartlomowicz, B., Huelster, A., Wiss, O., Antoniou-Lipfert, P. Dietrich, C., Arand, M., Weiss, C. Bockamp, E. and Oesch, F. Aryl hydrocarbon receptor activation by cAMP vs. dioxin: Divergent signaling pathways. **PNAS**, 102 (26), p. 9218-9223, 2005.
- Pedrazzi, G. and Stagljar, I. Protein-Protein Interactions. *Methods in Molecular Biology*, vol. 241, cap 21: Cell Cycle Checkpoint Control Protocols, Editado por: H. B. Lieberman © Humana Press Inc., Totowa, NJ, 2004.
- Perry, S. J., Baillie, G. S., Kohout, T. A., McPhee, I., Magiera, M. M., Ang, K. L., Miller, W. E., McLean, A. J., Conti, M., Houslay, M. D., Lefkowitz, R. J. Targeting of Cyclic AMP Degradation to  $\beta$ 2-Adrenergic Receptors by  $\beta$ -Arrestins. **Science**, 298, p. 834-836, 2002
- Petrulis, J. R., Hord, N. G. and Perdew, G. H. Subcellular Localization of the Aryl Hydrocarbon Receptor Is Modulated by the Immunophilin Homolog Hepatitis B Virus X-associated Protein 2. **The Journal of Biological Chemistry**, 275(48), p. 37448-37453, 2000.
- Pollenz RS, Wilson SE, Dougherty EJ. Role of endogenous XAP2 protein on the localization and nucleocytoplasmic shuttling of the endogenous mouse Ahb-1 receptor in the presence and absence of ligand. **Molecular Pharmacology**, 70(4), p. 1369-79, 2006.
- Puga, A., Tomlinson, C. R. and Xia, Y. Ah receptor signals cross-talk with multiple developmental pathways. **Biochemical Pharmacology**, 69, p. 199-207, 2005.
- Ramadoss, P. Petrulis, J. R., Hollingshead, B. D., Kusnadi, A. and Perdew, G. H. Divergent Roles of Hepatitis B Virus X-Associated Protein 2 (XAP2)

- in Human versus Mouse Ah Receptor Complexes. **Biochemistry**, 43, p. 700-709, 2004.
- Ramadoss, P. and Perdew, G. H. The Transactivation Domain of the Ah Receptor Is a Key Determinant of Cellular Localization and Ligand-Independent Nucleocytoplasmic Shuttling Properties. **Biochemistry**, 44, p. 11148-11159, 2005.
- Rybalkin S. D., Rybalkina I., Beavo J. A. and Bornfeldt K. E. Cyclic nucleotide phosphodiesterase 1C promotes human arterial smooth muscle cell proliferation. **Circ. Res.**, 90, p. 151-157, 2002.
- Rybalkin, S. D., Yan, C., Bornfeldt, K. E. and Beavo, J.A. Cyclic GMP Phosphodiesterases and Regulation of Smooth Muscle Function. **Circ. Res**, 93, p.280-291, 2003.
- Schultess, J., Danielewski, O. and Smolenski, A. P. Rap1GAP2 is a new GTPase-activating protein of Rap1 expressed in human platelets. **Blood**, 105 (8), 2005.
- Schmidt, J.V. and Bradfield, C. A. Ah Receptor Signaling Pathways. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol**, 12, p. 55-89, 1996.
- Seybold, J. Thomas, D. Witzernath, M., Boral, S., Hocke, A. C., Bürger, A., Hatzelmann, A., Tenor, H., Schudt, C., Krüll, M., Schütte, H., Hippenstiel, S. and Suttorp, N. Tumor necrosis factor- $\alpha$ -dependent expression of phosphodiesterase 2: role in endothelial hyperpermeability. **Blood**, 105 (9), p. 3569-3576, 2005.
- Smolenski A, Poller W, Walter U, Lohmann SM. Regulation of human endothelial cell focal adhesion sites and migration by cGMP-dependent protein kinase I. **J Biol Chem**. 275: 25723 - 25732, 2000
- Spät, A. and Hunyady, L. Control of Aldosterone Secretion: A Model for Convergence in Cellular Signaling Pathways. **Physiol Rev**, 84, p. 489-539, 2004.
- Torphy, T. J. Phosphodiesterase Isozymes. Molecular Targets for Novel Antiasthma Agents. **Am J Respir Crit Care Med**, 157, p. 351-370, 1998.
- Vierimaa O, Georgitsi M, Lehtonen R, Vahteristo P, Kokko A, Raitila A, Tuppurainen K, Ebeling TM, Salmela PI, Paschke R, Gundogdu S, De Menis E, Makinen MJ, Launonen V, Karhu A, Aaltonen LA. Pituitary

adenoma predisposition caused by germline mutations in the AIP gene. **Science**, 312, p. 1228-1230, 2006

Wu, A. Z. Tang,X., Martinez, S. E. Ikeda, K. and Beavo, J.A. Molecular Determinants for Cyclic Nucleotide Binding to the Regulatory Domains of Phosphodiesterase 2A. **The Journal of Biological Chemistry**, 279 (36), p. 37928-37938, 2004

Zaccolo, M., Di Benedetto, G., Lissandron, V., Mancuso, L., Terrin, A. and Zamparo, I. Restricted diffusion of a freely diffusible second messenger: mechanisms underlying compartmentalized cAMP signaling. **Biochemical Society Transactions**, 34, part 4, p. 495-497, 2006.

## 9. ANEXOS

## 9.1 *Curriculum vitae*

**Simone Kobe de Oliveira**

### CURRICULUM VITAE

#### 1. DADOS PESSOAIS

**Nome:** Simone Kobe de Oliveira

**Filiação:** Renato Manoel de Oliveira e Romilda Vieira  
Kobe

**Nascimento:** 04/04/1974, São Jerônimo/RS - Brasil

**Carteira de identidade:** 4070662962 SSP/RS Expedida em  
23/03/2000

**CPF:** 799.054.559-49

**Endereço profissional:**

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de  
Biotecnologia.

Av. Bento Gonçalves 9500

Bairro agronomia

91501-970 PORTO ALEGRE, RS - Brasil

Telefone: (51) 33166062

E-mail: simone@cbiot.ufrgs.br

**Endereço residencial:**

Praça Pereira Oliveira 18/1201

Centro, Florianópolis

Santa Catarina - Brasil

88010-540

Telefone: (48) 3222.1045

(48) 99854435

E-mail: skobe74@yahoo.com.br

#### 2. FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

2002 - **Doutorado em Biologia Celular e Molecular,**  
**em andamento**

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Rio Grande do Sul, Brasil.

**Título:** Fosfodiesterase 2A forma um complexo com a co-chaperona XAP2 e regula o deslocamento do receptor Aril hidrocarboneto para o núcleo.

**Orientadores:** Prof. Dr. Jorge Almeida Guimarães  
Prof. Dr. Albert Smolenski

**Suporte financeiro:** Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES.

### **2001 - 2002 Mestrado em Biologia Celular e Molecular.**

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Rio Grande do Sul, Brasil.

**Título:** Anticoagulantes presentes na saliva do carrapato bovino *Boophilus microplus*. Ano de obtenção: 2003.

**Orientador:** Carlos Termignoni.

**Suporte financeiro:** Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/DF, CNPq/DF, Brasil.

### **1994 - 1998 Graduação em Ciências Farmacêuticas.**

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Rio Grande do Sul, Brasil.

## **3. PRODUÇÃO CIENTÍFICA**

de Oliveira, SK ; Hoffmeister, M. ; Gambaryan, S. ; Muller-Esterl, W. ; Guimarães, J. A; Smolenski, A. . Phosphodiesterase 2A forms a complex with the co-chaperone XAP2 and regulates nuclear translocation of the Aryl hydrocarbon receptor. **The Journal of Biological Chemistry**, in press, 2007.

- Ciprandi, A; de Oliveira, S. K.; Masuda, A.; Horn, F. and Termignoni, C. *Boophilus microplus*: Its saliva contains microphilin, a small thrombin inhibitor **Experimental Parasitology**, 114(1):40-6. Epub 2006 Apr 4, 2006
- Renata M.S. Terra, Antônio F.M. Pinto, Simone Kobe, Luiz Juliano, Jorge A. Guimarães. Melittin Induced Platelet Aggregation. **Manuscrito em preparação.**
- Assafim, M.; Oliveira, S. K.; Guimarães, J. A.; Termignoni, C.; Zingali, R.B. Antithrombotic effect of cattle tick *Boophilus microplus* saliva. **Manuscrito em preparação.**
- Termignoni, Carlos; OLIVEIRA, Simone Kobe de; CIPRANDI, Alessandra; HORN, Fabiana. Anticoagulantes da saliva do carrapato bovino *Boophilus microplus*. In: XII CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 2002, Rio de Janeiro. 2002.
- de Oliveira, Simone Kobe; ASSAFIM, Mariane; RUTA, Bruno; GUIMARÃES, Jorge Almeida; ZINGALI, Russolina Benedeta; TERMIGNONI, Carlos. Anti-thrombotic activity of cattle tick *Boophilus microplus* saliva. In: XXXII REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR-SBBQ, 2003, Caxambu, MG. 2003.
- de Oliveira, Simone Kobe; DROBOVOLSKI, Ricardo; PINTO, Antonio; GUIMARÃES, Jorge Almeida. Princípios Ativos do Veneno da Abelha *Apis mellifera* com ação na Hemostasia. In: XVIII REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, 2003, Curitiba, Paraná. 2003.
- VIANA, Suellen Zabalaga; OLIVEIRA, Simone Kobe de; TERMIGNONI, Carlos. Fibrin clot hydrolysis by tick saliva. In: XXXI REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR-SBBQ, 2002, Caxambu-MG. 2002.
- de Oliveira, Simone Kobe; HORN, Fabiana; TERMIGNONI, Carlos. The BmAP tick salivary antithrombin is cleaved by thrombin. In: XXXI REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR-SBBQ, 2002, Caxambu-MG. 2002.
- de Oliveira, Simone Kobe; HORN, Fabiana; SANTOS, Patrícia dos; TERMIGNONI, Carlos. A tick thrombin inhibitor also inhibits chymotrypsin. In: XXX REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR-SBBQ, 2001, Caxambu-Mg. 2001.



