

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0611598-5 A2**

(22) Data de Depósito: 09/06/2006
(43) Data da Publicação: 21/09/2010
(RPI 2072)



(51) *Int.Cl.:*
C12N 9/12

(54) Título: **NOVO SÍTIO DE FOSFORILAÇÃO DE PROTEÍNAS CINASE ATIVADAS POR MITÓGENO, PROTEÍNAS MODIFICADAS E APLICAÇÕES**

(30) Prioridade Unionista: 10/06/2005 ES P200501404

(73) Titular(es): UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

(72) Inventor(es): CAMPO MUELAS, PEDRO MANUEL, JURADO PUEYO, MARÍA, MAYOR MENÉNDEZ, FEDERICO, MURGA MONTESINOS, CRISTINA, PEREGRÍN PEDRIQUE, SANDRA

(74) Procurador(es): Magnus Aspeby

(86) Pedido Internacional: PCT EP2006005542 de 09/06/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/028430 de 15/03/2007

(57) Resumo: NOVO SÍTIO DE FOSFORILAÇÃO DE PROTEÍNAS CINASE ATIVADAS POR MITÓGENO, PROTEÍNAS MODIFICADAS E APLICAÇÕES. Foi identificado um novo sítio de fosforilação de proteínas cinase ativadas por mitógeno (MAPK) . As MAPKs fosforiladas no dito sítio de fosforilação podem ser utilizadas como marcador diagnóstico de patologías mediadas por MAPKs.

**"NOVO SÍTIO DE FOSFORILAÇÃO DE PROTEÍNAS CINASE ATIVADAS POR
MITÓGENO, PROTEÍNAS MODIFICADAS E APLICAÇÕES"**

Campo da Invenção

A invenção se refere a um novo sítio de
5 fosforilação de proteínas cinase ativadas por mitógeno (MAPK,
Sigla do Inglês: *Mitogen-Activated Protein Kinase*), às ditas
MAPKs fosforiladas no dito sítio de fosforilação, assim como,
às suas aplicações.

Antecedentes da Invenção

10 O termo MAPK inclui três cascatas de cinases, ERK,
JNK e p38, e suas respectivas isoformas: [Pearson G., et al.,
2001, "*Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways:
Regulation and Physiological Functions*", *Endocrine Reviews*
22(2):153-183]. Os efeitos celulares mediados por estas
15 cinases são muito numerosos e abrangem todo o ciclo de vida
de uma célula: crescimento, divisão, diferenciação,
motilidade, respostas osmóticas, respostas ao estresse,
inflamação, câncer, etc.

A detecção de um determinado estímulo extracelular
20 se transmite a uma primeira cinase, denominada MAPKKK, cuja
diana são as serinas e treoninas de outra cinase, MAPKK. Esta
fosforilação determina a ativação de MAPKK, fosforilando
restos de serina e treonina em uma tríade T-Xaa-Y (onde T é
treonina, e é tirosina e Xaa é o resto de um aminoácido, tal
25 como, por exemplo, ácido aspártico, ácido glutâmico,
glutamina, glicina ou prolina) delimitada, chamada de
segmento de ativação, que porta a diana final desta cascata
trimodular. MAPK é a cinase efetora encarregada de

fosforilar em serina e treonina a numerosos substratos, tais como, fatores de transcrição, outras cinases, elementos estruturais, etc.

P38

5 A proteína p38 MAPK, ou p38, é uma enzima que pertence à família das cinases serina/treonina, que desempenha um importante papel na resposta celular a sinais de estrêsses externos, tais como, luz ultravioleta, choque osmótico, calor, etc. Por este motivo, esta proteína é também conhecida como proteína cinase ativada por estrêsse ou SAPK (do inglês, Strêss-Activated Protein Kinase). A p38 exerce seu papel regulador, controlando a expressão genética através da fosforilação e ativação de fatores de transcrição de outras cinases e também regulando a estabilidade de importantes mensageiros de ARN.

Existem quatro isoformas de p38 que diferem em sua distribuição nos diferentes tecidos e na sua sensibilidade aos distintos inibidores de p38, onde a mais estudada e, portanto, melhor conhecida, é a isoforma alfa, cuja ativação se tem observado em muitos tipos celulares (tanto de tecido hematopoiético como de tecido não hematopoiético), através de tratamento com um estímulo apropriado. Contudo, apesar destas diferenças, todas as isoformas de p38 possuem um domínio de ativação composto por 12 aminoácidos que contêm o segmento de ativação Thr-Gly-Tyr, o qual é fosforilado por MKK6/MKK3, enzimas da família das cinases, que se encontram por cima da p38 na cascata de sinalização celular.

A p38 se constitui em um regulador essencial das funções celulares que mediam a produção de citocinas e outras moléculas responsáveis pelo desenvolvimento de processos inflamatórios, participando em diferentes situações fisiológicas induzidas por estrêsse celular, como é o caso de algumas cardiopatias e fenômenos inflamatórios, e no controle do ciclo celular.

Durante vários anos, tem sido feita a análise da implicação que a p38 tem no desenvolvimento ou evolução de diferentes doenças. A importância da ativação da p38 no estabelecimento e desenvolvimento de uma falha cardíaca já foi estabelecida. Foi observado uma ativação constitutiva através da contração aórtica em modelos experimentais de camundongos e em um modelo de ratas hipertensas com dietas altas em quantidade de sal. Nos seres humanos, a p38 se encontra ativada no coração afetado por uma falha cardíaca secundária à doença coronária avançada. A regulação da ativação da p38 parece ser chave no desenvolvimento da patologia cardíaca, já que em vários grupos foi observado uma redução da atividade da p38 em estados terminais de falha cardíaca no miocárdio humano e de ratos. O emprego de inibidores de p38 MAPK, também se encontra descrito no estado da técnica, com a implicação da p38 MAPK em outras patologias diferentes de doenças cardíacas, tais como, doenças inflamatórias, pulmonares ou neuronais. Todas estas patologias se caracterizam por apresentar a p38 em sua forma ativa, quer dizer, com os restos Thr180 e Tyr182 fosforilados.

Por outro lado, se observou em pacientes com câncer, que tanto a quimioterapia como a radioterapia produzem uma ativação da p38 que parece ser a responsável pelo sinal que induz a morte das células tumorais.

5 A estratégia mais estendida no tratamento das diferentes doenças caracterizadas pela presença de p38 ativa, consiste na inibição farmacológica de sua atividade ou na inibição de sua ativação, como se menciona nos documentos de patentes WO 2005/032551, WO 2004/021988, EP1534282 ou CA
10 2497448, em combinação com outros agentes terapêuticos.

GRKs

Os receptores acoplados a proteínas G (GPCR) mediam as ações de diversos mensageiros que desempenham um papel essencial na função do sistema cardiovascular ou do sistema
15 imune. Além de interagir com as proteínas G heterotriméricas, os GPCR ativados interagem com cinases de receptores acoplados a proteínas G (GRKs) e com as proteínas moduladoras denominadas arrestinas. Baseados em similares estruturais, os sete membros da família de GRKs (GRK1-7)
20 foram classificados em quatro subfamílias, GRK1, GRK2/3, GRK4/5/6 e GRK7, onde GRK2/3 e GRK5/6 apresentam uma distribuição ubíqua no organismo. Contudo, não se conhece o mecanismo que altera a sinalização por GPCRs e contribui para o desencadeamento e/ou progressão destas patologias.

25 Estas proteínas desempenham um papel chave na rápida modulação da funcionalidade e na dinâmica intracelular de receptores, através da ativação por ligandos, além de permitirem o recrutamento e regulação de outras proteínas

celulares, iniciando novas vias de sinalização, pelo que são tanto moduladoras como componentes essenciais da transdução de sinais mediada por GPCR. Os níveis e funcionalidades de algumas GRKs estão alterados em situações patológicas, tais como, a falha cardíaca congestiva, a hipertrofia cardíaca, a hipertensão ou procesos inflamatórios, tais como, a artrite reumatóide.

Por outro lado, se conhece o importante papel que as SAPKs representam no desenvolvimento de cardiomiopatias e falha cardíaca e que, a ativação seletiva de GPCRs promove a ativação crônica dessas cinases em músculo cardíaco, sendo este um passo essencial no desenvolvimento da falha cardíaca, a partir de uma hipertrofia ventricular.

Breve Descrição das Figuras

15 A **Figura 1** mostra que a GRK2 fosforila diretamente a p38 *in vitro*.

A Figura **1A** mostra que a p38 se fosforila por meio da GRK2. A incubação da GRK2 recombinante purificada foi feita pelo sistema de Baculovirus (50 nM), com 50 nM de p38 recombinante (GST-p38) no tampão de fosforilação de p38 (Hepes 25 mM, pH 7,5, acetato de magnésio 10 mM, ATP 50 μ M, [20 γ -³²P]ATP 2000-3000 cpm/pmol) em um volume final de 40 μ L durante 30 minutos, à temperatura de 30°C, sem ou com heparina (50 ng/ μ L), com o objetivo de se inibir a atividade de GRK2. Os controles de autofosforilação das cinases se efetivaram nas mesmas condições. A reação foi interrompida através da adição de tampão de carga-SDS, depois, se separaram as proteínas em um gel de poliacrilamida-SDS a 8% e

se revelaram por auto-radiografia.

A Figura **1B** mostra que a GRK2 fosforila diretamente a p38 e não promove sua autofosforilação. As reações de fosforilação se efetivaram como foi indicado com relação à Figura 1A. Os compostos de heparina e SB203580, inibidores de GRK2 e de p38, respectivamente, se utilizaram em concentrações de dez vezes IC_{50} , para assegurar a completa inibição de caminhos de cinases, isto é, numa concentração de 1,5 μ M para a heparina e de 0,5 μ M para o composto SB203580. Os substratos empregados foram MBP (14 μ g por ponto) para a p38 e caseína (7,5 μ g por ponto). A reação foi interrompida por meio da adição de tampão de carga-SDS, depois, se separaram as proteínas em um gel de poliacrilamida-SDS a 10% e se revelaram por auto-radiografia.

A Figura **1C** mostra que a GRK2 não fosforila a p38 em seu segmento de ativação. As reações de fosforilação foram iniciadas na ausência de ATP radiativo, nas condições anteriormente descritas. Foram empregados 40 ng de MKK6_{CAM} (MKK6/MKK3, Upstate) para fosforilar a GST-p38 *in vitro*. Os anticorpos utilizados para, ou revelados através da separação electoforética reconhecem, no caso das proteínas superiores, a GRK2 e GST-p38 (Anticorpo anti-PF2, soro policlonal, gerado no laboratório dos inventores, com anticorpos contra a proteína de fusão GST-PF2, onde PF2 é um fragmento C-terminal de GRK2). O anticorpo fosfoespecífico de T180/Y182 utilizado para revelar o estado de ativação da p38 é da Cell Signaling.

A Figura **1D** mostra a dependência temporal da fosforilação da p38 por GRK2. a fosforilação se deixou

transcorrer nas mesmas condições descritas anteriormente, exceto com relação ao tempo de incubação, que, como está indicado, variou de 0 a 90 minutos. Através de setas, é mostrada a mobilidade de ambas as proteínas (GRK2 79,6 kDa; 5 GST-p38 68 kDa). À direita são representados os dados obtidos através da quantificação por Cerenkov das bandas separadas dos géis.

Na Figura **1E** se apresentam os parâmetros cinéticos da fosforilação. Diante dos dados do separado D, se tomaram 10 15 minutos da reação como período de tempo para determinar as constantes cinéticas da fosforilação em condições de velocidade inicial. As reações de fosforilação se efetivaram como já foi descrito, deixando a concentração de GRK2 fixa (25 nM) e variando a concentração de p38 de 12,5 a 400 nM. A 15 reação foi interrompida por adição de tampão de carga-SDS, se separaram as proteínas em um gel de poliacrilamida-SDS a 8%, se revelaram por auto-radiografia e se quantificaram por Cerenkov. O gráfico foi feito com o programa Kaleidagraph, dotado de um algoritmo capaz de deduzir os parâmetros 20 cinéticos: constante de Michaelis-Menten ($K_m = 79,56 \text{ nM}$) e velocidade máxima ($V_{max} = 0,9 \text{ nmol de } PO_4^{3-} \text{ incorporado por mg GRK2}^{-1}\text{minuto}^{-1}$).

A **Figura 2** mostra que GRK2 e p38 se associam de forma dependente da estimulação do receptor β_2 -adrenérgico 25 (β_2 -AR).

Na **Figura 2A**: células HEK 293 foram transfectadas transitoriamente com os vetores pCDNA3-GRK2, pBC12BI- β_2 -AR e pCDNA3-Flag-p38 α (1 μg de cada ADN por p60). Após 48 horas da

transfecção, e após uma abstinência em um meio sem soro por 2 horas, as células foram estimuladas com o agonista adrenérgico isoproterenol (ISO, 10 μ M) durante 5 ou 10 minutos ou não foram estimuladas (0 min ISO). Deste modo, as células sem o receptor β_2 -AR sobreexpresso foram estimuladas com NaCl 0,5 M durante 15 minutos. As células foram solubilizadas em um tampão adequado para a imunoprecipitação com o anticorpo M2 anti-Flag unido à agarose e após tomar alíquotas destes lisados (10 %) para controle de sobreexpressão (quadros de lisados), se incubaram os complexos imunes durante toda a noite à temperatura de 4°C. As proteínas imunoprecipitadas (anti-Flag IP) foram novamente suspensas em um tampão de ruptura de eletroforese e as proteínas unidas foram decompostas em um gel de poliacrilamida-SDS a 10%. Após a eletro-transferência, as proteínas foram detectadas com anti-p38 e com o anticorpo contra GRK2, anti-PF2 (quadro superior e inferior, respectivamente). Na Figura, se incluem ainda os controles negativos de imunoprecipitação (Cneg), na ausência de Flag-p38 α e de estimulação com 10 μ M de isoproterenol. Nos quadros de lisados foram detectados, acima, GRK2 e, abaixo, o estado de ativação de p38 mediante o anticorpo anti-fosfo-p38 (ver Tabela I).