- de Oliveira, Simone Kobe; HORN, Fabiana; TERMIGNONI, Carlos. A low-molecular-weight thrombin inhibitor from the cattle tick *Boophilus microplus*. In: XXII REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, 1998, Caxambu, MG. 1998.
- de Oliveira, Simone Kobe; HORN, Fabiana; TERMIGNONI, Carlos. Caracterização de um inibidor de trombina isolado da saliva do carrapato *Boophilus microplus*. I. In: X SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 1998, Porto Alegre. 1998.

**9.2 Manuscrito aceito para publicação no periódico The Journal of  
Biological Chemistry**

JBC Papers in Press. Published on February 28, 2007 as Manuscript M610942200  
The latest version is at <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M610942200>

**PHOSPHODIESTERASE 2A FORMS A COMPLEX WITH THE CO-CHAPERONE  
XAP2 AND REGULATES NUCLEAR TRANSLOCATION OF THE ARYL  
HYDROCARBON RECEPTOR**

Simone Kobe de Oliveira<sup>§¶</sup>, Meike Hoffmeister<sup>§</sup>, Stepan Gambaryan<sup>‡||</sup>, Werner Müller-Esterl<sup>§</sup>,  
Jorge A. Guimaraes<sup>¶</sup> and Albert P. Smolenski<sup>§\*\*</sup>

From the <sup>§</sup>Institute of Biochemistry II, University of Frankfurt Medical School, Frankfurt,  
Germany;

<sup>¶</sup>Biotechnology Center, UFRGS, Porto Alegre, Brazil

<sup>‡</sup>Institute of Clinical Biochemistry and Pathobiochemistry, University of Würzburg, Germany;

<sup>||</sup>Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences,  
St Petersburg, Russia

Running title: PDE2A interacts with XAP2

\*\*Address correspondence to: Albert Smolenski, Institute of Biochemistry II, University of Frankfurt  
Medical School, Theodor-Stern-Kai 7, 60590 Frankfurt, Germany; Tel. +49-69-6301-5569; Fax. +49-  
69-6301-5577; E-Mail: [smolenski@biochem2.de](mailto:smolenski@biochem2.de).

Phosphodiesterase type 2A (PDE2A) hydrolyzes cyclic nucleotides cAMP and cGMP thus efficiently controlling cNMP-dependent signaling pathways. PDE2A is composed of an N-terminal region, two regulatory GAF domains and a catalytic domain. Cyclic nucleotide hydrolysis is known to be activated by cGMP binding to GAF-B, however, other mechanisms may operate to fine-tune local cyclic nucleotide levels. In a yeast-two-hybrid screening we identified XAP2, a crucial component of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) complex, as a major PDE2A-interacting protein. We mapped the XAP2 binding site to the GAF-B domain of PDE2A. PDE assays with purified proteins showed that XAP2 binding does not change the enzymatic activity of PDE2A. To analyze if PDE2A could affect the function of XAP2 we studied nuclear translocation of AhR, i.e. the master transcription factor controlling the expression of multiple detoxification genes. Notably, regulation of AhR target gene expression is initiated by tetrachlorodibenzodioxin (TCDD) binding to AhR and by a poorly understood cAMP-dependent pathway, followed by the translocation of AhR from the cytosol into the nucleus. Binding of PDE2A to XAP2 inhibited TCDD- and cAMP-induced nuclear translocation of AhR in Hepalclc7 hepatocytes. Furthermore, PDE2A attenuated TCDD-induced transcription in reporter gene assays. We conclude that XAP2 targets PDE2A to the AhR complex thereby restricting AhR mobility, possibly by a local reduction of cAMP levels. Our results provide first insights into the elusive cAMP-dependent regulation of AhR.

Cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs) catalyze the hydrolysis of cAMP and/or cGMP. In conjunction with adenylyl and guanylyl cyclases PDEs regulate the amplitude and duration of cell signaling events mediated by cyclic nucleotides. In this context PDEs are involved in a broad range of biological responses such as cardiac contractility, platelet aggregation, lipolysis, glycogenolysis, smooth muscle contraction, ion channel conductance, and apoptosis (1). Sequence analyses suggest that 11 different families of mammalian PDEs exist and most of these families contain more than one gene product. Furthermore, many of these genes can be alternatively spliced in a tissue specific manner to give rise to several different isoenzymes with altered regulatory properties, subcellular localization and different substrate specificities. The distinct cellular localization and biophysical characteristics of the various PDEs suggest that each PDE is individually regulated and plays distinct roles in specific physiological processes (2).

PDE2A is activated by cGMP and degrades both, cAMP and cGMP. PDE2A is highly expressed in the brain and heart, but it is also found in lung, kidney, liver and adrenal gland (3). One of the first specific functions attributed to PDE2A was the regulation of aldosterone production in adrenal zona glomerulosa cells (4). Recently, PDE2A was found to attenuate spatially confined pools of cAMP in cardiac myocytes, thereby affecting contractile function (5). Moreover, PDE2A appears to increase permeability of endothelial layers and thus to impair endothelial barrier function (6). PDE2A is composed of an N-terminal domain of unknown function, two

central GAF domains (A and B) and a C-terminal catalytic domain (7,8). Structural analysis of the PDE2A GAF domains revealed that only the GAF-B domain is involved in cGMP binding, whereas the N-terminal GAF-A domain is required for dimerization (7).

Here we report that PDE2A associates with XAP2, a member of the immunophilin protein family. XAP2 (also known as ARA9 or AIP) is a 38-kDa protein that was initially identified as a protein binding to the hepatitis B virus X protein (9) and in parallel also as binding partner of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) (10-12). XAP2 shares sequence identity with FKBP52, an immunophilin of the FK506 binding proteins and an established component of the glucocorticoid receptor complex. Although XAP2 contains an immunophilin homology domain within its N-terminal region, no binding to immunosuppressant drugs was found (10). The C-terminus of XAP2 contains multiple tetratricopeptide repeat (TPR) motifs that mediate protein-protein interactions (13) and XAP2 has been shown to engage in a multiprotein complex together with a dimer of Hsp90, p23 and AhR (14,15). AhR is a ligand-activated transcription factor and belongs to the basic helix-loop-helix Per/ARNT/Sim family of proteins (16,17). The activity of the AhR is regulated by structurally diverse xenobiotics such as the high affinity ligand 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) (18). Upon ligand binding, the AhR translocates to the nucleus and dimerizes with the structurally related protein ARNT. The resultant complex interacts with enhancer elements upstream of target promoters and drives the transcription of a host of xenobiotic metabolizing enzymes (19). Recently, cAMP has been described as a mediator of AhR translocation, acting as a repressor rather than an activator of AhR-dependent gene expression (20), however the underlying molecular pathways have remained elusive. Here we identify a functional interaction between PDE2A and AhR pathways that is mediated by XAP2, an essential component of the AhR complex, providing a direct link between cAMP- and TCDD-dependent pathways.

#### EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Materials.** The full length PDE2A cDNA (Clone IRAKp961N0275Q2, GenBank™ accession number BC040974) was obtained from RZPD (Berlin, Germany). 8-Br-cAMP and db-cAMP were from Biolog (Bremen, Germany),

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) and forskolin were from Sigma (Taufkirchen, Germany). HRP-coupled goat-anti-rabbit and goat-anti-mouse were from Dianova (Hamburg, Germany).

**Two-hybrid screening.** The complete PDE2A cDNA was cloned into the SfiI and SalI sites of the pGBKT7 vector (Clontech, Takara Bio Europe, St-Germain-en-Laye, France). This construct encodes a fusion between the amino-terminal end of PDE2A and the Gal4 DNA-binding domain (bait). The screen was performed with a human brain two-hybrid cDNA library (Matchmaker Two-Hybrid System 3, Clontech) cloned into the XhoI and EcoRI sites of the pACT2 vector and expressing proteins as fusions with the Gal4 protein activation domain. This library was transformed into *S. cerevisiae* strain AH109 expressing the PDE2A bait construct. Positive clones were initially selected for growth in the absence of adenine, histidine, leucine and tryptophane. Library plasmid DNA was isolated from the positives clones and re-transformed into yeast strain AH109 containing the bait and the re-transformed positives clones were further assayed for the PDE2A interaction.

**Cell culture and transfection.** COS-1 and HeLa cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum (PAA, Pasching, Austria) and 1% penicillin/streptomycin (PAA). Transient transfections of COS-1 cells were performed with DEAE-dextran. Briefly,  $6 \times 10^5$  cells were seeded per 10 cm dish. On the following day, cells were washed with PBS, and expression plasmids were applied in 5.7 ml serum-free DMEM mixed with 300  $\mu$ l of DEAE-dextran (1 mg/ml stock) and 12  $\mu$ l chloroquine (100mM stock). After incubation for 2 hours, the transfection mixture was removed and cells were cultured in DMEM with 10% FCS for 48 hours prior to harvesting. HeLa cells were transiently transfected using Metafectene (Biontex, Martinsried, Germany) according to the manufacturer's instructions. The mouse hepatoma cell line (Hepal1c7), a kind gift from Barbara Oesch-Bartlomowicz (University of Mainz, Mainz, Germany), was propagated in  $\alpha$ -MEM (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) supplemented with 10% FCS and 1% penicillin/streptomycin and transfections were performed with Fugene 6 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's instructions. All cells were maintained as monolayers in an atmosphere of

5% CO<sub>2</sub> and 95% air under saturating humidity at 37°C.

*Generation of mammalian cell expression constructs.* The PDE2A cDNA was cloned into the EcoRV and HindIII sites of the pSG8 vector (21) to generate a fusion construct with a N-terminal vesicular stomatitis virus glycoprotein epitope (VSV) sequence. A similar expression plasmid was generated to encode only the GAF-B domain of PDE2A. The circular site-directed mutagenesis method was used to introduce stop codons into the full length PDE2A cDNA in pSG8 to obtain constructs expressing the N-terminus (N-PDE2A), whole GAF A and GAF A/B domains N-terminally fused to a VSV tag. The complete XAP2 cDNA (GenBank™ accession number U31913) was cloned into the HindIII and XhoI sites of pcDNA4/TO (Invitrogen) with a FLAG epitope-tag immediately downstream of the last codon of the XAP2 cDNA and into pcDNA3.1-myc containing a myc-epitope at the N-terminus. The FLAG-AhR (human) construct was a kind gift of Gary H. Perdew (Pennsylvania State University) and the p1646p1Luc3 reporter plasmid was provided by Alvaro Puga (University of Cincinnati).

*Pull-down experiments.* The XAP2 cDNA was cloned into the SmaI and NotI site of the pGEX4T-3 vector (GE Healthcare, Freiburg, Germany) to generate a fusion between glutathione S-transferase (GST) and the amino-terminus of XAP2. Additionally, XAP2 truncated constructs encoding GST fusions to the amino-terminal (amino-acids 1-169; to create GST-N-XAP2) or carboxy-terminal (amino-acids 170-330; to create GST-C-XAP2) regions of XAP2 were generated. *E. coli* BL21(DE3) were transformed with these constructs and protein expression was induced with 0.4 mM of isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG) for 3 hours at 37°C. The recombinant proteins were purified with glutathione 4B-Sepharose beads (GE Healthcare). COS-1 cells transfected with expression constructs for VSV-PDE2A were lysed by scraping in 500 µl of ice-cold lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, including the following protease inhibitors: 1.12 mM DTT, 50 µM chloroquine, 2 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml leupeptin and 1 µg/ml PMSF). Lysates were centrifuged for 20 min at 13,000 x g and 4 °C and the cleared supernatants were collected. GST pull-down experiments were carried out by incubating 10 µl of glutathione sepharose beads saturated with GST-XAP2, GST-N-XAP2 or

GST-C-XAP2 with 500 µl of cleared COS-1 cell lysates for 4 hours at 4°C. Beads were washed 5 times with lysis buffer before adding 10 µl 3x SDS sample buffer and boiling for 5 minutes. Proteins were separated on 10% SDS-PAA gels and identified by immunoblotting with anti-VSV antibody (clone P5D4 obtained from Sigma). For activity assays the GST fusion proteins were eluted from the beads with 800 µl of 10 mM reduced L-glutathione (Sigma)

*Immunoprecipitation.* Cells were harvested and lysed by scraping in 500 µl of ice-cold lysis buffer. Lysates were centrifuged for 20 min at 13,000 x g and 4 °C and supernatants were used to precipitate XAP2-FLAG using 5 µl of anti-FLAG M2 Affinity Gel (Sigma) at 4 °C for 2 h. Immunoprecipitates were washed four times with 1 ml of lysis buffer and coprecipitated VSV-PDE2A was detected by immunoblotting with anti-VSV antibody. For immunoprecipitation of endogenous proteins male CD rats were anaesthetized by ether and decapitated. Brain tissue was immediately isolated and homogenized in immunoprecipitation (IP) buffer (50 mM Tris, pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% IGEPAL, 0.1 mM PMSF and protease inhibitors complete Mini (Roche Diagnostics)). Insoluble material was removed and supernatants were incubated with either rabbit IgG as control, XAP2 antibody (Abcam, Cambridge, UK), or PDE2A antibody (FabGennix Inc., Frisco, TX) for 1 h at 4°C. Then protein G (for XAP2 sample) or protein A (for control and PDE2A sample) Sepharose 4B fast flow beads (GE Healthcare) were added for 1 h. Immune complexes were washed 3 times with IP buffer and twice with PBS and precipitated proteins were detected by immunoblotting.

*PDE2A activity assay.* COS-1 cells (5 x 10<sup>6</sup> cells) transfected with pSG8-PDE2A or with empty pSG8 vector (mock) were harvested in 1 ml lysis buffer and immunoprecipitated with 10 µl of mouse anti-VSV antibody for 2 hours followed by incubation with 200 µl protein A/G-PLUS agarose beads (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) for 1 hour. Beads were washed 4 times with 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5). Catalytic activity of PDE2A was assayed using the PDElight™ kit (Cambrex Bio Science, Verviers, Belgium) according to the manufacturer's instructions. Briefly, PDE2A induced hydrolysis of cAMP generates AMP which is phosphorylated to ATP. ATP is the energy source for the luciferin/luciferase oxidation reaction resulting in light emission. The emitted light is

directly proportional to the level of AMP present in the reaction which is a function of PDE activity. 5  $\mu$ l of PDE2A beads (approximately 2.5 nM final concentration) were incubated with 125 nM of each GST fusion protein: GST-XAP2, GST-N-XAP2, GST-C-XAP2 or GST in 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM MgCl<sub>2</sub> buffer for 10 minutes at room temperature, followed by addition of 25  $\mu$ M cAMP and incubation for 1 hour at 30°C. The reaction was stopped and luminescence was measured using a 96-well microplate reader Wallac Victor<sup>3</sup> 1420 Multilabel Counter (Perkin Elmer, USA).

**AhR translocation and co-localization experiments.** 0.15  $\times$  10<sup>5</sup> Hepal1c7 cells were seeded per chamber (1.8 cm<sup>2</sup>) of a 4-chamber slide, allowed to grow for 48 hours and transfected without or with the expression vector for VSV-tagged PDE2A. 24 hours posttransfection, cells were incubated with 2 mM 8-Br-cAMP, 20  $\mu$ M forskolin or 5 nM 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) for 1h at 37°C, fixed with 3.7% paraformaldehyde and permeabilized with 0.2% Triton-X-100 in PBS. Then cells were incubated with anti-AhR M20 (1:50, Santa Cruz Biotechnology) and anti-VSV P5D4 (Sigma) for 2 hours, followed by incubation with Cy3-conjugated anti-goat IgG and Cy2-conjugated anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch, Newmarket, England) for 1 hour. For co-localization experiments, HeLa and Hepal1c7 cells were transfected with pSG8-VSV-PDE2A and pcDNA3.1-myc-XAP2. After 1 day cells were fixed and permeabilized as described above and stained with anti-VSV and anti-myc (Santa Cruz Biotechnology) primary antibodies for 1 hour at 37°C followed by staining with Cy-conjugated antibodies as described. Chamber slides were mounted in GEL/mount (Biomedica, Foster City, CA) and cells were analyzed with a Zeiss LSM 510 confocal laser scanning microscope equipped with a Plan-Apochromat 63 /1.4 oil DIC objective lens and LSM 510 META software (Carl Zeiss, Göttingen, Germany). For quantitative evaluation of PDE2A effects on AhR translocation 70 to 200 cells from at least three independent experiments were analyzed. Cells exhibiting cytosolic as well as nuclear staining of AhR were assigned to the "spread" group, whereas cells having a stronger or exclusive nuclear AhR staining were assigned "nuclear".

**Reporter assay.** 0.3  $\times$  10<sup>4</sup> Hepal1c7 cells were seeded per well of a 96 well plate. After 48 hours cells were transfected with 10 ng

of pRL-SV40 (Promega GmbH, Mannheim, Germany), 225 ng of either pGL3-Basic (Promega) or p1646p1Luc3 and 75 ng of either pSG8 or PDE-pSG8. 24 hours posttransfection, cells were stimulated with 5 nM TCDD for 4 h. The luminescence was measured using the Dual-Luciferase Assay System (Promega) according to the manufacturer's instructions. The relative light units (RLU) were normalized to the expression of the *Renilla* luciferase. Data were collected from 4 independent experiments performed in quadruplicate. To verify expression of PDE, lysed cells were collected after each experiment, proteins were precipitated using acetone, solubilized in SDS sample buffer and analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting.

## RESULTS

### *Yeast two-hybrid screening for PDE2A interaction partners and identification of XAP2*

To identify proteins that interact with PDE2A we performed a yeast two-hybrid screen. We used human PDE2A as bait and a human adult brain cDNA library as prey. A total of 236 clones were isolated and rescreened by retransformation and X-Gal staining. The remaining 141 positive clones were sequenced, cDNA artifacts and extracellular proteins were excluded, and 6 out of 25 putative PDE2A binding partners were selected for further analysis. We expressed the candidate proteins in *E.coli* as GST fusion proteins coupled to the C-terminus of GST. Pull-down assays were performed using lysates from mammalian COS-1 cells transfected with PDE2A expression vectors. Two of these GST fusion proteins bound to PDE2A and one of these was XAP2, a 330 amino-acid protein of the immunophilin family (Fig. 1A and B). For control unfused GST was used revealing that GST alone does not pull-down PDE2A (Fig. 1A and B).