Figura 2B: em aproximações idênticas às descritas em 2A, se imunoprecipitaram as proteínas sobreexpressas com o anticorpo contra GRK2, anti-PF2, e se revelou com anti-p38 a co-imunoprecipitação desta em cada ponto de estimulação (0 e 5 minutos de isoproterenol, quadro superior esquerdo). Nos

quadros adjacentes se apresentam os controles de expressão de Flag-p38 (acima) e de GRK2 (abaixo) e a GRK2 total imunoprecipitada (quadro inferior esquerdo). De novo, se detecta a associação entre ambas as proteínas, estimulada aos 5 minutos de exposição com 10 μ M de isoproterenol.

Figura 2C: Desta vez, se introduziram nas células HEK293, somente os vetores que codificavam β_2 -AR e Flag-p38 α , com o objetivo de assegurar que a GRK2 endógena era co-imunoprecipitada com uma quantidade total menor de p38 (0,5 μ g de ADN). A associação máxima entre Flag-p38 α e GRK2 se produz aos 5 minutos de tratamento com isoproterenol 10 μ M (ver quadros superior e inferior da esquerda). Os quadros da direita confirmam a expressão de GRK2 (acima, anti-PF2) e de p38 (abaixo, anti-p38) nos lisados celulares.

Figura 2D: em experimentos idênticos aos descritos no detalhe separado A, foi posto à prova a capacidade do mutante cataliticamente inativo GRK2-K220R, de co-imunoprecipitar-se com Flag-p38. Os dois quadros superiores mostram, respectivamente, a co-imunoprecipitação das duas isoformas de GRK2 e a p38 imunoprecipitada totalmente. Os dois quadros de lisados atestam a sobreexpressão de GRK2 e GRK2-K220R (acima, anti-PF2), assim como, o estado de ativação de Flag-p38 em cada ponto (abaixo, anti-fosfo-p38). Conforme foi descrito em A, se efetivaram controles de imunoprecipitação inespecífica (Cneg), do anticorpo M2, anti-Flag-agarose.

Na **Figura 3** pode ser observado como GRK2 é capaz de atenuar a ativação de p38 por MKK6_{CAM}.

Figura 3A: se transfectaram transitoriamente células HEK 293, espalhadas normalmente em placas de múltiplos poços de 6 ou de 12 poços (M6 ou M12), com pCDNA3-Flag-p38 α , pCDNA3-MKK6_{CAM}, e com quantidades crescentes do
 5 vetor pCDNA3-GRK2. Neste experimento, se empregaram placas M6 e as quantidades de ADN introduzidas foram: 100 ng de Flag-p38, 100 ng de MKK6_{CAM}, e de 0 a 1 μ g de GRK2. Em todos os pontos se completou a quantidade total de ADN com pCEFL-EGFP e com pCDNA3 inativo, em substituição a pCDNA3-MKK6_{CAM}, no caso
 10 do controle (CTRL). Após 48 horas, as células foram colhidas e lisadas em um tampão M2. O quadro superior mostra a dose de GRK2 sobreexpressa. O estado de ativação da p38 foi avaliado com anti-fosfo-p38, da Cell Signaling, e após desprender os anticorpos da primeira imunodetecção, se revelou com anti-p38
 15 total, da mesma casa comercial. Observa-se que para evitar saturações pouco decompostas da revelação, se apresentam auto-radiografias muito levemente expostas.

Figura 3B: Duas culturas massivas de células EBNA 293, estavelmente transfectadas com pCDNA3-GRK2 e que,
 20 portanto, sobreexpresam dois níveis diferentes de GRK2, se transfectaram com Flag-p38 e MKK6_{CAM}. O procedimento foi feito conforme descrito anteriormente em A para determinar o estado de ativação de Flag-p38. Além disso, se assegurou a correta expressão de MKK6_{CAM} com o anticorpo anti-MKK6/SKK3, da
 25 Upstate Biotechnology.

Na **Figura 4**, os experimentos mostram que GRK2 reduz a atividade catalítica de p38.

Figura 4A: Se transfectaram transitoriamente

células HEK 293, espalhadas em p60, com 0,5 µg de pCDNA3-Flag-p38α, 0,5 µg de pCDNA3-MKK6_{CAM} (ou 0,5 µg de pCDNA3 inativo no controle, CTRL), e com 1 ou 2 µg do vetor pCDNA3-GRK2 (+), realizando cada ponto em duplicata. Os controles se
 5 efetivaram em paralelo, substituindo os µg de pCDNA3-GRK2 por pCEFL-EGFP (-). Se completou a quantidade total de ADN com pCDNA3 inativo. Após 48 horas, as células foram lisadas, se tomaram alíquotas de lisados e foi imunoprecipitado das mesmas Flag-p38. Os quadros indicados em A evidenciam a
 10 sobreexpressão de GRK2 (anti-PF2) e de MKK6_{CAM} (anti-MKK6), e a ativação de Flag-p38 (anti-fosfo-p38).

Figura 4B: Os imunoprecipitados foram lavados três vezes com 15 mL de tampão M2 e duas vezes com outros 15 mL de tampão de fosforilação, sem ATP (NaF 15 mM, Hepes 25 mM, pH
 15 7,5 e acetato de magnésio 10 mM). Na última lavagem, novamente foram suspensos os complexos imunes-agarose em 1 mL de tampão e se separou 10% de cada ponto (100 µL) para controlar a imunoprecipitação de Flag-p38 (quadro inserido no gráfico do detalhe separado B). Com Flag-p38
 20 imunoprecipitada, se efetivaram ensaios de cinase, utilizando como substrato o peptídeo APRTPGGRR (inicialmente proporcionado pela Calbiochem e posteriormente sintetizado pelo Serviço de Química de Proteínas do CBMSO). As reações se realizaram em um volume final de 25 µL, em um tampão de
 25 fosforilação composto de Hepes 25 mM, pH 7,5, acetato de magnésio 10 mM, NaF 15 mM, ATP 50 µM e [γ-³²P]ATP 500-1000 cpm/pmol e 2 mM do peptídeo substrato. Quando se especifica (+SB), se adicionou SB203580 à reação *in vitro*, numa

concentração final de 0,5 μ M. A fosforilação foi deixada transcorrer durante 30 minutos à temperatura de 30°C, após o que, se deteve, mediante adição de 15 μ l de TCA a 30%. As proteínas foram precipitadas por centrifugação (25 000 xg, 15 minutos, 4°C) e se recuperou, de cada reação, o sobrenadante que continha o peptídeo fosforilado. Recortes quadrados (1 cm x 1 cm) de papel Whatman P81 se impregnaram com o peptídeo em solução. Depois, foram deixados secar, foram lavados de forma abundante com ácido fosfórico 75 mM e se quantificou a radioatividade incorporada pelo peptídeo adsorvido por Cerenkov. Os níveis de atividade se referiram à fosforilação do peptídeo substrato por Flag-38, na ausência de MKK6_{CAM} (CTRL).

Na **Figura 5** se observa que a redução dos níveis de GRK2 permite uma maior ativação de p38 por MKK6_{CAM} *in situ*. **Figura 5A:** Foram transfectadas transitoriamente células HEK 293, espalhadas em placas M6 com 150 ng de pCDNA3-Flag-p38 α , 50 ng de pCDNA3-MKK6_{CAM}, e com quantidades crescentes do vetor pCEFL-GRK2, anti-sentido (AS): de 0,5 μ g - 2 μ g ou as mesmas quantidades de pCEFL-EGFP, como controle (C). Em todos os pontos se completou a quantidade total de ADN com o vetor pCEFL inativo. As células foram lisadas e se procedeu à imunodeteccção da quantidade total de GRK2 (quadro superior, anti-PF2), à ativação de p38 (quadro intermediário, anti-fosfo-p38), e p38 total (quadro inferior, anti-p38N) em cada ponto. No gráfico são reconhecidos os dados procedentes do ponto de 2 μ g (de GFP e Anti-sentido) de um experimento representativo. Os níveis de ativação de p38 em cada uma das

duas condições se referem a seus respectivos controles, sem MKK6_{CAM}.

Figura 5B: a ativação basal de p38 está modulada pela quantidade de GRK2. Placas M6 de células HEK 293 foram transfectadas transitoriamente com 100 ng de pCDNA3-Flag-p38 α , e com 0,5 μ g - 2 μ g de pCEFL-GRK2 anti-sentido ou de pCEFL-EGFP. A quantidade total de ADN foi completada em cada ponto com pCEFL. Em seguida, se avaliou nestas condições, por meio de eletro-transferência e imunodeteção, a quantidade total de GRK2 (anti-PF2, quadro superior), o estado de ativação de p38 (quadro intermediário, anti-fosfo-p38, autoradiografia sobreexposta durante a revelação quimioluminescente), e p38 total (quadro inferior, anti-p38). No gráfico da parte inferior da Figura, foram compiladas as médias ($\pm$ SEM) de dados procedentes de três experimentos independentes, em duplicata. Para determinar a significância, se aplicou o estatístico do Teste t de Student bilateral, com $*p < 0,005$.

A **Figura 6** demonstra que somente a p38, com seus determinantes estruturais inteiros, é substrato de GRK2.

Figura 6A: a partir de bactérias transformadas com os plasmídeos pGEX2T- p38 α , pGEX4T-Mxi2 e pGEX4T-Mxi2 Δ 17, se purificaram as proteínas de fusão com GST (retângulo preto nos esquemas das proteínas): p38 α , Mxi2 e Mxi2 Δ 17. As isoformas Mxi2 foram utilizadas na maneira de mutantes truncados no terminal-C, para idealizar demarcar o sítio de fosforilação de GRK2. A GRK2 recombinante foi incubada (200 nM) com 0,5 μ g de cada uma das proteínas de fusão, em um

tampão de fosforilação (Hepes 25 mM, pH 7,5, acetato de magnésio 10 mM, ATP 50 μ M, [γ - ^{32} P]ATP 2000-3000 cpm/pmol), durante 30 minutos à temperatura de 30°C. A heparina foi incluída (150 nM) como inibidor específico de GRK2. As reações foram interrompidas mediante adição de um tampão de ruptura com SDS. As amostras foram decompostas SDS-PAGE 8%. Com o objetivo de garantir a inclusão de quantidades idênticas de proteína, primeiro, as mesmas foram visualizadas no gel por tingimento com Azul de Coomassie (CBB). Em continuação, o gel foi seco e foi detectada a radioatividade incorporada às proteínas (^{32} P).

Figura 6B: a proteína truncada GST-280-360p38 foi gerada, correspondente aos 80 últimos aminoácidos de p38 α , mediante o sistema de Gateway da Invitrogen. Ensaio de fosforilação foram feitos com Mxi2 Δ 17, como terminal-N de p38, 280-360 p38 como terminal-C e com p38 α inteira nas mesmas condições indicadas no detalhe separado A. A fosforilação foi detectada por auto-radiografia (^{32} P) e, concomitantemente, foram feitos controles por meio de Western blot, com o anticorpo anti-GST, da quantidade de proteína utilizada nos ensaios. Claramente se observa a presença da proteína GST-280-360p38, que não resulta fosforilada, STD, com migração de proteínas padrões de peso molecular.

A **Figura 7** mostra que a GRK2 fosforila a p38 em um único resíduo.

Figura 7A: através de eletroforese bidimensional foi analisada a fosforilação de p38 por GRK2 e se deixou transcorrer nas mesmas condições descritas anteriormente. A

reação foi interrompida por adição de um tampão de carga para isoeleto-enfoque. A primeira dimensão eletroforética tinha um gradiente de anfólitos de pH 3 a 10. A segunda dimensão foi decomposta mediante um gel de poliacrilamida a 8%. É mostrado
5 por meio de setas a mobilidade de ambas as proteínas (GRK2 79,6 kDa; GST-p38 68 kDa).

Figura 7B: amostras procedentes de um ensaio de fosforilação não radioativo foram corridas em um gel destinado à seqüenciação proteômica. O gel foi retirado para
10 visualizar as bandas, e a correspondente à GST-p38 foi separada do gel e submetida à digestão triptica. Os peptídeos resultantes foram analisados por MALDI-TOF. É apresentada a ampliação da zona do espectro de massa obtida, onde se detectou o peptídeo fosforilado (massa correspondente a
15 1.954.330), apenas presente na amostra procedente da fosforilação por GRK2.

A **Figura 8** demonstra que GRK2 fosforila a p38 em um único resíduo. Com os dados obtidos em MALDI-TOF (modelo Autoflex, da Broker), se chegou à identificação de um
20 peptídeo triptico, candidato de portar a fosforilação: LTDDHVQFLIYQILR. Para corroborar estes indícios, a amostra foi decomposta por HPLC-ESI-IT (modelo Deca-XP, da Thermo-Finnigan), trabalhando em modo SIM (monitorização de ions isolados), de maneira que o analizador apenas irá fragmentar
25 o peptídeo candidato. Às massas peptídicas reconhecíveis, foi atribuída a sua série (denominada b_n ou y''_n , em função do transcurso da fragmentação). No espectro inferior, procedente da amostra fosforilada, se encontra uma massa correspondente

à série Δb_8 (no disco laranja) indicativa da fosforilação na treonina presente no peptídeo analisado. Dessa forma, se identificou a massa total do peptídeo (dentro do quadro oval amarelo) em ambos os casos. Na janela em miniatura inserida na parte direita da Figura, se recolhe a informação sobre a eluição diferencial, da coluna de HPLC, do mesmo peptídeo procedente da amostra fosforilada e com controle. Dado a sua maior característica hidrofílica, o peptídeo fosforilado elui alguns décimos de segundo antes.