### *PDE2A interacts with XAP2 in intact mammalian cells*

To confirm that PDE2A and XAP2 bind to each other in intact cells we performed co-immunoprecipitation experiments. For this purpose, the VSV epitope was fused to the N-terminus of PDE2A, and XAP2 was C-terminally tagged with a FLAG epitope. Both proteins were expressed in COS-1 cells, either alone or in combination, and XAP2 was precipitated using anti-FLAG. Analysis of the precipitates by immunoblotting with anti-VSV revealed the presence of PDE2A only in precipitates from

cells expressing both PDE2A and XAP2 (Fig. 1C). We confirmed the binding in a reverse experiment using anti-VSV to precipitate PDE2A followed by blotting for XAP2 with anti-FLAG (data not shown). To verify the interaction of PDE2A and XAP2 at the level of endogenous proteins we performed co-immunoprecipitation experiments in lysates prepared from brain tissue. Analysis of the total lysate by immunoblotting confirmed the expression of both, PDE2A and XAP2 (Fig. 1D, first lane). Using a specific antibody against XAP2 we could precipitate endogenous XAP2. Immunoblotting of the XAP2 precipitates with a PDE2A antibody revealed the presence of endogenous PDE2A (Fig. 1D, third lane). In a reverse experiment using anti-PDE2A for immunoprecipitation we could detect XAP2 in the precipitates by immunoblotting. No unspecific binding of the proteins occurred in a control experiment using non-specific IgG (Fig. 1D, second lane). These results clearly confirm the interaction of PDE2A with XAP2.

#### *PDE2A and XAP2 colocalize in cells*

Next we investigated the subcellular localizations of PDE2A and XAP2 by immunofluorescence. Since our antibodies to FLAG generated a strong unspecific background in immunofluorescence stainings we created a myc-tagged construct of XAP2. HeLa cells were cotransfected with VSV-tagged PDE2A and myc-tagged XAP2 followed by fixation and immunostaining with tag-specific primary antibodies and labeled secondary antibodies. Both proteins localized to the cytosol in a reticular pattern (Fig. 2). Occasionally, staining of regions close to the plasma membrane could be observed. The subcellular distributions of PDE2A and XAP2 were similar and the overlay revealed an extensive colocalization of the two proteins (Fig. 2C). A similar result was obtained after transfection and staining of PDE2A and XAP2 in mouse Hepa1c1c7 cells (data not shown). To exclude cross-reactivity of secondary antibodies we stained transfected cells with a single primary antibody at a time, followed by both secondary antibodies. Only the appropriate secondary antibody bound to its target primary antibody confirming specificity of the probes (data not shown). Together these experiments show that PDE2A and XAP2 may interact *in vitro* and in intact cells.

#### *The GAF-B domain of PDE2A mediates binding to XAP2*

To determine the domain of PDE2A involved in binding to XAP2 we generated various constructs

of PDE2A containing either the N-terminus of PDE2A (N-PDE2A), the N-terminus and the GAF-A domain (GAF-A), the N-terminus and both GAF domains (GAF-A/B), or the GAF-B domain alone (GAF-B) (Fig. 3A). All PDE2A constructs were N-terminally fused to VSV. The constructs were transfected into COS-1 cells and full-length GST-XAP2, as well as GST alone as control were used to precipitate the various PDE2A constructs from cell lysates. Full-length PDE2A, GAF-A/B and the GAF-B domain alone readily bound to XAP2, while N-PDE2A and GAF-A alone failed to bind XAP2 (Fig. 3B). We conclude that the GAF-B domain of PDE2A is necessary and sufficient to mediate interaction with XAP2.

#### *The C-terminus of XAP2 is required for binding to PDE2A*

XAP2 is composed of a N-terminal immunophilin homology domain and a TPR domain at the C-terminus (Fig. 4A). TPR domains are known to mediate protein/protein interactions (10). To identify the region involved in the binding of XAP2 to PDE2A we constructed two GST-fusion proteins containing the N-terminal half of XAP2 (N-XAP2) or its C-terminus, including the TPR domain (C-XAP2). For control GST alone and full-length GST-XAP2 were used. Proteins were expressed in *E. coli* (Fig. 4B), affinity-purified and used to pull-down PDE2A from lysates of COS-1 cells transfected with the VSV-tagged full-length PDE2A construct. Figure 4B demonstrates that all constructs migrated at their expected molecular weight. Full-length XAP2 and C-XAP2 bound to PDE2A, whereas GST alone and N-XAP2 did not (Fig. 4C). These data suggest that XAP2 interacts with PDE2A via its C-terminal domain, most likely via its TPR motif.

#### *Binding of XAP2 does not change the catalytic activity of PDE2A*

To monitor for functional consequences of XAP2 binding to PDE2A we measured the catalytic activity of PDE2A *in vitro* in the presence or absence of XAP2. For this purpose we expressed VSV-tagged wild-type PDE2A in COS-1 cells. PDE2A was purified from cellular lysates by immunoprecipitation using anti-VSV, and the purity of the preparation was assessed (Fig. 5A). Full-length XAP2, as well as N-XAP2 and C-XAP2 were expressed as GST fusion proteins in *E. coli*. To test the specificity of our PDE assay and to rule out unspecific effects by endogenous esterases from COS-1 cells we tested PDE

activity in various cell lysates. A 20-fold increase in PDE activity was observed in preparations isolated from PDE2A-expressing COS-1 cells over mock-transfected COS-1 cells or buffer alone (Fig. 5B). Addition of cGMP to the assay did not increase the catalytic activity of PDE2A (data not shown), indicating that the enzyme was fully saturated with cGMP due to the high cytosolic cGMP concentration in COS-1 cells (approximately 10  $\mu$ M (22)) and the high binding affinity of PDE2A for cGMP ( $IC_{50}$  = 22 nM (8)). Next, we measured PDE activities in the absence and presence of XAP2. To mimic high local concentrations of XAP2 in subcellular compartments, we used a 50-fold molar excess of XAP2 constructs (125 nM) over PDE2A (2.5 nM). Neither full-length nor N- or C-XAP2 constructs significantly changed the catalytic activity of PDE2A (Fig. 5B). We conclude that XAP2 binds to PDE2A without affecting its catalytic capacity. By implication we infer that XAP2 does not interfere with cGMP binding, though this has not been tested experimentally.

*PDE2A inhibits nuclear translocation of the AhR complex in Hepal1c7 cells*

XAP2 is a well established component of the AhR complex (10-12). Binding of ligands such as TCDD triggers translocation of the complex to the nucleus. Translocation is followed by a reorganization of the protein complex, recruitment of the ARNT protein, and finally docking to target genes. Because cAMP has been shown to induce nuclear translocation of the AhR (20), we wondered whether PDE2A affects TCDD-induced nuclear translocation of the AhR. For these experiments we used Hepal1c7 cells which are known to express AhR and XAP2 endogenously (12). After transfection of PDE2A cDNA cells were incubated for 1 h with 5 nM TCDD and the subcellular localization of AhR was monitored by indirect immunofluorescence. Untreated cells exhibited a diffuse localization of AhR all over the cytosol and occasionally involving the nucleus. In some untreated cells expressing PDE2A a reduced nuclear staining of AhR was observed (Fig. 6B and C). As expected, TCDD induced a strong enrichment of AhR in the nucleus, while the cytosol appeared largely devoid of AhR (Fig. 6, A versus D). In PDE2A expressing cells (Fig. 6E and F) AhR staining remained diffuse without significant nuclear accumulation of AhR in most cells. Next, we tested the effects of PDE2A on cAMP-mediated nuclear translocation of the AhR. In line with previous findings (20) forskolin, an activator of

adenylyl cyclase, and cAMP analog 8-Br-cAMP induced nuclear translocation of AhR (Fig. 6G and J). Compared to TCDD, the effects induced by cAMP were not so drastic and some degree of cytosolic AhR staining always remained after cAMP treatments, in accordance with previous observations (20). In PDE2A expressing cells cAMP-induced nuclear translocation of AhR was strongly reduced (Fig. 6H and I versus 6G and 6K and L versus 6J). Quantitative evaluation of these experiments showed that TCDD, forskolin and 8-Br-cAMP induced nuclear translocation of AhR in approximately 80% (78.6% to 82.6%) of the cells (Table 1). In PDE2A expressing cells we found that the TCDD-induced nuclear translocation of AhR was substantially reduced to 43%. Nuclear translocation induced by forskolin or 8-Br-cAMP in PDE2A expressing cells was down to 23.5 % and 18% respectively, of control (Table 1). Thus the presence of PDE2A significantly interferes with the nucleo-cytosolic distribution pattern of AhR.

*PDE2A attenuates gene expression induced by TCDD in Hepal1c7 cells*

To test if the reduced nuclear translocation of the AhR interfered with its function in the nucleus we performed reporter gene assays. We transfected a reporter construct containing the cytochrome P450 (Cyp1a1) natural promoter, including 6 dioxin responsive elements, fused to luciferase into Hepal1c7 cells. As shown before (20), treatment with TCDD increased the expression of the reporter gene (Fig. 7). Expression of PDE2A resulted in a moderate but significant reduction of TCDD-dependent induction of the reporter (Fig. 7). In cells expressing a control plasmid lacking the Cyp1a1 promoter no significant changes in reporter gene activity were observed (Fig. 7). We conclude that inhibition of nuclear translocation of AhR by PDE2A correlates with reduced AhR function.

## DISCUSSION

PDE2A is one of the major phosphodiesterases that regulates cyclic nucleotide levels through positive feed-back mechanisms, i.e. increasing cGMP concentrations stimulate phosphodiesterase activity thus keeping intracellular cyclic nucleotide levels in tight check. Accumulating evidence suggests that local cGMP levels may be important to drive cyclic nucleotide-dependent signaling cascades in distinct subcellular compartments, and therefore it has been speculated that effector proteins



binding to PDE2A may impact on various cGMP-dependent processes. For instance, Bentley et al. showed by a co-immunoprecipitation approach that various phosphoproteins can bind to epitope-tagged PDE2A in PC12 cells, however, the identity of these phosphoproteins was not disclosed (23). Here we have identified XAP2 as a novel binding partner of PDE2A, and we provide evidence for a new role of PDE2A in the AhR pathway. Other binding partners for PDE2A may well exist, as revealed by the results of our yeast two-hybrid screening, however, these potential interactors await further characterization.

#### *The GAF-B domain of PDE2A mediates XAP2 binding*

PDE2A contains regulatory segments consisting of two GAF domains A and B. cGMP binds exclusively to GAF-B and enhances allosterically its catalytic activity, accounting for numerous physiological consequences *in vivo* (7,8). N-terminal tandem GAF domains are present in 5 out of 11 mammalian PDE families. The ligand for the GAF domains of PDEs 2, 5, 6 and 11 is cGMP, whereas cAMP binds to PDE10 (24). Binding of proteins to the GAF domains of PDEs has not been reported to date. Our biochemical analyses clearly show that the GAF-B domain is necessary and sufficient to mediate binding of XAP2 to PDE2A.

Interestingly, Bolger et al. have recently identified XAP2 as a specific interaction partner for the cAMP-specific PDE4A5 (25). In their study XAP2 binding was specifically restricted to the A5 isoform of PDE4, whereas PDE4 isoforms A1, A8, B2, B3, D3, D4 and D5 did not bind XAP2. A careful mapping study revealed that the N-terminal region of PDE4A5 holding an EELD motif in the upstream conserved region-2 exposes the major binding site of XAP2. This segment has no apparent similarity to GAF-B of PDE2A, suggesting different modes of XAP2 binding among PDE isotypes.

#### *The C-terminal part of XAP2 docks to PDE2A*

Our mapping studies revealed that the C-terminus of XAP2 is solely responsible for PDE2A binding. This C-terminal portion of XAP2 holds a TPR domain known to mediate protein-protein interactions critical for the assembly of multiprotein complexes (13,26). At present, the relationship between the number and arrangement of TPR repeats and their affinity and specificity for target proteins such as the various PDE subtypes is still unclear. The TPR domain of

XAP2 has also been implicated in the binding of Hsp90 (25,27,28). Our preliminary experiments indicate that XAP2 can bind simultaneously to PDE2A and Hsp90 (data not shown), however, the fact that Hsp90 binds to both, XAP2 and PDE2A, makes it difficult to discriminate between the various ternary complexes.

#### *Role of XAP2 for PDE function*

To test for functional consequences of XAP2 binding to PDE2A we initially employed activity assays with purified proteins. Our results clearly show that XAP2 binding does not affect the enzymatic function of PDE2A. This finding is not trivial because the target segment of XAP2, i.e. the GAF-B domain, binds cGMP thereby enhancing PDE activity more than 20-fold. For instance, binding of XAP2 to PDE4A5 drastically reduced the catalytic activity of this isoform *in vitro* (25). Furthermore, XAP2 increased the sensitivity of PDE4A5 towards the inhibitor rolipram and attenuated the ability of cAMP-dependent protein kinase to phosphorylate PDE4A5 (25). Thus it appears that XAP2 may exert distinct effects on the various PDE isotypes. In line with this notion, we found that XAP2 targets PDE2A to the AhR complex, thereby inhibiting nuclear translocation of AhR. Association of XAP2 with transcription factors appears to be a rather general phenomenon, e.g. with hepatitis B virus protein X (9), Epstein-Barr virus encoded nuclear antigen 3 (29), thyroid hormone receptor (30) and of course AhR (12). One might envisage that XAP2-mediated targeting of PDE2A to AhR and possibly other transcription factors might be important for the spatially controlled regulation of cyclic nucleotide levels (31). Mutations in the XAP2 gene are known to predispose to pituitary adenoma formation (32) and therefore it is well conceivable that PDE2A and/or PDE4A5 might be involved in the pathogenesis of this disease. It will be important to test these intriguing possibilities.

#### *Regulation of the AhR pathway by PDE2A*

The AhR multiprotein complex consists of XAP2, a dimer of Hsp90, p23 and AhR (14,15). Binding of xenobiotics such as TCDD to AhR leads to the translocation of the ligand-bound receptor from the cytosol to the nucleus where it up-regulates the transcription of multiple genes for e.g. phase I drug metabolizing enzymes such as the CYP1 family, and phase II enzymes such as UGT1A1, GST-Ya subunit, and NADPH-quinone-oxido-reductase (33). Participation of

AhR in organ development, maturation of the immune system as well as cell proliferation, and differentiation (34) clearly implies that AhR can also operate in the absence of exogenous ligands. To date, the nature of endogenous signal(s) triggering AhR translocation is still obscure. Therefore it came as a surprise when cAMP was identified as a potent mediator of AhR intracellular trafficking, acting as a repressor rather than an activator of AhR-dependent gene expression (20). In line with this notion, we could clearly demonstrate the permissive effects of PDE2A on cAMP-dependent translocation of native AhR. For example, forskolin (an adenylyl cyclase activator) and 8-Br-cAMP (a membrane-permeating cAMP analog)-induced nuclear translocation of AhR were inhibited in cells expressing PDE2A. In addition, we observed a reduction of TCDD-induced gene expression by PDE2A.

Our finding that PDE2A may serve as a regulatory component of the AhR complex has important implications. For instance, PDE2A binding may ensure AhR retention in the cytoplasm, possibly by lowering the local cAMP concentrations under a level required for AhR complex translocation. Hence present efforts aim at the precise mechanisms underlying the effects of PDE2 on AhR translocation and complex formation. Yet another challenge is to unravel the molecular mechanisms mediating the effects of cAMP on AhR translocation. In this context it is worth mentioning that AhR is not phosphorylated by cAMP-dependent protein kinase *in vitro* (data not shown) even though protein kinase A inhibitor H89 can abolish the cAMP-induced nuclear effects of AhR (20). Clearly a deeper understanding of the cAMP-driven effects on the AhR pathway will help to elucidate the role of PDE2A in this intricate signaling network surrounding AhR.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Barbara Oesch-Bartlomowicz, Alvaro Puga and Gary H. Perdew for kindly providing us with cDNA constructs and cell lines, and all members of the Institute for Biochemistry II for help and discussions. S.K.O. was funded by a scholarship from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior and the German Academic Exchange Service (CAPES/DAAD). S.G. was supported by grant WA366 and the work was supported by grant SFB553 both from the Deutsche Forschungsgemeinschaft.

#### REFERENCES

- Iffland, A., Kohls, D., Low, S., Luan, J., Zhang, Y., Kothe, M., Cao, Q., Kamath, A. V., Ding, Y. H., and Ellenberger, T. (2005) *Biochemistry* **44**, 8312-8325
- Soderling, S. H., and Beavo, J. A. (2000) *Curr Opin Cell Biol* **12**, 174-179
- Rosman, G. J., Martins, T. J., Sonnenburg, W. K., Beavo, J. A., Ferguson, K., and Loughney, K. (1997) *Gene* **191**, 89-95
- MacFarland, R. T., Zelus, B. D., and Beavo, J. A. (1991) *J Biol Chem* **266**, 136-142
- Mongillo, M., Tocchetti, C. G., Terrin, A., Lissandron, V., Cheung, Y. F., Dostmann, W. R., Pozzan, T., Kass, D. A., Paolocci, N., Houslay, M. D., and Zaccolo, M. (2006) *Circ Res* **98**, 226-234
- Seybold, J., Thomas, D., Witzenth, M., Boral, S., Hocke, A. C., Burger, A., Hatzelmann, A., Tenor, H., Schudt, C., Krull, M., Schutte, H., Hippenstiel, S., and Suttorp, N. (2005) *Blood* **105**, 3569-3576
- Martinez, S. E., Wu, A. Y., Glavas, N. A., Tang, X. B., Turley, S., Hol, W. G., and Beavo, J. A. (2002) *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 13260-13265
- Wu, A. Y., Tang, X. B., Martinez, S. E., Ikeda, K., and Beavo, J. A. (2004) *J Biol Chem* **279**, 37928-37938
- Kuzhandaivelu, N., Cong, Y. S., Inouye, C., Yang, W. M., and Seto, E. (1996) *Nucleic Acids Res* **24**, 4741-4750
- Carver, L. A., LaPres, J. J., Jain, S., Dunham, E. E., and Bradfield, C. A. (1998) *J Biol Chem* **273**, 33580-33587
- Ma, Q., and Whitlock, J. P., Jr. (1997) *J Biol Chem* **272**, 8878-8884
- Meyer, B. K., Pray-Grant, M. G., Vanden Heuvel, J. P., and Perdew, G. H. (1998) *Mol Cell Biol* **18**, 978-988
- Lamb, J. R., Tugendreich, S., and Hieter, P. (1995) *Trends Biochem Sci* **20**, 257-259