A **Figura 9** mostra que os mutantes de p38 T123A e T123D não são fosforilados por GRK2 *in vitro*.

Figura 9A: os mutantes foram confeccionados mediante mutagênese dirigida às proteínas p38T123A e p38T123D, fundidas com GST, nos plasmídeos de expressão procariótica pGEX2T. Foi ensaiado nas condições já descritas de fosforilação, a capacidade das proteínas recombinantes GST-p38T123A e GST-p38T123D de serem substratos de GRK2, em comparação com a proteína silvestre GST-p38WT e com as concentrações finais indicadas na Figura. Os quadros superiores são representativos da fosforilação obtida (^{32}P) e os quadros inferiores mostram, por WB anti-p38N, a quantidade de proteína recombinante utilizada nos ensaios.

Figura 9B: mostra o esquema representativo de p38 α , onde se ressaltam características funcionais, como a extensão de domínio cinase, a localização dentro do mesmo do segmento de ativação TGY e da sequência LTDD hipoteticamente regulada por GRK2. Se destaca também o motivo CD, inicialmente contido em invólucro, na regulação da associação de substratos e

ativadores.

A **Figura 10** demonstra que a treonina 123 é um resíduo altamente conservado, ubicado na superfície exterior do sulco de rotulamento com ativadores e substratos de p38. Os alinhamentos múltiplos que se apresentam foram confeccionados através do programa ClustalX (<http://www-igbmc.u-strasbg.fr/BioInfo/ClustalX/>), pelo Dr. Perdiguero. Os guias introduzem descontinuidades (*gaps*) para ajustar o alinhamento. Com letra roxa sobre fundo amarelo, se ressaltam os resíduos idênticos entre todas as isoformas, com fundo azul e fundo verde se indicam as substituições conservativas, conforme sua maior ou menor distribuição, respectivamente, entre as proteínas alinhadas. Sobre fundo branco, se deixam os aminoácidos não conservados. Na base de cada alinhamento múltiplo se indica o consenso (*consensus*) e mediante elipses roxas se destaca a zona da treonina 123, sinalizada, além disso, na comparação de seqüências da parte inferior com uma seta.

A **Figura 11** revela que o mutante p38T123D não é ativável por MKK6_{CAM} e carece de atividade de cinase sobre ATF2 *in vitro*.

Figura 11A: Foram realizados ensaios de fosforilação (Hepes 25 mM, pH 7,5, acetato de magnésio 10 mM, NaF 15 mM, 50 µM ATP e [γ -³²P]ATP 1000-2000 cpm/pmol), *in vitro*, com as proteínas de fusão GST-p38WT, GST-p38T123A e GST-p38T123D (150 nM) como substratos de fosforilação de MKK6_{CAM} (40 ng) recombinante (Upstate Biotechnology). As reações foram deixadas transcorrer à temperatura de 30°C

durante 30 minutos e se separaram as proteínas em géis SDS-PAGE a 8%. Foi visualizada através de tingimento com Azul de Coomassie a quantidade de p38 em cada ponto. Na continuação, se determinou a radioatividade incorporada em cada isoforma de p38. A auto-radiografia (^{32}P) mostra um experimento representativo de três ensaios independentes, efetivados em duplicata.

Figura 11B: Nestes mesmos ensaios, se avaliou também a capacidade de GST-p38WT, GST-p38T123A e GST-p38T123D ativadas por MKK6_{CAM} de fosforilar 2 µg de GST-ATF2. A auto-radiografia representativa (^{32}P) do controle de GST-ATF2 total é acompanhada (Azul de Coomassie).

A **Figura 12** mostra que a treonina 123 de p38 é necessária para sua correta atividade catalítica sobre o substrato MEF2A.

Figura 12A: Foram feitas fosforilações *in vitro* com as proteínas de fusão indicadas na Figura, na presença (+) ou ausência (-) de MKK6_{CAM} (40 ng) recombinante e 2 µg de GST-MEF2A. O ensaio foi deixado transcorrer durante 30 minutos. As proteínas foram separadas em SDS-PAGE a 8%, tingidas com CBB e foi revelada a radioatividade incorporada (^{32}P). São apresentados quadros de um experimento representativo dos três ensaios realizados independentemente.

Figura 12B. Foi avaliada a atividade basal das três proteínas de fusão de p38, na ausência do ativador MKK6_{CAM}, nas já descritas condições. É apresentada uma auto-radiografia representativa, após ampla exposição.

A **Figura 13** mostra que o mutante de p38 T123D se

ativa menos que a p38 silvestre por MKK6_{CAM}, *in situ*. Nos experimentos de sobreexpressão análogos aos descritos anteriormente, foram transfectadas células HEK293, espalhadas em M6 e sempre em duplicata, com: 150 ng de pCDNA3-Flag-p38α WT, ou pCDNA3-Flag-p38α T123D e 50 ng de pCDNA3-MKK6_{CAM}, (o pCDNA3 inativo). Foi avaliada a ativação das p38 com o anticorpo anti-fosfo-p38. Para cada uma das duas isoformas foi referida a ativação por MKK6_{CAM} à situação basal, obtendo-se um determinado nível de ativação. Foi estabelecido 100% de ativação, como a ativação de p38α WT em cada experimento. Foram mostrados dados ($\pm$ SEM) de três experimentos independentes. Foi realizada o Teste T de Student, bilateral, e se obteve: * $p < 0,0001$. Os quadros da direita (Western blot) são ilustrativos de um dos experimentos.

A **Figura 14** mostra que o mutante T123D da p38 não se une aos substratos e não se associa com, ou não é fosforilado por, MKK6. A GST-p38 purificada e seus mutantes T123 (300 nM) foram incubados na presença de MKK6 purificada (3 nM) ou com uma cola de histidinas MAPKAPK2 (MK2, 20 nM) em um ensaio de precipitação (pull down) com GST como controle negativo. As proteínas sedimentadas foram reveladas mediante um ensaio de Western blot, utilizando anticorpos anti-MKK6, anti-histidina (para His-MK2) ou anti-GST (para quantidades totais de GST-p38s). Em todos os quadros, os resultados são representativos de 3 experimentos independentes realizados em duplicata.

A **Figura 15** mostra como a GRK2 reduz a diferenciação de fibroblastos a adipócitos, de modo

dependente de p38. Foram confeccionadas linhas 3T3L1 estavelmente transfectadas com pCDNA3-GRK2 e pCDNA3-GRK2K220R. São incluídos controles de expressão de GRK2 (anti-GRK2), obtidos nas linhas celulares, em comparação aos níveis em 3T3L1. As células foram submetidas ao tratamento padrão de diferenciação e no dia 15 do tratamento, as células foram fixadas com formol e tingidas com Oil Red, corante lipofílico que se une às gorduras acumuladas pelos adipócitos. As células com fenótipo adipocítico (em roxo), foram contabilizadas em microscópio, em um total de 25 campos. São mostradas fotografias representativas de dois experimentos independentes, em duplicata. Assim, se inclui uma foto das células 3T3L1, isentas da estimulação com insulina durante o processo de diferenciação (controle). No gráfico, se reflete o recanto de adipócitos ($\pm$ SEM) nestes experimentos. Foi feito o Teste T de Student, bilateral, para cada linha estável, com relação às células 3T3L1 e se obteve $*p < 0,0001$. Em paralelo, foram efetuados controles da dependência de p38, mediante tratamento farmacológico com SB203580 10 μ M.

A **Figura 16** representa o reconhecimento pelo anticorpo anti-fosfo-Thr123 da p38 imunoprecipitada, a partir de cultura de células humanas e a fosforilação da p38 por GRK2, *in vitro*.

Figura 16A: As células HEK293 foram transfectadas com vetores de expressão para Flag-p38alfa de camundongo e GRK2 ou sua mutante inativa (GRK2-K220R). As células foram cultivadas durante 16 horas sem soro, antes da lise. Foi

imunoprecipitado (IPP) flag-p38 mediante um anticorpo anti-flag (M2) e, após eletroforese e transferência, foi detectada a proteína fosforilada na Thr123 através do ensaio de Western Blot (WB), com um anticorpo específico purificado em colunas de afinidade (P-p38-T123, diluição 1:200). Foi revelada a mesma membrana com anti-p38 total (p38) e outra membrana correspondente às proteínas contidas nos extratos celulares antes da imunoprecipitação (Lisados), com um anti-GRK2 436-689 (GRK2).

Figura 16B: Foi apenas incubada GST-p38 (50 nM), com GRK2 purificada (150 nM) ou com 40 ng de MKK6_{CAM} constitutivamente ativa em um tampão de fosforilação, na presença de ATP não marcado radiativamente, durante 30 minutos, a uma temperatura de 30°C. O quadro superior foi mostrado com um anticorpo policlonal frente à Thr123 de p38, na forma fosforilada. O quadro intermediário mostra a incubação com o anticorpo fosfoespecífico dos restos Thr180/Tyr182 de p38 (Anti-Pp38) e na revelação inferior se utilizou um anticorpo contra p38 total.

A **Figura 17** mostra que um anticorpo anti-fosfo reconhece a p38 fosforilada por GRK2 na treonina 123, já que o mutante T123A de p38 não é reconhecido nessas condições. GST-p38wt e GST-p38T123A (70 nM) foram incubadas individualmente, com GRK2 purificada (25 nM) ou com MKK6_{CAM} reombinante (2 ng). Foi adicionada heparina (100 ng/ μ L), um inibidor específico de GRK2, onde indicado. A fosforilação das proteínas GSTp38 foi analisada por meio de um ensaio Western blot com um anticorpo anti-fosfo-T123 e o GST-p38

total com o anticorpo anti-GST. Os dados são representativos de 3 experimentos independentes.

A **Figura 18** mostra os níveis de ativação da p38 e de secreção de TNF, em resposta ao lipolissacarídeo de macrófagos, extraído de ratos parcialmente deficientes em GRK2. Foram isolados macrófagos peritoneais procedentes de ratos C57BL/6 silvestrês (+/+) ou hemizigotos para GRK2 (+/-). Depois de submetê-los à ausência de estimulação durante 2 horas, se adicionou ao meio de cultura o lipopolissacarídeo bacteriano (LPS: 0,5 µg/mL) durante 16 horas. Foi quantificada a produção de citocinas inflamatórias (TNFα), mediante um kit comercial de ELISA (Bioutrak, da Amersham). Para confirmar a dependência deste processo da atividade p38, se utilizou SB203580 (30 µM), 30 minutos antes de se adicionar LPS. São mostradas as médias $\pm$ SD de 10 ratos processados em 4 experimentos independentes. Os dados correspondem à secreção de TNFα, derivada de 106 células por poço de M24. *; $p < 0,005$ (conforme O Teste T de Student).

Descrição Detalhada da Invenção

Em um aspecto, a invenção se correlaciona com uma proteína MAPK, a qual, em certas ocasiões, é identificada nesta descrição como "proteína MAPK da invenção", selecionada entre:

a) uma proteína MAPK que compreende um resto fosforilado em um sítio de fosforilação diferente do sítio ou sítios de fosforilação presentes no segmento de ativação da dita proteína MAPK, ou um fragmento da dita proteína que compreende o dito resto fosforilado, onde:

- dito sítio de fosforilação diferente é o resto de treonina na posição 123 (Thr123) da p38, isoforma α , de camundongo, ou um resto de um aminoácido suscetível de fosforilação posicionalmente eqüivalente em outra proteína MAPK, tal como se define por alinhamento múltiplo de seqüências de aminoácidos, e
 - a fosforilação no dito sítio de fosforilação diferente, impede a ativação da dita proteína MAPK e também sua atividade com relação a seus substratos; e
- b) uma proteína MAPK que compreende uma carga negativa ou um resto volumoso em um sítio de fosforilação, ou na área que envolve o dito sítio de fosforilação, que é diferente do sítio ou sítios de fosforilação presentes no segmento de ativação da dita proteína MAPK, ou um fragmento da dita proteína que compreende o dito resto fosforilado, onde:
- o dito sítio de fosforilação diferente é o resto de treonina na posição 123 (Thr123) da p38, isoforma α , de camundongo, ou um resto de um aminoácido suscetível de fosforilação posicionalmente eqüivalente em outra proteína MAPK, tal como se define por alinhamento múltiplo de seqüências de aminoácidos, e
 - a introdução da dita carga negativa ou do dito resto volumoso no dito sítio de fosforilação, ou na área que envolve o dito sítio de fosforilação, impede a ativação da dita proteína MAPK e também sua atividade com relação a seus substratos.

Conforme aqui usado, o termo "posicionalmente
equivalente" se refere à posição de um aminoácido de uma
proteína MAPK que, por alinhamento múltiplo de seqüências de
aminoácidos de proteínas MAPK, corresponde à Thr123 de p38,
5 isoforma α , de camundongo.

O termo "proteína MAPK" inclui as proteínas cinases
ERK, JNK e p38, assim como, suas respectivas isoformas, de
qualquer espécie. Informações sobre as ditas cinases e suas
funções, assim como, sobre seus efeitos celulares, podem ser
10 encontradas na revisão efetuada por Pearson e outros [Pearson
G., et al., 2001, "*Mitogen-activated protein (MAP) kinase
pathways: Regulation and Physiological Functions*", *Endocrine
Reviews* 22(2):153-183]. Informações sobre as seqüências de
aminoácidos das ditas proteínas MAPK podem ser encontradas em
15 bases de dados apropriadas, conhecidas pelos especialistas
versados na técnica (por exemplo, Swissprot, NCBI, etc). As
cinases MAPK se encontram amplamente distribuídas entre as
diferentes espécies e sua estrutura principal está amplamente
conservada entre os diferentes membros das diferentes
20 famílias (ERK, JNK e p38).

As proteínas MAPK se caracterizam, entre outras
coisas, pela existência de um segmento de ativação que
compreende pelo menos um resto suscetível de ser fosforilado
pela cinase apropriada.