14. Fujii-Kuriyama, Y., and Mimura, J. (2005) *Biochem Biophys Res Commun* **338**, 311-317
15. Marlowe, J. L., and Puga, A. (2005) *J Cell Biochem* **96**, 1174-1184
16. Bock, K. W., and Kohle, C. (2006) *Biochem Pharmacol* **72**, 393-404
17. Harper, P. A., Riddick, D. S., and Okey, A. B. (2006) *Biochem Pharmacol* **72**, 267-279
18. Denison, M. S., and Nagy, S. R. (2003) *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **43**, 309-334
19. Ramadoss, P., Marcus, C., and Perdew, G. H. (2005) *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **1**, 9-21
20. Oesch-Bartlomowicz, B., Huelster, A., Wiss, O., Antoniou-Lipfert, P., Dietrich, C., Arand, M., Weiss, C., Bockamp, E., and Oesch, F. (2005) *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 9218-9223
21. Schultess, J., Danielewski, O., and Smolenski, A. P. (2005) *Blood* **105**, 3185-3192
22. Meurer, S., Pioch, S., Gross, S., and Muller-Esterl, W. (2005) *J Biol Chem* **280**, 33149-33156
23. Bentley, J. K., Juilfs, D. M., and Uhler, M. D. (2001) *J Neurochem* **76**, 1252-1263
24. Gross-Langenhoff, M., Hofbauer, K., Weber, J., Schultz, A., and Schultz, J. E. (2006) *J Biol Chem* **281**, 2841-2846
25. Bolger, G. B., Peden, A. H., Steele, M. R., MacKenzie, C., McEwan, D. G., Wallace, D. A., Huston, E., Baillie, G. S., and Houslay, M. D. (2003) *J Biol Chem* **278**, 33351-33363
26. D Andrea, L. D., and Regan, L. (2003) *Trends Biochem Sci* **28**, 655-662
27. Bell, D. R., and Poland, A. (2000) *J Biol Chem* **275**, 36407-36414
28. Petrusis, J. R., Kusnadi, A., Ramadoss, P., Hollingshead, B., and Perdew, G. H. (2003) *J Biol Chem* **278**, 2677-2685
29. Kashuba, E. V., Gradin, K., Isagulians, M., Szekely, L., Poellinger, L., Klein, G., and Kazlauskas, A. (2006) *J Biol Chem* **281**, 1215-1223
30. Froidevaux, M. S., Berg, P., Seugnet, I., Decherf, S., Becker, N., Sachs, L. M., Bilesimo, P., Nygard, M., Pongratz, I., and Demeneix, B. A. (2006) *EMBO Rep* **7**, 1035-1039
31. Zaccolo, M., Di Benedetto, G., Lissandron, V., Mancuso, L., Terrin, A., and Zamparo, I. (2006) *Biochem Soc Trans* **34**, 495-497
32. Vierimaa, O., Georgitsi, M., Lehtonen, R., Vahteristo, P., Kokko, A., Raitila, A., Tuppurainen, K., Ebeling, T. M., Salmela, P. I., Paschke, R., Gundogdu, S., De Menis, E., Makinen, M. J., Launonen, V., Karhu, A., and Aaltonen, L. A. (2006) *Science* **312**, 1228-1230
33. Ramadoss, P., and Perdew, G. H. (2005) *Biochemistry* **44**, 11148-11159
34. Carlson, D. B., and Perdew, G. H. (2002) *J Biochem Mol Toxicol* **16**, 317-325

#### FIGURE LEGENDS

**Figure 1.** PDE2A and XAP2 interact in pull-down and co-immunoprecipitation assays.

**1A:** Expression of XAP2 as GST fusion protein. XAP2, N-terminally fused to GST, and GST alone were purified from *E.coli* using GSH sepharose beads, subjected to SDS-PAGE and stained with Coomassie brilliant blue.

**1B:** Pull-down assay using either GST-XAP2 or GST. COS-1 cells were transfected with VSV-tagged PDE2A, 48 hours after transfection the cells were lysed (PDE2A input) and incubated with GST-XAP2 or GST, using the same amounts as shown in Fig. 1A, for 4 h at 4°C. The beads were washed 5x with lysis buffer before adding 3x SDS-buffer and boiling. Proteins were separated by SDS-PAGE, immunoblotted and stained with mouse anti-VSV followed by HRP-coupled secondary antibody and chemiluminescence detection. PDE2A migrates as a 110-kDa protein.

**1C:** Co-immunoprecipitation of PDE2A and XAP2. COS-1 cells were co-transfected with VSV-tagged PDE2A and FLAG-tagged XAP2. Cells were lysed 48 hours after transfection cells and XAP2 was immunoprecipitated with anti-FLAG M2 affinity gel for 2 h at 4°C. The immunoprecipitates were washed and analyzed by immunoblot using mouse anti-VSV antibody (upper panel). Likewise protein total cell lysates were separated by SDS-PAGE and immunoblotted (center and lower panels). Data are representative of at least five independent experiments.

**1D:** Co-immunoprecipitation of endogenous PDE2A and XAP2 from rat brain. Brain tissue was lysed and PDE2A or XAP2 proteins were precipitated using specific antibodies for 1 h at 4°C followed by protein A or G bound to sepharose beads for 1 h (IP). Precipitated proteins were solubilized, separated by SDS-PAGE and immunoblotted with PDE2A and XAP2 antibodies (IB). As control non-specific antibodies (IgG) were used. In the first lane expression of PDE2 and XAP2 in total brain lysate is shown. Data are representative of three independent experiments.

**Figure 2.** Co-localization of PDE2A and XAP2 in HeLa cells.

HeLa cells were co-transfected with myc-tagged XAP2 and VSV-tagged PDE2A. Cells were fixed 24 h after transfection, permeabilized and double-labeled with rabbit anti-myc and mouse anti-VSV followed by incubation with carbocyanine-conjugated secondary antibodies (Cy3-anti-rabbit and Cy2-anti-mouse). Cells were visualized by confocal microscopy. Panels A and B show stainings of myc-tagged XAP2 and VSV-tagged PDE2A alone, and panel C is the overlay of both pictures. Bar, 10  $\mu$ m. The figure is representative of three independent experiments.

**Figure 3.** The GAF B domain of PDE2A interacts with XAP2.

3A: PDE2A constructs. The scheme shows the PDE2A domain organization and indicates the size of deletion constructs used for binding site mapping experiments (see below).

3B: Mapping of the XAP2 binding site of PDE2A. COS-1 cells were transfected with N-terminally VSV-tagged PDE2A deletion constructs (see above). Cell lysates were prepared 48 h after transfection (input) and incubated with GST-XAP2 or GST coupled to beads for 4 h at 4°C. Beads were washed 5x with lysis-buffer before adding SDS-buffer and boiling. Proteins were separated by SDS-PAGE and identified by immunoblotting with mouse anti-VSV. Shown data are representative of at least 3 independent experiments.

**Figure 4.** XAP2 binds PDE2A through its TPR domain.

4A: XAP2 constructs. The scheme shows the XAP2 domains and the amino- (N-XAP2) and carboxy-terminal (C-XAP2) constructs used for pull-down experiments (see below).

4B: Expression of XAP2 constructs. SDS-PAGE analysis of GST fusion proteins used in the pull-down assay, proteins were stained with Coomassie brilliant blue.

4C: Mapping of the PDE2A binding region of XAP2. COS-1 cells were transfected with VSV-tagged full-length PDE2A. Cells were lysed 48 h after transfection (PDE2A input) and incubated with GST-N-XAP2, GST-C-XAP2, GST-XAP2 or GST alone. Precipitated proteins were analyzed by SDS-PAGE and bound PDE2A was identified by immunoblotting with mouse anti-VSV. Data are representative of at least three independent experiments.

**Figure 5:** XAP2 does not interfere with PDE2A catalytic activity.

5A: Recombinant expression of PDE2A: COS-1 cells were transfected with a vector encoding VSV-tagged PDE2A. Two days after transfection cells were lysed, PDE2A was precipitated using anti-VSV and protein A agarose and analyzed by SDS-PAGE and Coomassie staining. PDE2A migrates at a size of about 110 kDa, the bands at 50 kDa and 25 kDa correspond to the heavy and light chain (hc and lc) of the antibody used for purification (anti-VSV). The figure is representative of three independent experiments.

5B: PDE activity assay: PDE2A purified from transfected COS-1 cells (5  $\mu$ l, approximately 2.5 nM final concentration) bound to protein A agarose beads were incubated for 10 min at room temperature without or with 125 nM of each of the following GST derivatives: GST-XAP2, GST-N-XAP2, GST-C-XAP2 or GST alone. Then, 25  $\mu$ M cAMP (final concentration) was added and the PDE reaction was carried out for 1 hour at 30°C. As controls anti-VSV/protein A agarose precipitates from mock transfected COS-1 cells (mock) and buffer alone (buffer) were analyzed. After that, SDS loading buffer was added to the reaction mixtures and the concentration of PDE2A was monitored by SDS-PAGE and immunoblotting with anti-VSV (inset). Error bars indicate standard deviation. Shown is one representative experiment performed in quintuplicate; two additional experiments with similar results were done in triplicate each.

**Figure 6:** Cellular localization of AhR in PDE2A transfected cells. Hepa1c1c7 cells were grown on glass coverslips for 48 h before transfection with VSV-tagged PDE2A. One day post-transfection cells were treated with 5 nM TCDD (D and E, F), 20  $\mu$ M forskolin (G and H, I) or 2 mM 8-Br-cAMP (J and K, L) for 1 h at 37°C, fixed, permeabilized and stained with goat anti-AhR (M20) to visualize endogenous AhR and with mouse anti-VSV, to detect transfected PDE2A. This was followed by incubation with secondary antibodies (Cy3-anti-goat, Cy2-anti-mouse). PDE2A transfected cells are shown as merge of AhR (red) and PDE2A (green) stainings (B, E, H, K), or with the AhR staining alone (C, F, I, L). Untreated cells are presented as controls (A and B, C). Arrows point to cells that

exhibit a reduced nuclear AhR staining in the untreated state and to cells that have lost the capacity for AhR translocation under the respective treatment. Bar, 20  $\mu\text{m}$ . The experiments are typical of one done at least three times.

**Figure 7:** PDE2A inhibits TCDD-induced gene transcription. Hepal1c7 cells grown on 96 well plates were transfected with pGL3-Basic empty vector (control) or p1646p1Luc3 (Cyp1a1), a reporter vector containing firefly luciferase under the control of the cytochrome P450 1A1 natural promoter, together with VSV-tagged PDE2A. To quantitate transfection levels the pRL-SV40 vector was co-transfected which expresses *Renilla* luciferase constitutively. One day posttransfection cells were treated with 5 nM TCDD for 4 h at 37°C, lysed, luciferase activities were determined and plotted as ratios of firefly versus *Renilla* luciferase activities in relative light units (RLU). Levels of transfected PDE were analyzed by immunoblotting with an antibody against the VSV-tag (PDE, shown below). Data shown are means  $\pm$  S.E. of four independent experiments performed in quadruplicate; \* indicates that the difference is statistically significant ( $p < 0.02$ , *t*-test).