25 Em uma realização em particular da invenção, o dito
segmento de ativação compreende a tríade de aminoácidos de
fórmula (I):



onde:

- Thr é treonina,
- Tyr é tirosina, e
- Xaa é o resto de um aminoácido.

5 Numa realização em particular, Xaa é o resto de um aminoácido selecionado dentre ácido aspártico, ácido glutâmico, glutamina, glicina e prolina.

No caso particular da p38 de mamífero, isoforma α , o segmento de ativação compreende a tríade de aminoácidos de fórmula (I) nas posições 180-182 de sua sequência de aminoácidos.

Em outra realização em particular, o dito segmento de ativação compreende a tríade de aminoácidos de fórmula (II):

15 Ser-Glu-Gly (II)

Onde:

- Ser é serina,
- Glu é ácido glutâmico, e
- Gly é glicina.

20 Numa realização da presente invenção, a proteína
MAPK da invenção se seleciona dentre as cinases ERK, JNK e
p38. De modo ilustrativo, em uma realização em particular, a
dita proteína MAPK da invenção é uma p38. A cinase p38 se
encontra amplamente distribuída entre as diferentes espécies
25 e sua estrutura principal está amplamente conservada (Figura
10). Em uma realização em particular, a dita p38 é uma p38,
em quaisquer de suas isoformas (α , β , γ , ou δ), de mamífero,
por exemplo, de ser humano, roedor, etc. Em uma realização

concreta, a dita p38 é a isoforma α da p38 de camundongo (*Mus musculus*), cuja seqüência de aminoácidos se mostra na SEQ ID NO: 1 (GenBank, número de Acesso P47811).

Os presentes inventores encontraram, de forma
5 surpreendente, que a fosforilação de uma proteína MAPK em um sítio suscetível de fosforilação diferente do sítio ou sítios de fosforilação presentes no segmento de ativação da dita proteína MAPK, é capaz de inibir a ativação da dita proteína MAPK, ativação esta, como conhecido, transcorre através da
10 fosforilação dos restos suscetíveis de fosforilação (por exemplo, treonina ou tirosina) presentes no dito segmento de ativação, por exemplo, concretamente, na dita tríade de aminoácidos que se fez referência anteriormente.

De fato, os estudos realizados pelos presentes
15 inventores demonstraram que a fosforilação de um resto de treonina na posição 123 (Thr123) da p38 de camundongo, isoforma α , impede a fosforilação dos restos de treonina e tirosina presentes nas posições 180 e 182, respectivamente, da tríade de aminoácidos de fórmula (I), presente no segmento
20 de ativação da dita p38. Como consequência disto, a p38 não pode ser ativada e, portanto, não pode desempenhar sua função na cascata de transdução de sinais, o que pode resultar de especial utilidade no tratamento daquelas doenças onde está implicada a ativação da dita MAPK na cascata de sinalização
25 celular.

O especialista versado na técnica entenderá que não apenas a fosforilação no dito novo sítio de fosforilação, como também a introdução de uma carga negativa ou de um resto

volumoso no dito novo sítio de fosforilação, ou na área que envolve o dito sítio, pode também provocar o efeito de impedir a ativação de uma proteína MAPK e sua atividade com relação a seus substratos.

5 Portanto, a invenção ensina a existência de um novo sítio de fosforilação presente em uma proteína MAPK, onde o dito sítio de fosforilação é diferente do sítio ou sítios de fosforilação presentes no segmento de ativação da dita proteína MAPK, tal como, a Thr123 da p38, isoforma α , de
10 camundongo, ou, então, um resto de um aminoácido suscetível de fosforilação posicionalmente eqüivalente em outra proteína MAPK, tal como se define por alinhamento múltiplo de seqüências de aminoácidos, e, além disso, apresenta uma particularidade de que, uma vez fosforilado, é capaz de
15 inibir a ativação da dita proteína MAPK.

A localização concreta do dito sítio de fosforilação diferente pode variar, dependendo da proteína MAPK em questão (ERK, JNK o p38), da isoforma e da espécie do animal, embora não varie sua função de impedir a ativação da
20 proteína MAPK em questão, após a sua fosforilação (ou após a introdução de uma carga negativa ou de um resto volumoso no dito sítio de fosforilação ou na área que envolve o dito sítio), nem sua correspondência ou equivalência posicional. As proteínas MAPK que contêm o dito sítio de fosforilação com
25 as características de posição e funcionalidade mencionadas anteriormente são incluídas dentro do âmbito da presente invenção. Portanto, a proteína MAPK da invenção, não apenas inclui a proteína p38, isoforma α , de camundongo, fosforilada

na Thr123, como suas proteínas ortólogas, quer dizer, proteínas que procedem de um gene ancestral comum, que desempenham a mesma função nas diferentes espécies, assim como, suas isoformas e as outras cinases (ERK e JNK) incluídas dentro do grupo das proteínas MAPK, independentemente de qual sítio de fosforilação se encontra na dita localização (Thr123) ou em outra posição diferente, e o aminoácido fosforilado seja um aminoácido diferente da treonina.

10 Adicionalmente, a proteína MAPK da invenção também inclui uma proteína MAPK modificada, a qual tem uma carga negativa ou um resto volumoso no novo sítio de fosforilação ou na área que envolve o dito sítio, por exemplo, uma proteína p38 de camundongo, isoforma α , que contém uma carga
15 negativa ou um resto volumoso na Thr123, ou na área que envolve o dito sítio e, também, suas proteínas ortólogas, assim como, suas isoformas e as outras cinases (ERK e JNK) incluídas no grupo de proteínas MAPK, independentemente se a carga negativa ou o resto volumoso estiver na dita
20 localização (Thr123) ou em outra posição diferente e se o aminoácido modificado for um aminoácido diferente da treonina. Exemplos ilustrativos, não-limitativos, de cargas negativas que podem ser introduzidas no novo sítio de fosforilação, ou na área que envolve o dito sítio, conforme a
25 invenção, serão evidentes para um especialista versado na técnica, por exemplo, qualquer molécula ou composto capaz de proporcionar uma carga negativa, por exemplo, um peptídeo que leva um grupo fosfato, sendo o dito peptídeo capaz de se unir

ao dito sítio de fosforilação, ou à área que o envolve, e imitar o efeito da fosforilação no dito sítio. Exemplos ilustrativos, não-limitativos, de restos volumosos que podem ser introduzidos no novo sítio de fosforilação, ou na área

5 que envolve o dito sítio, conforme a invenção, serão evidentes para um especialista versado na técnica, por exemplo, qualquer molécula, por exemplo, um peptídeo ou um composto de baixo peso molecular, capaz de se unir ao dito sítio de fosforilação, ou à área que o envolve, e imitar o

10 efeito da fosforilação nesse sítio; embora os inventores não desejem estar vinculados por nenhuma teoria, se acredita que o dito resíduo volumoso pode ocasionar uma troca de conformação na proteína MAPK, o que impede a ativação da dita proteína MAPK e também sua atividade com relação a seus

15 substratos. Tal como aqui se utiliza, a expressão "na área que envolve o (novo) sítio de fosforilação" significa uma região em volta do sítio de fosforilação, na qual uma modificação introduzida nela por meio de uma carga negativa ou de um resto volumoso impede a ativação da dita proteína

20 MAPK e também sua atividade com relação a seus substratos. Ensaios adequados para determinar o efeito de impedir ou inibir a ativação de uma proteína MAPK e sua atividade com relação a seus substratos podem ser encontrados no Exemplo que acompanha a presente descrição; em consequência, a dita

25 informação pode ser utilizada pelo especialista versado na técnica para identificar a dita "área que envolve o sítio de fosforilação".

Em uma outra realização em particular da invenção, a proteína MAPK da invenção é um fragmento de uma proteína MAPK que compreende um resto fosforilado em um sítio de fosforilação diferente do sítio ou sítios de fosforilação presentes no segmento de ativação da dita proteína MAPK, onde, como já mencionado anteriormente, o dito sítio de fosforilação diferente é a Thr123 da p38, isoforma α , de camundongo, ou um resto de um aminoácido suscetível de fosforilação posicionalmente equivalente em outra proteína MAPK, tal como se define por alinhamento múltiplo de seqüências de aminoácidos, e a fosforilação no dito sítio de fosforilação diferente impede a ativação da dita proteína MAPK.

A extensão do dito fragmento pode variar dentro de um amplo intervalo, por exemplo, entre 3 e 30 restos de aminoácidos, tipicamente, entre 5 e 25 restos de aminoácidos, preferivelmente, entre 10 e 20 restos de aminoácidos. Não obstante, case desejado, o dito fragmento pode conter um maior número de restos de aminoácidos. Vantajosamente, o dito fragmento compreende um epítipo de uma proteína MAPK conforme a invenção. Numa realização em particular, o dito fragmento compreende a SEQ ID NO: 2, correspondente ao epítipo QKL**p**TDDHVQFLIY, onde "pT" representa o resto de Thr123 fosforilado e o resto das letras indica a notação dos aminoácidos, com base no código de uma única letra, da cinase p38, isoforma α , de camundongo. O dito epítipo se encontra altamente conservado ao largo da evolução, pelo que a dita SEQ ID NO: 2 pode ser considerada como uma seqüência

consenso do dito epítopo, entre as proteínas ortólogas de p38 das diferentes espécies.

Em outra realização em particular, a proteína MAPK conforme a invenção é um fragmento de uma proteína MAPK que
5 compreende uma carga negativa ou um resto volumoso em um sítio de fosforilação (ou na área que envolve o dito sítio) que é diferente do sítio ou sítios de fosforilação presentes no segmento de ativação da dita proteína MAPK, onde, como já mencionado anteriormente, o dito sítio de fosforilação
10 diferente é a Thr123 da p38, isoforma α , de camundongo, ou um resto de um aminoácido suscetível de fosforilação posicionalmente equivalente em outra proteína MAPK, tal como se define por alinhamento múltiplo de seqüências de aminoácidos, e dita modificação (carga negativa ou resto
15 volumoso) no dito sítio de fosforilação diferente, impede a ativação da dita proteína MAPK. A extensão do dito fragmento pode variar dentro de um amplo intervalo, por exemplo, entre 3 e 30 restos de aminoácidos, tipicamente, entre 5 e 25 restos de aminoácidos, preferivelmente, entre 10 e 20 restos
20 de aminoácidos. Não obstante, caso desejado, o dito fragmento, pode conter um maior número de restos de aminoácidos. Vantajosamente, o dito fragmento compreende um epítopo de uma proteína MAPK da invenção.

São conhecidas numerosas patologias nas quais estão
25 implicadas a ativação de MAPK. De um modo ilustrativo, não-limitativo, é conhecida a relação existente entre diferentes doenças e a p38 na forma ativa, quer dizer, fosforilada nos restos de fosforilação presentes no segmento de ativação, por

exemplo, nos restos de Thr180 e Tyr182 da p38, isoforma α , de mamífero (camundongo). Portanto, o fato de que se pode impedir a ativação da MAPK (impedindo a fosforilação nos sítios de fosforilação presentes no segmento de ativação da MAPK) por fosforilação de ou por introdução de uma carga negativa ou de um resto volumoso no novo sítio de fosforilação, ou na área que envolve o dito novo sítio de fosforilação das ditas MAPK, identificada na presente invenção (por exemplo, a fosforilação na Thr123 impede a fosforilação nos restos de Thr180 e Tyr182 de p38, isoforma α , de mamífero (camundongo)), e também o fato de que a fosforilação ou a introdução de uma carga negativa ou de um resto volumoso na Thr123 ou na área que envolve a Thr123 podem impedir o rotulamento e atividade da p38 com relação aos seus substratos, tem importantes implicações biológicas que resultam de utilidade, entre outras possíveis aplicações, no diagnóstico de uma patologia mediada por uma MAPK na forma ativa, ou para determinar o risco ou predisposição de um sujeito a desenvolver a dita patologia, ou para avaliar ou monitorar o efeito de uma terapia administrada a um sujeito que apresenta a dita patologia, ou para analisar o estado ou gravidade e/ou a evolução da dita patologia, assim como, na identificação de compostos potencialmente úteis para o tratamento da dita patologia. Neste sentido, a proteína MAPK da invenção pode desempenhar um destacado papel.

O termo "sujeito", conforme aqui usado, inclui qualquer membro de uma espécie animal, incluindo o ser humano; de modo ilustrativo, o dito sujeito pode ser um

mamífero, tal como um ser humano, um animal doméstico, um roedor, etc., preferivelmente, um homem ou mulher de qualquer idade e raça.

A expressão "patologia mediada por uma MAPK na forma ativa", tal como aqui se utiliza, inclui qualquer patologia na qual intervém ou desempenha algum papel uma MAPK na forma ativa, quer dizer, fosforilada nos restos de fosforilação presentes no segmento de ativação. Exemplos ilustrativos, não-limitativos, da dita patologia mediada por uma MAPK na forma ativa incluem câncer, assim como, as doenças cardíacas, infecciosas, neuronais, pulmonares e inflamatórias. Exemplos ilustrativos, não-limitativos, das ditas doenças incluem, infarto do miocárdio, hipertrofia, hipertensão, miocardite, lesões causadas por angioplastia, disfunções miocárdicas, infecções causadas por vírus ou bactérias, morte neuronal e de outros tipos celulares, doença de Alzheimer, psoríase, artrite reumatóide, neurite autoimune, doença de Crohn, câncer (carcinomas, leucemias, linfomas, sarcomas, etc.), formação de trombos, resposta a agentes quimioterapêuticos e radioterapêuticos, resposta à isquemia/reperfusão, etc.