**Table 1:** AhR translocation in Hepal1c7 cells.

Quantitative evaluation of AhR translocation induced by treatment with TCDD, forskolin or 8-Br-cAMP in untransfected Hepal1c7 cells and in cells expressing PDE2A. Cells were assigned into two groups dependent on the subcellular distribution of the AhR. The "spread" group comprises cells with cytosolic as well as nuclear staining of AhR, whereas the cells of the "nuclear" group had a predominant or exclusive nuclear AhR staining. n indicates the number of analyzed cells. Shown data are derived from at least three independent experiments.

	AhR localization in untransfected cells		% AhR translocation
	spread	nuclear	
untreated (n=202)	195	7	3.5
TCDD (n=207)	36	171	82.6
forskolin (n=187)	40	147	78.6
8-Br-cAMP (n=194)	38	156	80.4

	AhR localization in PDE2A transfected cells		% AhR translocation
	spread	nuclear	
untreated (n=174)	170	4	2.3
TCDD (n=177)	100	77	43.5
forskolin (n=119)	91	28	23.5
8-Br-cAMP (n=72)	59	13	18.0

Figure 1

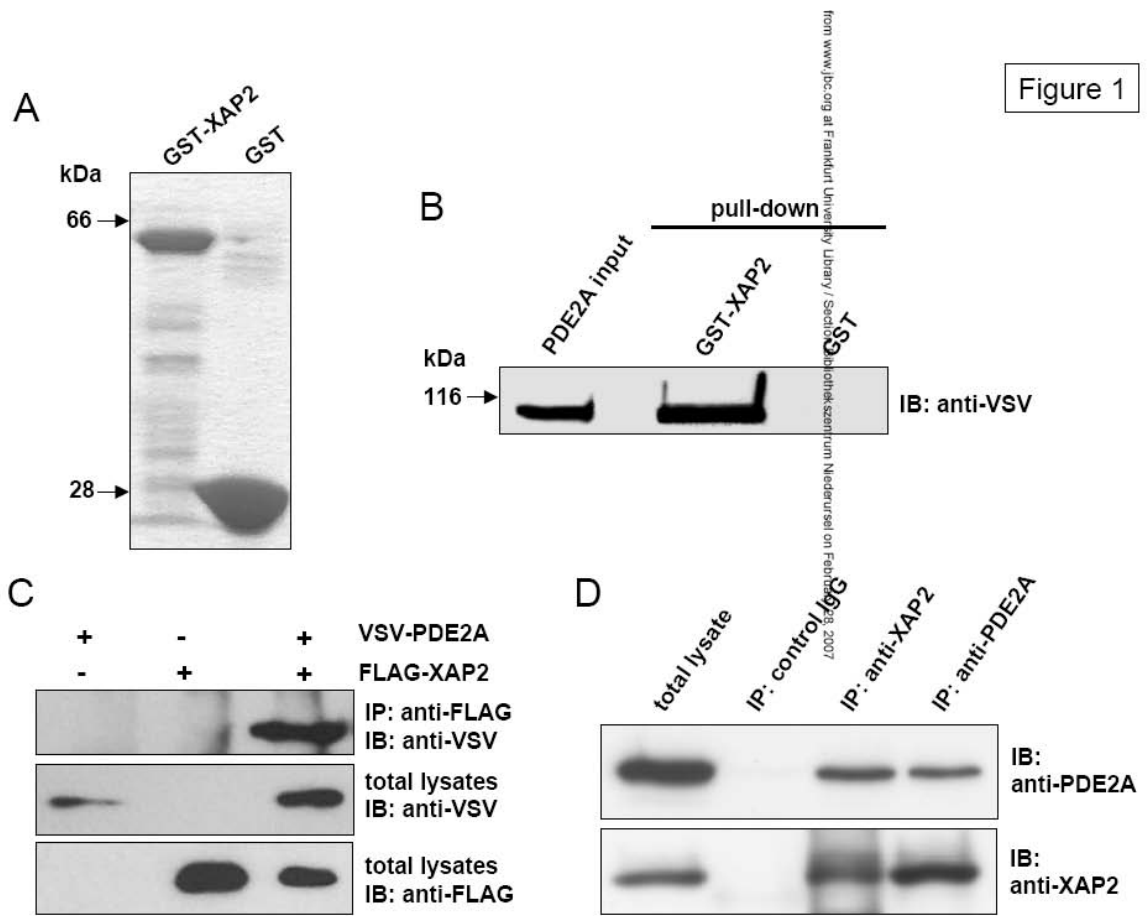


Figure 2

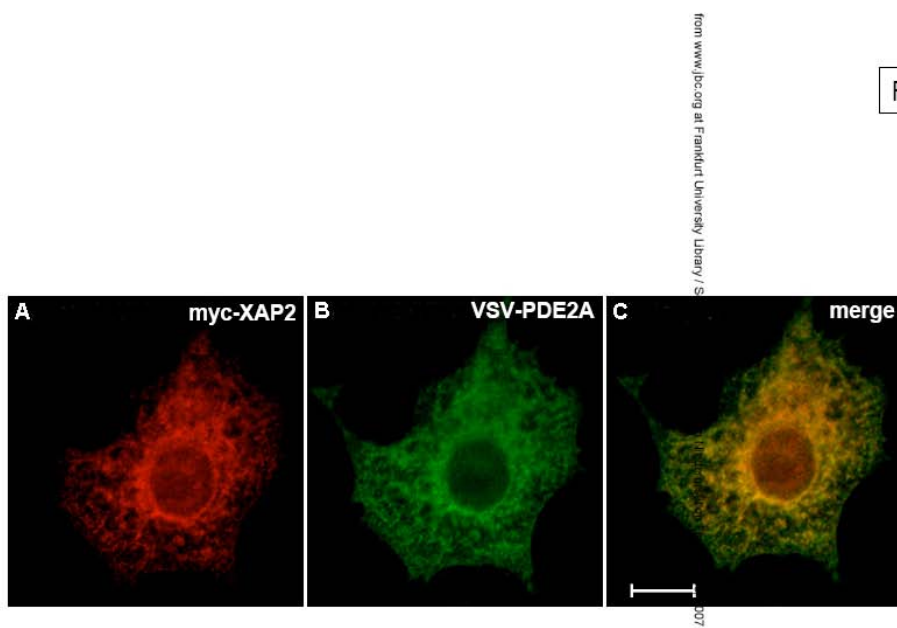
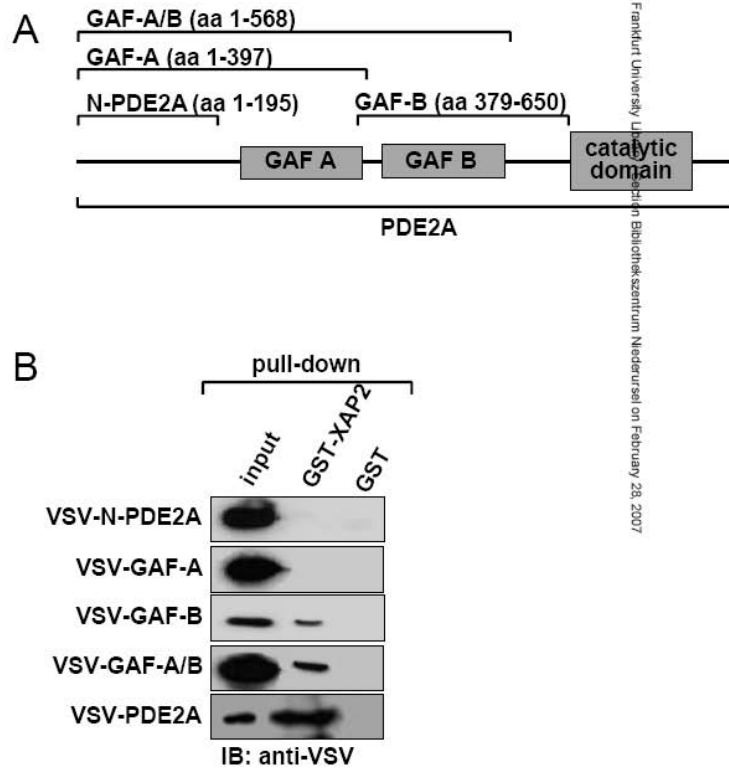
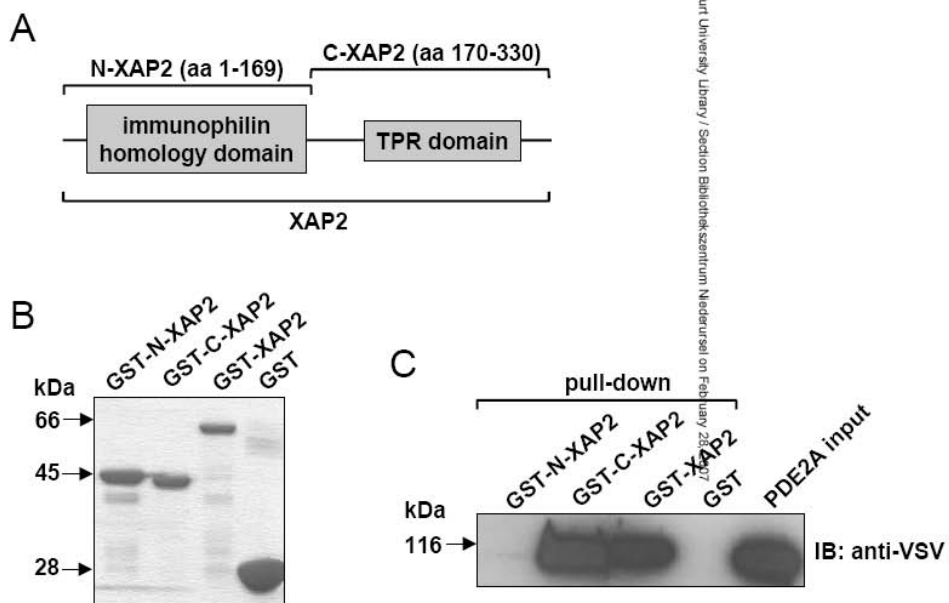