Portanto, a proteína MAPK da invenção é uma proteína útil como marcador de diagnóstico ou de predisposição de um sujeito a desenvolver uma patologia mediada por uma MAPK na forma ativa, por exemplo, câncer ou uma doença cardíaca, infecciosa, nervosa, neuronal, pulmonar ou inflamatória. Pelo fato de que a presença de MAPK na forma ativa está associada com as patologias mediadas por MAPKs nas

formas ativas acima mencionadas, a identificação da proteína MAPK da invenção seria indicativa de um menor risco ou predisposição a desenvolver a dita patologia, já que a fosforilação no sítio de fosforilação identificado na presente invenção, ou a introdução de uma carga negativa ou de um resto volumoso no dito sítio de fosforilação ou na área que envolve o dito sítio, impediria a ativação da dita MAPK. Em uma realização em particular, a dita proteína MAPK da invenção é uma proteína p38 de mamífero fosforilada em um sítio de fosforilação diferente do sítio ou sítios de fosforilação presentes no segmento de ativação da dita p38 de mamífero, por exemplo, uma p38 de mamífero fosforilada em Thr123, ou um fragmento da dita proteína que compreende o dito resto fosforilado.

15 Numa realização em particular, a invenção proporciona um método *in vitro* para analisar o risco ou predisposição de um sujeito a desenvolver uma patologia mediada por uma MAPK na forma ativa, que compreende:

20 a) detectar e/ou quantificar o nível de uma proteína MAPK da invenção em uma amostra biológica procedente do dito sujeito; e

 b) comparar o dito nível com o de uma amostra de controle,

25 onde uma redução no dito nível relativo ao da amostra de controle é indicativo de risco do sujeito desenvolver a dita patologia mediada por uma MAPK na forma ativa.

 Praticamente, qualquer amostra biológica procedente do sujeito a se estudar pode ser utilizada, por exemplo,

sangue, soro, plasma, tecido, etc. A dita amostra pode ser obtida por métodos convencionais. A amostra de controle é uma amostra procedente de sujeitos que não padecem da dita patologia mediada por uma MAPK na forma ativa e inclui
5 valores de referência ou valores basais.

A detecção e/ou quantificação do nível (concentração) da dita proteína MAPK da invenção, pode ser determinada por métodos convencionais conhecidos pelos especialistas versados na técnica, por exemplo, mediante
10 métodos imunoquímicos (vistos mais adiante).

Dessa forma, a proteína MAPK da invenção pode ser utilizada para avaliar ou monitorizar o efeito de uma terapia administrada a um sujeito, o qual apresenta a dita patologia mediada por uma MAPK na forma ativa, por exemplo, câncer ou
15 uma doença cardíaca, infecciosa, nervosa, neuronal, pulmonar ou inflamatória. Nesse sentido, um tratamento que impeça a ativação da MAPK, por exemplo, fosforilando no sítio de fosforilação identificado na presente invenção, permitiria analisar o efeito de uma terapia administrada a um sujeito
20 que apresenta a dita patologia e, em caso de não resultar eficaz, modificar o tratamento ou projetar uma terapia personalizada. Numa realização em particular, a dita proteína MAPK da invenção é uma proteína p38 de mamífero fosforilada em um sítio de fosforilação diferente do sítio ou sítios de
25 fosforilação presentes no segmento de ativação da dita p38 de mamífero, por exemplo, uma p38 de mamífero fosforilada em Thr123, ou um fragmento da dita proteína que compreende o dito resto fosforilado.

A proteína MAPK da invenção também pode ser utilizada para analisar o estado ou gravidade e/ou a evolução da dita patologia mediada por uma MAPK na forma ativa, por exemplo, câncer ou uma doença cardíaca, infecciosa, nervosa, neuronal, pulmonar ou inflamatória. Nesse sentido, a identificação de uma proteína MAPK da invenção seria indicativa de uma melhor evolução desse tipo de patologia. Numa realização em particular, a dita proteína MAPK da invenção é uma proteína p38 de mamífero fosforilada em um sítio de fosforilação diferente do sítio ou sítios de fosforilação presentes no segmento de ativação da dita p38 de mamífero, por exemplo, uma p38 de mamífero fosforilada em Thr123, ou um fragmento da dita proteína que compreende o dito resto fosforilado.

Numa realização em particular, a invenção proporciona um método *in vitro* para avaliar ou monitorar o efeito de uma terapia administrada a um sujeito que apresenta a dita patologia mediada por uma MAPK na forma ativa, ou para analisar o estado ou gravidade e/ou a evolução da dita patologia mediada por uma MAPK na forma ativa, que compreende:

a) detectar e/ou quantificar o nível de uma proteína MAPK da invenção em uma amostra biológica procedente do dito sujeito; e

b) comparar o dito nível com o de uma amostra de controle procedente do mesmo sujeito.

A comparação entre ambos os níveis será indicativa da eficácia do tratamento e/ou da evolução da patologia. Por

causa disso, neste caso, a amostra de controle é uma amostra do próprio sujeito, antes de administrar ao mesmo o tratamento ou em períodos posteriores à administração do tratamento, para analisar a eficácia do mesmo e a evolução da patologia.

5 A detecção e/ou quantificação do nível (concentração) da dita proteína MAPK da invenção pode ser determinada por métodos convencionais conhecidos pelos especialistas versados na técnica, por exemplo, mediante métodos imunoquímicos (vistos mais adiante).

10 A proteína MAPK da invenção também pode ser utilizada para identificar compostos potencialmente úteis para o tratamento da dita patologia mediada por uma MAPK na forma ativa, por exemplo, câncer ou uma doença cardíaca, infecciosa, nervosa, neuronal, pulmonar ou inflamatória.

15 Nesse sentido, podem ser utilizados no tratamento das ditas doenças cardíacas, infecciosas, nervosas, neuronais, pulmonares ou inflamatórias, compostos que impeçam a ativação da dita MAPK; dessa forma, para o tratamento do câncer, podem ser utilizados compostos que desfosforilem a MAPK da

20 invenção, já que a ativação das ditas MAPKs após submissão de um sujeito à quimioterapia ou radioterapia, produz um sinal que induz a morte das células tumorais. Numa realização em particular, a dita proteína MAPK da invenção é uma proteína p38 de mamífero fosforilada em um sítio de fosforilação

25 diferente do sítio ou sítios de fosforilação presentes no segmento de ativação da dita p38 de mamífero, por exemplo, uma p38 de mamífero fosforilada em Thr123, ou um fragmento da dita proteína que compreende o dito resto fosforilado, ou uma

proteína p38 que tem um composto unido à Thr123 ou à área que envolve a Thr123 e imita a presença da carga negativa de um fosfato ou um resto volumoso na Thr123 ou na área que envolve a Thr123.

5 Numa realização em particular, a invenção proporciona um método *in vitro* para identificar um composto potencialmente útil para o tratamento de patologias mediadas por proteínas MAPK, que compreende:

10 a) por em contato o composto candidato com uma proteína MAPK, e

b) detectar a fosforilação da dita proteína MAPK em um sítio de fosforilação diferente do sítio ou sítios de fosforilação presentes no segmento de ativação da dita proteína MAPK, e

15 c) analisar se o dito sítio de fosforilação (i) é a Thr123 da p38, isoforma α , de camundongo (no caso da proteína MAPK utilizada ter sido a dita proteína), ou um resto de um aminoácido suscetível de fosforilação posicionalmente equivalente em outra
20 proteína MAPK, tal como se define por alinhamento múltiplo de seqüências de aminoácidos, e se (ii) a fosforilação no dito sítio de fosforilação diferente, impede a ativação da dita proteína MAPK;

ou, alternativamente,

25 i) por em contacto o composto candidato (por exemplo, um composto capaz de fosforilar a dita proteína MAPK ou um composto que imita o efeito da dita fosforilação) com uma proteína MAPK;

ii) detectar a fosforilação da dita proteína MAPK em um sítio de fosforilação do segmento de ativação da dita proteína MAPK, para medir o efeito do composto candidato sobre a ativação da proteína MAPK, ou
5 detectar o efeito de imitar a dita fosforilação sobre a dita proteína MAPK, para medir o efeito do composto candidato sobre a ativação da MAPK;

iii) analisar a atividade da dita proteína MAPK na presença do composto candidato com relação a seus
10 substratos, para avaliar a possível inibição do rotulamento e/ou atividade da proteína MAPK com relação a seus substratos, na presença de um composto competidor; e

iv) analisar (i) se o dito sítio de fosforilação na
15 Thr123 da proteína p38, isoforma α , de camundongo (no caso da proteína MAPK utilizada ter sido a dita proteína) é afetado pelo composto candidato, e (ii) se a fosforilação no dito sítio de fosforilação impede a ativação da dita proteína MAPK.

20 O composto candidato pode ser, numa realização em particular, um composto capaz de fosforilar uma proteína MAPK (por exemplo, uma cinase, etc.) ou um composto que imita o efeito da dita fosforilação, em contato com uma proteína MAPK. O composto competidor pode ser, em uma realização em
25 particular, um composto capaz de fosforilar uma proteína MAPK (por exemplo, uma cinase, etc.).

A fosforilação de uma proteína pode ser determinada por meio de qualquer método convencional conhecido pelos

especialistas versados na técnica. São conhecidos diversos ensaios para determinar o estado de fosforilação de uma proteína, ou o resto de aminoácido que se encontra fosforilado em uma determinada proteína, como, por exemplo, os ensaios de atividade da cinase *in vitro*, utilizando ATP marcado radioativamente; a eletroforese bidimensional das proteínas assim fosforiladas e marcadas (que permite analisar quantos restos de aminoácidos estão fosforilados em uma proteína); espectrometria de massa da proteína previamente purificada, cujo estado de fosforilação se quer medir; mutagênese dirigida, seguida de ensaio de atividade de cinase *in vitro*, com as proteínas purificadas; análise de fosfo-peptídeos, que implica na separação em duas dimensões de uma proteína fosforilada, após a digestão por tripsina ou, o menos complicado tecnicamente, o ensaio de Western blot, que contempla o emprego de anticorpos contra a dita proteína, que reconhecem de maneira específica o resto de aminoácido ou o epítipo da proteína que se encontra fosforilado. As técnicas para detectar restos fosforilados em proteínas são amplamente conhecidas pelos especialistas versados na técnica e estão disponibilizadas no estado da técnica.

Numa realização em particular, a dita proteína MAPK é uma cinase p38, tal como, uma p38 de mamífero, e a fosforilação se efetiva no resto de Thr123 presente na dita p38 de mamífero, isoforma α .

Em outro aspecto, a invenção se correlaciona com um composto capaz de se unir a uma proteína MAPK da invenção, e/ou capaz de detectar a dita proteína MAPK da invenção. Numa

realização em particular, o dito composto é um anticorpo capaz de se unir e/ou detectar a dita proteína MAPK da invenção.

Conforme aqui utilizado, o termo "anticorpo" pretende incluir tanto os anticorpos quiméricos ou recombinantes, como os anticorpos monoclonais e anticorpos policlonais ou fragmentos proteolíticos dos mesmos, tais como, fragmentos, Fab ou F(ab')₂, etc. Além disso, o ADN que codifica para a região variável do anticorpo pode ser inserido em outros anticorpos para produzir, deste modo, anticorpos quiméricos. Os anticorpos de cadeia sensível (scFv) podem ser polipeptídeos compostos por cadeias sensíveis, que possuem a capacidade própria de um anticorpo de união a um antígeno e que compreendem um par de seqüências de aminoácidos homólogas ou análogas às regiões variáveis das cadeias curtas e pesadas de uma imunoglobulina (união VH-VL ou scFv). Os polipeptídeos análogos às regiões variáveis das cadeias curtas e pesadas de um anticorpo podem se unir, caso desejado, através de um polipeptídeo de união. Métodos para a produção de anticorpos são amplamente conhecidos pelos especialistas versados na técnica e estão disponibilizados no estado da técnica.

De modo ilustrativo, o anticorpo proporcionado pela presente invenção é um anticorpo capaz de se unir e/ou detectar um epítipo presente na dita proteína MAPK da invenção. Numa realização em particular, a dita proteína MAPK da invenção é uma proteína p38 de mamífero, fosforilada em um sítio de fosforilação diferente do sítio ou sítios de

fosforilação presentes no segmento de ativação da dita p38 de mamífero, por exemplo, uma p38 de mamífero fosforilada em Thr123, ou um fragmento da dita proteína que compreende o dito resto fosforilado. Numa realização concreta, o dito anticorpo é capaz de se unir a um epítopo compreendido em um fragmento da cinase p38 de mamífero, compreendendo o dito fragmento, um resto de Thr123 fosforilado, ou um resto posicionalmente equivalente (correspondente) em outras proteínas MAPK. Em outra realização concreta, o dito anticorpo é um anticorpo capaz de se unir ao epítopo que compreende a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 2, epítopo altamente conservado ao largo da evolução, pelo que a dita SEQ ID NO: 2 pode ser considerada como uma sequência de consenso do dito epítopo entre as proteínas homólogas de p38 das diferentes espécies.

Numa outra realização em particular, o dito composto capaz de se unir a uma proteína MAPK da invenção é um composto que se une à dita proteína MAPK no novo sítio de fosforilação identificado na presente invenção (quer dizer, a Thr123 da p38, isoforma α , de camundongo, ou um resto de um aminoácido posicionalmente equivalente em outra proteína MAPK, tal como se define por alinhamento múltiplo de sequências de aminoácidos], ou na área que envolve o dito sítio, provocando o dito composto uma fosforilação reduzida da proteína MAPK no segmento de ativação e, por meio disso, impedindo a sua ativação e/ou atividade sobre seus substratos, por exemplo, um composto que introduz uma carga negativa ou um resto volumoso no dito sítio de fosforilação

ou, então, na área que envolve o dito sítio. Exemplos ilustrativos, não-limitativos, do dito composto, incluem:

(i) um composto capaz de se unir à região de rotulamento ("docketing") da p38 e capaz de imitar a introdução de uma carga negativa (por exemplo, um grupo fosfato) na dita região, por exemplo, a introdução de uma carga negativa ou de um resto volumoso na Thr123 (ou na área que a envolve) da p38, isoforma α , de camundongo, ou um resto de um aminoácido posicionalmente equivalente em outra proteína MAPK, tal como se define por alinhamento múltiplo de seqüências de aminoácidos, e a associação do dito composto no dito sítio de fosforilação Thr123, ou na área que envolve a dita Thr 123, impede a ativação da dita proteína MAPK; ou

(ii) um composto capaz de se unir à região de rotulamento da p38 e capaz de imitar a introdução de uma carga negativa (por exemplo, um grupo fosfato) na dita região, por exemplo, a introdução de uma carga negativa ou de um resto volumoso na Thr123 (ou na área que a envolve) da p38, isoforma α , de camundongo, ou um resto de um aminoácido posicionalmente equivalente em outra proteína MAPK, tal como se define por alinhamento múltiplo de seqüências de aminoácidos, e a associação do dito composto no dito sítio de fosforilação Thr123, ou na área que envolve a dita Thr 123, impede a atividade da dita proteína MAPK com relação a seus substratos.

Em outro aspecto, a invenção se correlaciona com o emprego do dito composto, capaz de se unir a uma proteína MAPK da invenção e/ou capaz de detectar a dita proteína MAPK da invenção, para analisar o risco ou predisposição de um
5 sujeito a desenvolver uma patologia mediada por uma MAPK na forma ativa, ou para avaliar ou monitorar o efeito de uma terapia administrada a um sujeito que apresenta a dita patologia, ou para analisar o estado ou gravidade e/ou a evolução da dita patologia, assim como, na identificação de
10 compostos potencialmente úteis para o tratamento da dita patologia.

Em outro aspecto, a invenção se correlaciona com um vetor, um adiante vetor da invenção, que compreende:

- 15 (i) uma sequência de ácido nucléico que codifica um composto que fosforila um sítio de fosforilação diferente do sítio ou sítios de fosforilação presentes no segmento de ativação de uma proteína MAPK, onde o dito sítio de fosforilação diferente é a Thr123 da p38, isoforma α , de camundongo, ou um
20 resto de um aminoácido suscetível de fosforilação posicionalmente equivalente em outra proteína MAPK, tal como se define por alinhamento múltiplo de seqüências de aminoácidos, e a fosforilação no dito sítio de fosforilação diferente impede a ativação
25 da dita proteína MAPK; ou
- (ii) uma sequência de ácido nucléico que codifica um composto que impede a fosforilação de um sítio de fosforilação diferente do sítio ou sítios de

fosforilação presentes no segmento de ativação de uma proteína MAPK; ou

- (iii) um composto que fosforila um sítio de fosforilação diferente do sítio ou sítios de fosforilação presentes no segmento de ativação de uma proteína MAPK, onde dito sítio de fosforilação diferente é a Thr123 da p38, isoforma α , de camundongo, ou um resto de um aminoácido suscetível de fosforilação posicionalmente equivalente em outra proteína MAPK, tal como se define por alinhamento múltiplo de seqüências de aminoácidos, e a fosforilação em dito sítio de fosforilação diferente impede a ativação da dita proteína MAPK; ou

- (iv) um composto que impede a fosforilação em um sítio de fosforilação diferente do sítio ou sítios de fosforilação presentes no segmento de ativação de uma proteína MAPK.

Numa realização em particular, a dita proteína MAPK é uma cinase p38 de mamífero e a fosforilação tem lugar em um sítio de fosforilação diferente do sítio ou sítios de fosforilação presentes no segmento de ativação da dita p38 de mamífero, por exemplo, na Thr123 de uma p38 de mamífero.

O vetor da invenção pode ser um vetor viral ou um vetor não-viral, os quais são conhecidos pelos especialistas versados na técnica, e podem ser utilizados em terapia, por exemplo, em terapia genética.

Numa realização em particular, o vetor da invenção compreende uma seqüência de ácido nucléico que codifica um composto que fosforila um sítio de fosforilação diferente do sítio ou sítios de fosforilação presentes no segmento de ativação de uma proteína MAPK, onde o dito sítio de fosforilação diferente é a Thr123 da p38, isoforma α , de camundongo, ou um resto de um aminoácido suscetível de fosforilação posicionalmente eqüivalente em outra proteína MAPK, tal como se define por alinhamento múltiplo de seqüências de aminoácidos, e a fosforilação no dito sítio de fosforilação diferente impede a ativação da dita proteína MAPK ou, então, um composto que fosforila o dito sítio de fosforilação diferente do sítio ou sítios de fosforilação presentes no segmento de ativação de uma proteína MAPK, onde o dito sítio de fosforilação diferente é a Thr123 da p38, isoforma α , de camundongo, ou um resto de um aminoácido suscetível de fosforilação, posicionalmente eqüivalente em outra proteína MAPK, tal como se define por alinhamento múltiplo de seqüências de aminoácidos, e a fosforilação no dito sítio de fosforilação diferente impede a ativação da dita proteína MAPK. A fosforilação no dito sítio de fosforilação diferente produz a inibição da atividade da dita proteína MAPK, pelo que o dito vetor da invenção pode ser útil para o tratamento de patologias mediadas por MAPKs na forma ativa.

Numa outra realização em particular, o vetor da invenção compreende uma seqüência de ácido nucléico que codifica um composto que impede a fosforilação de um sítio de

fosforilação diferente do sítio ou sítios de fosforilação presentes no segmento de ativação de uma proteína MAPK, ou um composto que impede a fosforilação do dito sítio de fosforilação diferente do sítio ou sítios de fosforilação presentes no segmento de ativação de uma proteína MAPK, tal como, por exemplo, um inibidor de uma cinase, tal como um inibidor da cinase GRK2, ou então, uma fosfatase, a qual desfosforila o dito sítio de fosforilação. Ao impedir a fosforilação do dito sítio de fosforilação, pode se promover a ativação da proteína MAPK, o que pode ser particularmente interessante para o tratamento do câncer, onde a existência de proteínas MAPKs na forma ativa, após submeter um sujeito a radioterapia ou quimioterapia, conduz a morte de células tumorais. Portanto, neste caso, o vetor da invenção pode ser útil para o tratamento de patologias mediadas por MAPKs na forma ativa, em particular, do câncer.

Numa realização concreta do vetor da invenção, o composto que fosforila um sítio de fosforilação diferente do sítio ou sítios de fosforilação presentes no segmento de ativação de uma proteína MAPK é uma cinase, ou um fragmento da mesma funcionalmente ativo, capaz de desempenhar a função própria da dita cinase, por exemplo, a cinase GRK2 ou um fragmento funcionalmente ativo da mesma, que, como se divulga na presente invenção, fosforila o resto de Thr123 presente numa p38 de mamífero, tal como, a p38 de camundongo, do tipo isoforma α .

Em outro aspecto, a invenção se correlaciona com uma composição farmacêutica, a qual compreende uma quantidade terapêuticamente eficaz de:

- 5 (i) um composto que fosforila um sítio de fosforilação diferente do sítio ou sítios de fosforilação presentes no segmento de ativação de uma proteína MAPK, onde o dito sítio de fosforilação diferente é a Thr123 da p38, isoforma α , de camundongo, ou um resto de um aminoácido suscetível de fosforilação
- 10 posicionalmente equivalente em outra proteína MAPK, tal como se define por alinhamento múltiplo de seqüências de aminoácidos, e a fosforilação no dito sítio de fosforilação diferente impede a ativação da dita proteína MAPK; ou
- 15 (ii) um composto que imita a fosforilação em um sítio de fosforilação diferente do sítio ou sítios de fosforilação presentes no segmento de ativação de uma proteína MAPK, onde o dito sítio de fosforilação diferente é a Thr123 da p38, isoforma α , de camundongo, ou um resto de um aminoácido suscetível
- 20 de fosforilação, posicionalmente equivalente em outra proteína MAPK, tal como se define por alinhamento múltiplo de seqüências de aminoácidos, e a fosforilação no dito sítio de fosforilação
- 25 diferente impede a ativação da dita proteína MAPK; ou
- (iii) um composto que impede a fosforilação em um sítio de fosforilação diferente do sítio ou sítios

de fosforilação presentes no segmento de ativação de uma proteína MAPK; ou

(iv) um vetor da invenção; ou

(v) um composto capaz de se unir a uma proteína MAPK da

5 invenção, que se une à dita proteína MAPK no novo sítio de fosforilação identificado na presente invenção, ou na área que envolve o dito sítio, o dito composto provocando uma fosforilação reduzida da proteína MAPK no segmento de ativação e, por meio
10 disso, impede sua ativação e/ou atividade com relação a seus substratos, por exemplo, um composto que introduz uma carga negativa ou um resto volumoso no dito sítio de fosforilação ou, então, na área que envolve o dito sítio; ou

15 (vi) um composto capaz de se unir à região de rotulamento da p38 e capaz de imitar a introdução de uma carga negativa (por exemplo, um grupo fosfato) na dita região, por exemplo, a introdução de uma carga negativa ou de um resto volumoso na Thr123 (ou
20 na área que a envolve) da p38, isoforma α , de camundongo, ou um resto de um aminoácido posicionalmente equivalente em outra proteína MAPK, tal como se define por alinhamento múltiplo de seqüências de aminoácidos, e a associação do dito
25 composto no dito sítio de fosforilação Thr123, ou na área que envolve a dita Thr 123, impede a ativação da dita proteína MAPK; ou

(vii) um composto capaz de se unir à região de rotulamento da p38 e capaz de imitar a introdução de uma carga negativa (por exemplo, um grupo fosfato) na dita região, por exemplo, a introdução de uma carga negativa ou de um resto volumoso na Thr123 (ou na área que a envolve) da p38, isoforma α , de camundongo, ou um resto de um aminoácido posicionalmente equivalente em outra proteína MAPK, tal como se define por alinhamento múltiplo de seqüências de aminoácidos, e a associação do dito composto no dito sítio de fosforilação Thr123, ou na área que envolve a dita Thr 123, impede a atividade da dita proteína MAPK com relação a seus substratos, junto com, opcionalmente, um veículo farmacêuticamente aceitável.

Numa realização em particular, a dita proteína MAPK é uma cinase p38 de mamífero e a fosforilação tem lugar em um sítio de fosforilação diferente do sítio ou sítios de fosforilação presentes no segmento de ativação da dita p38 de mamífero, por exemplo, na Thr123 de uma p38 de mamífero.

Numa realização em particular, a composição farmacêutica da invenção compreende um composto que fosforila um sítio de fosforilação diferente do sítio ou sítios de fosforilação presentes no segmento de ativação de uma proteína MAPK, tal como, uma cinase, ou um fragmento da mesma funcionalmente ativo, capaz de desempenhar a função própria da dita cinase, por exemplo, a cinase GRK2, ou um fragmento

funcionalmente ativo da mesma. A dita cinase fosforila a Thr123 de uma p38 de mamífero.

5 Numa outra realização em particular, a composição farmacêutica da invenção compreende um composto que impede a fosforilação em um sítio de fosforilação diferente do sítio ou sítios de fosforilação presentes no segmento de ativação de uma proteína MAPK.

Numa outra realização em particular, a composição farmacêutica da invenção compreende um vetor da invenção.

10 Para sua administração na prevenção e/ou tratamento de uma patologia mediada por uma MAPK na forma ativa, os compostos ativos (incluindo os vetores) são formulados em uma composição farmacêutica apropriada, numa quantidade terapeuticamente efetiva, junto com um ou mais veículos, 15 adjuvantes ou excipientes farmacêuticamente aceitáveis.

Exemplos de composições farmacêuticas incluem qualquer composição sólida (por exemplo, comprimidos, cápsulas, grânulos, etc.) ou líquida (por exemplo, soluções, suspensões, emulsões, etc.) para administração por qualquer 20 via de administração apropriada, por exemplo, oral, subcutânea, intraperitoneal, intravenosa, etc., tipicamente, por via oral, devido ao caráter geralmente crônico da doença a ser tratada.

Numa realização em particular, as ditas composições 25 farmacêuticas podem se apresentar numa forma farmacêutica de administração por via oral, ou então em forma sólida ou líquida. Exemplos ilustrativos de formas farmacêuticas de administração por via oral incluem, comprimidos, cápsulas,

granulados, soluções, suspensões, etc., e podem conter os excipientes convencionais, tais como, aglutinantes, diluentes, desintegrantes, lubrificantes, umectantes, etc., e podem ser preparadas por métodos convencionais. As

5 composições farmacêuticas também podem ser adaptadas para administração parenteral, em forma de, por exemplo, soluções, suspensões ou produtos liofilizados, esterilizados, na forma de uma dosagem apropriada; neste caso, as ditas composições farmacêuticas incluirão excipientes adequados, tais como,

10 tampões, tensoativos, etc. Em qualquer caso, os excipientes serão escolhidos em função da forma farmacêutica de administração selecionada. Uma revisão das diferentes formas farmacêuticas de administração de fármacos e de sua preparação pode ser encontrada no livro "Tratado de Farmacia

15 Galénica", de C. Faulí e Trillo, 10ª. Edição, 1993, Luzán 5, S.A. de Edições.

Em geral, a quantidade terapeuticamente efetiva do composto (ou vetor) a ser administrado dependerá, entre outros fatores, do sujeito que irá ser tratado, da gravidade

20 da patologia que padece o dito sujeito, da forma de administração escolhida, etc. Por este motivo, as doses mencionadas na presente invenção devem ser consideradas apenas como orientações para o especialista versado na técnica, este devendo ajustar as doses em função das

25 variáveis citadas anteriormente. Não obstante, a composição farmacêutica da invenção pode ser administrada uma ou mais vezes ao dia, por exemplo, 1, 2, 3 ou 4 vezes ao dia, em uma quantidade típica total diária compreendida entre 25 e 75

mg/kg/dia.