Figure 3



from www.jbc.org at Frankfurt University Library / Section Bibliothekszentrum Niederursel on February 28, 2007

Figure 4



from www.jbc.org at Frankfurt University Library / Section Bibliothekszentrum Niederursel on February 28, 2007

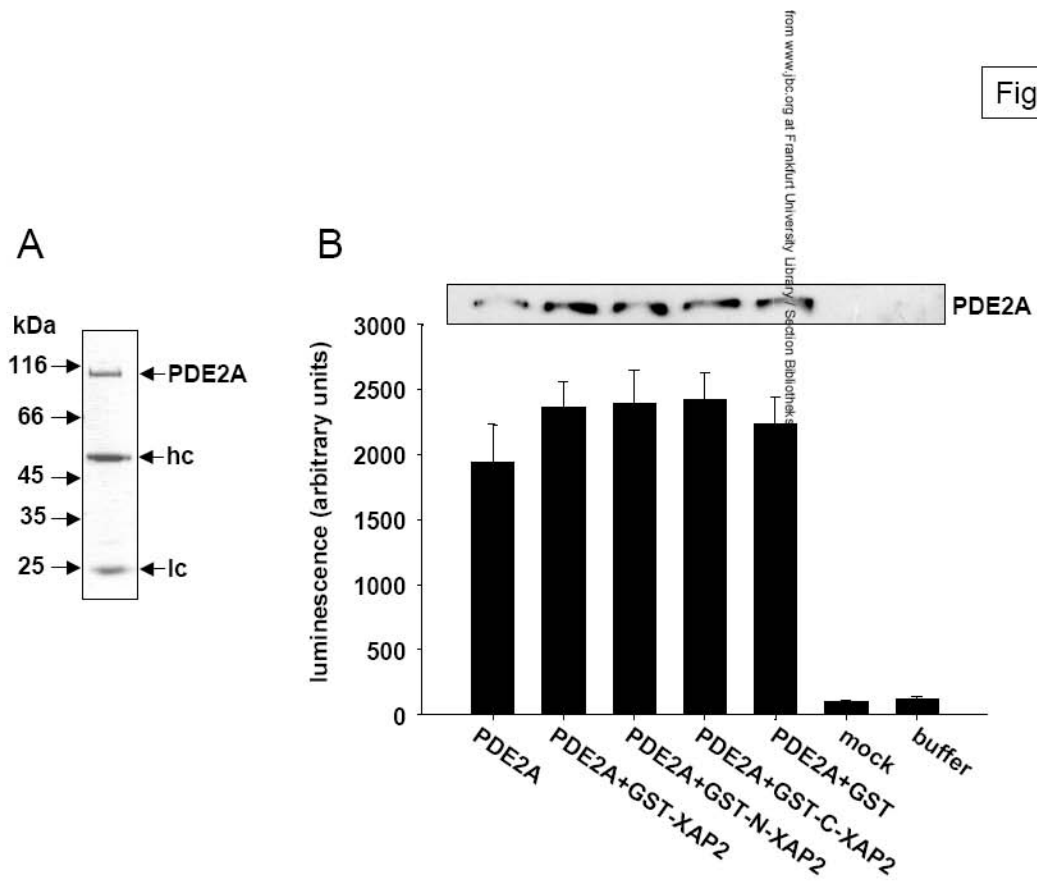
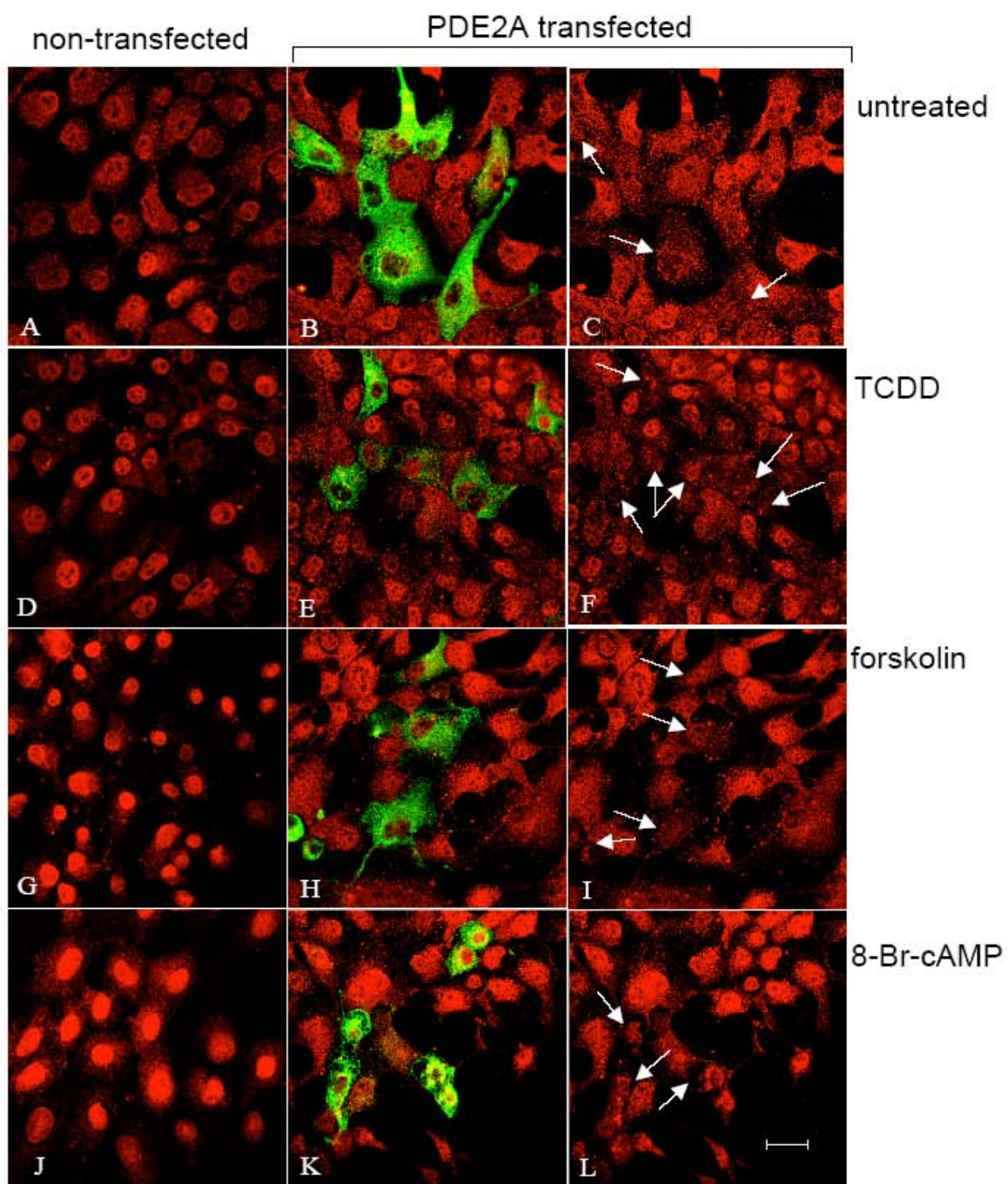


Figure 5



Figure 6



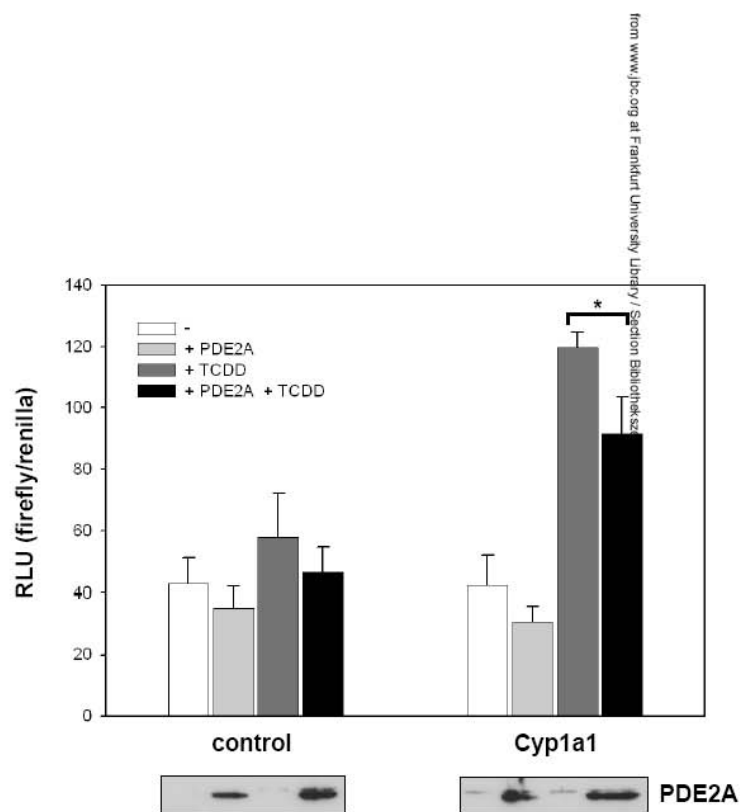


Figure 7