A composição farmacêutica da invenção pode ser utilizada junto com outros fármacos adicionais, úteis na prevenção e/ou tratamento das ditas patologias mediadas por MAPKs na forma ativa, para proporcionar uma terapia de combinação. Os ditos fármacos adicionais podem fazer parte da mesma composição farmacêutica ou, alternativamente, podem ser proporcionados em forma de uma composição separada, para administração simultânea ou não à composição farmacêutica proporcionada pela presente invenção.

Em outro aspecto, a invenção se correlaciona com o emprego de:

(i) um composto que fosforila um sítio de fosforilação diferente do sítio ou sítios de fosforilação presentes no segmento de ativação de uma proteína MAPK, onde o dito sítio de fosforilação diferente é a Thr123 da p38, isoforma α , de camundongo, ou um resto de um aminoácido suscetível de fosforilação posicionalmente equivalente em outra proteína MAPK, tal como se define por alinhamento múltiplo de seqüências de aminoácidos, e a fosforilação no dito sítio de fosforilação diferente impede a ativação da dita proteína MAPK; ou

(ii) um composto que imita a fosforilação em um sítio de fosforilação diferente do sítio ou sítios de fosforilação presentes no segmento de ativação de uma proteína MAPK, onde o dito sítio de fosforilação diferente é a Thr123 da p38, isoforma

α , de camundongo, ou um resto de um aminoácido suscetível de fosforilação, posicionalmente equivalente em outra proteína MAPK, tal como se define por alinhamento múltiplo de seqüências de aminoácidos, e a fosforilação no dito sítio de fosforilação diferente impede a ativação da dita proteína MAPK; ou

(iii) um composto que impede a fosforilação em um sítio de fosforilação diferente do sítio ou sítios de fosforilação presentes no segmento de ativação de uma proteína MAPK; ou

(iv) um vetor da invenção; ou

(v) um composto capaz de se unir a uma proteína MAPK da invenção, que se une à dita proteína MAPK no novo sítio de fosforilação identificado na presente invenção, ou na área que envolve o dito sítio, o dito composto provocando uma fosforilação reduzida da proteína MAPK no segmento de ativação e, por meio disso, impede sua ativação e/ou atividade com relação a seus substratos, por exemplo, um composto que introduz uma carga negativa ou um resto volumoso no dito sítio de fosforilação ou, então, na área que envolve o dito sítio; ou

(vi) um composto capaz de se unir à região de rotulamento da p38 e capaz de imitar a introdução de uma carga negativa (por exemplo, um grupo fosfato) na dita região, por exemplo, a introdução de uma carga negativa ou de um resto volumoso na

Thr123 (ou na área que a envolve) da p38, isoforma α , de camundongo, ou um resto de um aminoácido posicionalmente equivalente em outra proteína MAPK, tal como se define por alinhamento múltiplo de seqüências de aminoácidos, e a associação do dito composto no dito sítio de fosforilação Thr123, ou na área que envolve a dita Thr 123, impede a ativação da dita proteína MAPK; ou

(vii) um composto capaz de se unir à região de rotulamento da p38 e capaz de imitar a introdução de uma carga negativa (por exemplo, um grupo fosfato) na dita região, por exemplo, a introdução de uma carga negativa ou de um resto volumoso na Thr123 (ou na área que a envolve) da p38, isoforma α , de camundongo, ou um resto de um aminoácido posicionalmente equivalente em outra proteína MAPK, tal como se define por alinhamento múltiplo de seqüências de aminoácidos, e a associação do dito composto no dito sítio de fosforilação Thr123, ou na área que envolve a dita Thr 123, impede a atividade da dita proteína MAPK com relação a seus substratos,

na elaboração de uma composição farmacêutica para o tratamento de uma patologia mediada por MAPKs na forma ativa.

Numa realização em particular, a dita proteína MAPK é uma cinase p38 de mamífero e a fosforilação tem lugar em um sítio de fosforilação diferente do sítio ou sítios de

fosforilação presentes no segmento de ativação da dita p38 de mamífero, por exemplo, na Thr123 de uma p38 de mamífero.

5 Numa realização em particular, o dito composto que fosforila um sítio de fosforilação diferente do sítio ou sítios de fosforilação presentes no segmento de ativação de uma proteína MAPK, é uma cinase, ou um fragmento da mesma funcionalmente ativo, capaz de desempenhar a função própria da dita cinase, por exemplo, a cinase GRK2, ou um fragmento funcionalmente ativo da mesma, que fosforila a Thr123 da p38, 10 isoforma α , de mamífero (camundongo).

Em outro aspecto, a invenção se correlaciona com um kit que compreende uma proteína MAPK da invenção, ou um composto capaz de se unir e/ou detectar a dita proteína MAPK da invenção, conforme mencionado anteriormente.

15 Numa realização em particular, o kit proporcionado pela oresente invenção pode ser utilizado no diagnóstico de uma patologia mediada por uma MAPK na forma ativa, ou para determinar o risco ou predisposição de um sujeito a desenvolver a dita patologia, ou para avaliar ou monitorar o 20 efeito de uma terapia administrada a um sujeito que apresenta a dita patologia, ou para analisar o estado ou gravidade e/ou a evolução da dita patologia, assim como, na identificação de compostos potencialmente úteis para o tratamento da dita patologia. Numa realização concreta, a dita proteína MAPK é 25 uma cinase p38 de mamífero, fosforilada na Thr123 de uma p38 de mamífero, isoforma α .

Em outro aspecto, a invenção se correlaciona com um método de tratamento de uma patologia mediada por uma MAPK na

forma ativa, cujo método compreende administrar a um sujeito em necessidade de tratamento uma composição farmacêutica proporcionada pela presente invenção.

O exemplo seguinte ilustra a presente invenção, não limitando de nenhum modo o alcance da mesma.

Exemplo

Fosforilação da Thr123 da proteína p38 mediante a enzima GRK2

I. Materiais e Métodos

Produtos

10 Todos os reagentes e produtos utilizados são de grau analítico. Cloretos de sódio, cálcio, amônio, manganês e magnésio, fosfatos de sódio e de potássio, carbonatos de sódio, hidróxido de sódio, acetato de sódio, sacarose, uréia, Tris, formaldeído, paraformaldeído, glicina, ácido acético
15 glacial, ácido clorídrico, metanol, etanol, butanol e glicerol foram supridos pela Merck. ATP (trifosfato de adenosina), fluoreto de sódio, ácido desoxicólico, EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), EGTA (ácido etilenglicol bis(2-aminoetilenéter)-N-N-N'-N'-tetraacético), β -
20 mercaptoetanol, DTT (ditiotreitól), heparina, ortovanadato sódico, DMSO (dimetilsulfóxido), roxo Ponceau, HEPES (ácido N-(2-hidroxietil)piperazin-N'-2-etanossulfônico), Nonidet P-40, Triton x-100, Tween-20, aprotinina, inibidor de tripsina, azida sódica, Proteína A-Sepharose, foram supridos pela
25 Sigma. PMSF (fluoreto de fenil-metil-sulfonila), benzamidina, glutathiona reduzida, BSA (albumina de soro bovino) e os antibióticos ampicilina e canamicina, assim como, o IPTG (isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido), foram obtidos da

Roche. TEMED (N,N,N,N-tetrametil-etilendiamina), SDS (dodecil sulfato sódico), persulfato de amônio, azul de bromofenol, azul de Coomassie, padrões protéicos pretendidos de peso molecular conhecido, papel de nitrocelulose e o reagente de
 5 Bradford foram proporcionados pela Bio-Rad. O reagente de Folin-Ciocalteu foi obtido da Panreac e o TCA (ácido tricloroacético) da Carlo-Erba. O isótopo radioativo [γ - ^{32}P] ATP foi proporcionado pela Amersham Biosciences e a mistura de marcação metabólica [^{35}S] metionina-cisteína foi suprida
 10 pela New England Nuclear.

Construções e Plasmídeos Empregados

Foram utilizados neste tópico os seguintes plasmídeos:

GRKs

- 15 - a construção de pCMV-GRK3 de rato foi cedida pela Dra. S. Cotecchia, da Universidade Dausanne, Suíça.
- as construções pCDNA3-GRK2 bovina, pCDNA3-GRK2-K220R bovina, pCDNA3-GRK5 foram cedidas pelo Laboratório do Dr. J. L. Benovic, da Universidade Thomas Jefferson, Filadélfia,
 20 Estados Unidos.
- a construção pCEFL-ADNc anti-sentido de GRK2 foi enviada pela Dra. C. Shayo.

Módulo de MAPK p38

- o mutante constitutivamente ativo pCDNA3-MKK6 Δ (E) (pCDNA3-MKK6 Δ (Glu): MKK6S207E/T211E foi proporcionado pelo Dr. J. M. Redondo, do Centro de Biologia Molecular Severo Ochoa (Madrid), que, além disso, facilitou a construção pCDNA3-Flag-p38 α de camundongo e do vetor de expressão procariótico
 25

pGEX2T- p38 α .

- os vetores pGEX4T-Mxi2 e pGEX4T-Mxi2 Δ 17, destinados à produção de proteínas de fusão com GST, foram doados pelos Drs. P. Crespo e V. Sanz, da Universidade de Cantabria.

5 Outros

- o vetor inativo pCDNA3 é da Invitrogen.

- o plasmídeo pCEFL-EGFP foi proporcionado pela Dra. C. Murga (Centro de Biologia Molecular Severo Ochoa).

- a construção pBC12BI- β_2 -AR foi cedida pela Dra. A. Ruiz-Gómez (Centro de Biologia Molecular Severo Ochoa).

- o mutante Raf-1YY340/341DD foi proporcionado pelo Dr. A. S. Dhillon, Beatson Institute for Cancer Research, Glasgow, U.K.

- pTrcHisB foi obtido da Invitrogen.

Culturas Celulares

15 *Linhas Celulares Estabelecidas*

Foram utilizadas diversas linhas celulares estabelecidas: as células HEK293 (rim embrionário humano) foram obtidas da Invitrogen, as células COS-7 (células de rim de macaco verde) e as células Sf9 (*Spodoptera frugiperda*), foram obtidas da ATCC (American Type Culture Collection). As células HEK293 e COS-7 cresceram em uma membrana sobre placas individuais P-100, P-60 (Falcon) ou placas de múltiplos poços M6, M12 ou M24 (Falcon, Costar), no meio Eagle Modificado pela Dulbecco (DMEM), suplementado com glutamina 2 mM, soro fetal de bezerro a 10%, e uma mistura de antibióticos (gentamicina (50 μ g/mL), estreptomicina (0,01%) e penicilina G (0,063%)).

Do mesmo modo, foram empregadas duas culturas

massivas de expressão estável de GRK2, geradas a partir de células EBNA (derivada de HEK e transfectada com um plasmídeo que codifica o antígeno EBNA) e do vetor pCDNA3-GRK2, com resistência à neomicina, razão pela qual foram cultivadas na
5 presença de geneticina (200 µg/mL) (neomicina G418, Calbiochem).

A linha celular preadipocítica 3T3-L1, obtida da ATCC, assim como, as linhas estáveis geradas a partir da mesma, foram mantidas no meio DMEM, suplementado com
10 glutamina e antibióticos e com 10% de soro de bezerro neonatal (*new born calf serum*, NCS). Em seguida, se adicionou geneticina (750 µg/mL) às populações estavelmente transfectadas com pCDNA3-GRK2 e com pCDNA3-K220R. As condições de diferenciação com adipócitos são detalhadas mais
15 adiante.

Todos estes tipos celulares foram incubados à temperatura de 37°C em uma atmosfera umidificada com 5-7% de CO₂.

As células Sf9 cresceram em suspensão, numa
20 densidade de 3×10^5 células/mL, com agitação a 150 rpm, ou na membrana em placas P-100 ou P-150, no meio da Grace (Gibco), suplementado com 10% de soro fetal de bezerro e gentamicina (50 µg/ml), à temperatura de 27°C, sem atmosfera de CO₂.

Foram obtidas culturas primárias de macrófagos
25 murinos e as mesmas foram mantidas utilizando protocolos convencionais. Essencialmente, ratos C57BL/6 GRK2 +/+ e +/-, de 3 meses de idade, gentilmente doados pelo Dr. Marc Caron (Duke University, Carolina do Norte, USA) foram injetados

intraperitonealmente com tioglicolato sódico (1 mL). Quatro dias depois, foram isolados macrófagos peritoneais mediante uma lavagem intraperitoneal com 15 mL de PBS. Foram separadas um milhão de células por poço sobre uma placa M12, e deixadas
5 aderir em um meio RPMI, suplementado com 0,5% de soro fetal de bezerro (FCS), depois, lavadas de forma intensa. Os macrófagos resultantes foram estimulados durante 16 horas à temperatura de 37°C em uma câmara umidificada com as concentrações determinadas de LPS de *E. coli* (Sigma) no meio
10 RPMI, com 0,5% de FCS.

Transfecções

As transfecções transitórias das células HEK293 e COS-7 se efetivaram em placas P-100 ou P-60, numa confluência entre 70 e 80%, pelo método de Lipofectamina/PLUS,
15 (Invitrogen). Embora tenham se empregados protocolos alternativos de transfecção com reagentes como Fugene (Roche), JetPei (Poly Transfection) ou Escort-II (Sigma), o procedimento mais utilizado foi o de lipofectamina. Resumidamente, um dia antes da transfecção, foram plaqueadas
20 $1,5 \times 10^6$ células (HEK293) por P-60 ou, de forma correlacionada, um número de células proporcional à superfície da placa empregada. A partir deste ponto, os protocolos se referem a uma placa P-60. No dia seguinte, foi preparada uma mistura (1) de ADN plasmídico de alta pureza
25 (isolado em colunas de afinidade supridas pela Quiagen e re-suspenso em água MilliQ estéril), (3-5 µg no caso de P-60), reagente PLUS (8 µL para P-60) e OPTIMEM (Gibco, BRL), (250 µL para P-60), que foi incubada por 15 minutos à temperatura

ambiente. Em cada experimento se adiciona uma quantidade de vetor inativo necessária (em geral, pCDNA3) para manter constante a quantidade total de ADN por placa. Paralelamente, e em outro tubo, se mistura (2) a lipofectamina (12 μ L para P-60) com OPTIMEM (250 μ L para P-60) e que é igualmente incubada. Transcorridos 15 minutos, se misturam em proporções iguais (1) e (2), incubando-se o preparado por mais 15 minutos e, finalmente, vertendo-se sobre as placas (mistura de reação final: 0,5 mL para P-60), que previamente foram cobertas com OPTIMEM (2 mL por P-60). As células são incubadas a 37°C no meio de transfecção durante 3 horas e no final deste tempo se retira o meio de transfecção, substituindo-se pelo meio DMEM suplementado com soro a 10%. No dia seguinte, se troca o meio por um meio fresco e se deixa que as células se recuperem, pelo menos durante 24 horas antes de processar a cultura para o experimento. Em geral, os tratamentos e a re-coleta e lise das células se efetivam nas 48 horas da transfecção.

GRK2 e p38MAPK

Nos experimentos de associação de GRK2 e Flag-p38 α se empregou uma relação de 1:1:1 de GRK2 (o GRK2-K220R), Flag-p38 α , e receptor β_2 -adrenérgico (geralmente 1 μ g de cada por p60).

Nos ensaios de sobreexpressão de doses crescentes de GRK2, foram transfectadas células HEK293, espalhadas normalmente em placas de múltiplos poços de 6 ou de 12 (M6 ou M12) com pCDNA3-Flag-p38 α , pCDNA3-MKK6_{CAM}, e com quantidades crescentes do vetor pCDNA3-GRK2 (indicadas nas Figuras).

Geralmente, para uma M6 se utilizam 100 ng de Flag-p38 α , 100 ng de MKK6_{CAM}, e de 0 a 1 μ g de GRK2. Em todos os pontos se completava a quantidade total de ADN com pCEFL-EGFP e com pCDNA3 inativo, em substituição de pCDNA3-MKK6_{CAM}, no caso dos
5 pontos de controle.

Nas transfecções de ADN anti-sentido de GRK2, em placas de múltiplos poços M6, as quantidades de ADN utilizadas foram algo diferentes: 150 ng de pCDNA3-Flag-p38 α , 50 ng de pCDNA3-MKK6_{CAM}, e, de 0,5 μ g a 2 μ g do vetor pCEFL-
10 GRK2 anti-sentido (AS), ou as mesmas quantidades de pCEFL-EGFP. Em todos os pontos se completou a quantidade total de ADN com o vetor pCEFL inativo.

Nos ensaios de sobreexpressão análogos, foram transfectadas transitoriamente as células em M6 e sempre em
15 duplicata, com: 150 ng de pCDNA3-Flag-p38 α WT, ou pCDNA3-Flag-p38 α T123D e 50 ng de pCDNA3-MKK6_{CAM}, (ou pCDNA3 inativo).

A expressão transitória das diferentes proteínas se confirmou por análise dos lisados celulares (aproximadamente
20 10% do volume total do lisado celular) por imunodeteccção, após eletroforese (Western blot) com anticorpos específicos, como se especifica em cada caso.

Tratamentos celulares

Os tratamentos de estimulação das células
25 transfectadas transitoriamente se efetivaram em todos os casos nas 48 horas da transfecção. Após a estimulação com os diferentes agentes, as células foram lavadas em tampão de fosfato salino (PBS) frio e foram colhidas com a ajuda de um

raspador. O tampão de lise no qual se recolhem as células, depende da imunoprecipitação específica que irá se realizar (ver detalhe separado da imunoprecipitação).

A estimulação de células HEK293 com isoproterenol (Sigma), 10 μ M, se efetivou a uma temperatura de 37°C em um meio de cultura sem soro. Nestes experimentos, foram mantidas as células sem soro (abstinência) durante umas 2 horas antes da estimulação, com o objetivo de minimizar os estímulos procedentes de compostos presentes no soro.

A estimulação com NaCl 0,5 M (Merck) se realizou durante 15 minutos na incubadora de células.

Diferenciação de Adipócitos

A cultura das células se realiza com o meio DMEM a 10%, de soro NCS. Contudo, todo o proceso de diferenciação que explicado em seguida se fará em um meio com soro empobrecido AXC (resina de intercâmbio iônico), mediante sucessivas adsorções do soro fetal de bezerro a uma resina de intercâmbio aniônico e a carvão ativo. O soro AXC foi proporcionado pelo serviço de cozinha do Instituto de Investigações Biomédicas. As células são cultivadas até a sua confluência e são plaqueadas (5×10^5 em P-100) no meio DMEM-10% AXC, suplementado com 4 μ M de biotina (Sigma). No dia seguinte, se substitui o meio por um meio fresco. As células são deixadas crescer durante três dias, mas, até que alcancem de novo a confluência, no dia que se denomina "0". No dia 0 da diferenciação, as células são cultivadas em um meio que contém: dexametasona, 0,5 μ M (Sigma), 3-isobutil-1-metilxantina, 0,5 mM (IMBX, de Sigma) e insulina 1 μ M

(Sigma), onde permanecem por mais três dias. No dia 3 se substitui o meio deste tratamento iniciador da adipogênese, pelo meio DMEM-10% AXC, suplementado com 4 μ M de biotina e insulina 1 μ M, o qual irá transcorrer no resto da
5 diferenciação, fazendo-se a substituição do meio a cada três dias. A partir do dia 6 e até o 15, se analisou a adipogênese por meio de tingimento com Oil Red, corante roxo de composição lipofílica que se une às gotas de gordura que os adipócitos acumularam em seu citoplasma. Para isto, se
10 fixam as células com formol (formaldeído a 3,7%) durante 5 minutos e se lavam com PBS frio. Depois, se incuba com uma solução previamente filtrada 60:40 (v/v) de Oil Red (dissolvida em isopropanol 0,2% p/v) e água. Em seguida, se lava de forma abundante com PBS e se visualizam as células em
15 um microscópio óptico. Então, se procede à recontagem das células em um total de 25 campos por cada placa experimental.

Geração de Mutantes

Mutantes Pontuais

A maioria dos mutantes foram gerados mediante o
20 protocolo de mutagênese dirigido de QuickChange, da Stratagene. Resumidamente, foram feitos os oligos mutagênicos antiparalelos, que, a seguir, são descritos para cada mutante em particular, com os quais se efetivou a reação em cadeia por polimerase (PCR) em um termociclador (Gene Amp® 9700, da
25 Applied Biosystems), empregando como polimerase termoestável Pfu. Os vetores inteiramente amplificados foram dirigidos com DpnI para eliminar o ADN ou molde parental e o produto da digestão se transformou em bactérias competentes, a partir

das quais se pôde comprovar a incorporação da mutação, por
 seqüenciação no SIDI (Serviço Interdepartamental de
 Investigação) com oligonucleótidos cevadores específicos de
 cada tipo de plasmídeo (Sp6, T7, T3, ou os específicos para a
 5 seqüenciação de proteínas clonadas em vetores pGEX).

p38T123A

- oligo FWD: 5' GTG AAG TGC CAG AAG CTG **GCC** GAC GAC CAC GTT
 CAG 3' (SEQ ID NO: 3);

- oligo REV: 5' CTG AAC GTG GTC GTC **GGC** CAG CTT CTG GCA CTT
 10 CAC 3' (SEQ ID NO: 4);

Os produtos PCR mutagênica se seqüenciarão com os
 oligonucleotídeos cevadores SP6 e T7, que flanqueiam a ORF
 (marco aberto de leitura) de p38 em pCDNA3 ou com os
 oligonucleotídeos específicos para a seqüenciação da série de
 15 plasmídeos pGEX, da Amersham.

p38T123D

- oligo FWD: 5' GTG AAG TGC CAG AAG CTG **GAC** GAC GAC CAC GTT
 CAG 3' (SEQ ID NO: 5);

- oligo REV: 5' CTG AAC GTG GTC GTC **GTC** CAG CTT CTG GCA CTT
 20 CAC 3' (SEQ ID NO: 6);

Mutantes Truncados

A proteína truncada GST-280-360p38 foi gerada de
 forma correspondente aos 80 últimos aminoácidos de p38 α ,
 utilizando o sistema de Gateway, da Invitrogen. Este
 25 polivalente método de clonagem, mediante recombinases,
 permite a expressão da proteína ou do fragmento protéico de
 interesse em um grande número de plasmídeos para hóspedes,

tanto eucarióticos, como procarióticos, e com variados epítomos. São juntados esquemas explicativos das etapas que se seguiram: geração do vetor de entrada (*entry clone*) e obtenção do plasmídeo de expressão com GST.

5 Em primeiro lugar, foi necessário o modelo dos oligonucleotídeos que permitissem incorporar as seqüências attB, branco das recombinases, flanqueando a região da ORF de p38 α que se quer traduzir. Se denominam GTW, de Gateway. Em **negrito**, se destaca a seqüência que depois será reconhecida
10 pela recombinase BP. O oligo GTW-FWD foi feito de maneira que o primeiro aminoácido de p38 a traduzir (Ala 281, sublinhado na seqüência nucleotídica) estivesse em fase com a seqüência attB1. O oligo GTW-REV incorpora o códon de terminação da tradução (também sublinhado). Na PCR, se utilizou o plasmídeo
15 pGEX2T-p38 α como molde.

- oligo GTW-FWD: 5' GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT
CGC TGT CGA CCT ACT GGA GAA GAT G 3' (SEQ ID NO: 7);

- oligo GTW-REV: 5' GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC
TCA GGA CTC CAT TTC TTC TTG GTC 3' (SEQ ID NO: 8);

20 A clonagem do produto da PCR, de 240 pb no vetor pDONORTM201, se realizou mediante a reação BP-clonase (durante pelo menos 1 hora, à temperatura de 25°C), consistente na recombinação, mediada pelas seqüências attB, do produto da PCR com o vetor pDONOR. A reação se detém, ao
25 se adicionar Proteinase-K durante 10 minutos, a uma temperatura de 37°C. O ADN, produto da recombinação, se utiliza para transformar bactérias DH5 α , que são selecionadas com canamicina.

Em seguida, foi escolhido o plasmídeo de destino: pDEST15 que garante a expressão procariótica da proteína no clonado, como fusão, em fase, desde as seqüências de recombinação, a GST. (Também, se introduziu o fragmento de terminal-C de p38 no plasmídeo de expressão eucariótica pDEST27, porém, os ditos resultados foram omitidos). A reação LR-clonase se realiza utilizando o clone de entrada (pDONOR-280-360p38) e o vetor: pDEST15 linearizado, incubando-se com a mistura enzimática LR-clonase durante 1 hora a uma temperatura de 25°C. A reação se detém incubando-se a amostra com Proteinase-K, durante 20 minutos à temperatura de 37°C e o ADN obtido, após pertinente comprovação por seqüenciação com os oligos attB, se utilizou para transformar bactérias BL21, a partir das quais se purificou a construção GST-280-360 p38.

Subclonagens de ADN

Para a expressão e purificação de MAPKAPK2 (MK2) com uma cola de histidina de terminal-C, se obteve o plasmídeo pFtx5-MK2ΔN1, deletado numa região rica em prolina do extremo terminal-N, de modo a se obter uma expressão mais estável, através da provisão do Dr. Phil Cohen (University of Dundee, Escócia, UK) e se utilizou como molde em uma reação por cadeia de polimerase (PCR), utilizando os iniciadores:

5' GGG **GCC ATG GTC** AAG TCC GGC C 3' (SEQ ID NO: 9); e

5' CCCC **CTC GAG** GTG GGC CAG AGC CGC AGC 3' (SEQ ID NO: 10).

O produto foi subclonado em NcoI-XhoI (em negrito) no vetor pTrcHis2B (Invitrogen).

Proteínas e Peptídeos Recombinantes Purificados

A MEKK6/MEKK3 ativada foi proporcionada pela Upstate. A purificação de GRK2 se efetivou pela Dra. A. Ruiz-Gómez, a partir de células Sf9 infectadas com construções de GRK2 em baculovirus.

A rodopsina se purifica a partir de retinas bovinas conforme métodos convencionais. Assim, é obtida uma preparação na qual a rodopsina supõe mais de 90% da proteína (evidenciado por tingimento com azul de Coomassie).

As proteínas de fusão GST-p38, GST-ATF2, GST-MEF2A, GST-Mxi2, GST-Mxi Δ 17 e GST-280-360p38, GST-p38T123A e p38T123D se purificaram conforme métodos padrões que descreveremos resumidamente: se transformam as ditas construções em bactérias *E. coli* e se induz a sua expressão com IPTG. As bactérias se sedimentam e são lisadas em Tris-HCl, 10 mM, pH 8, Triton X-100 a 1%, lisozima, 2 mg/mL e inibidores de proteases, após o que o lisado bacteriano se sonifica e clarifica. Em seguida, se introduz na coluna glutationala-Sepharose4B® (Amersham Biosciences) e se passa durante um mínimo de 3 horas, lavando-se a columna com PBS e depois, se eluindo as proteínas com Tris-HCl, 50 mM, pH 8, glutationala reduzida, 5 mM (Sigma). A pureza é comprovada e a concentração das proteínas é obtida em géis desnaturalizantes de poliacrilamida-SDS. A origem dos plasmídeos que codificam estas proteínas se especifica no detalhe separado anteriormente, ou se são de geração própria, se consigna de onde procede.

Os substratos específicos de p38, como MBP

(proteína básica de mielina) ou PHAS-I (proteína fosforilada por calor e ácido, estável, regulada por insulina) foram obtidos da Sigma e da Stratagene, respectivamente. O peptídeo APRTPGGRC, descrito como substrato específico de MAPKs
5 utilizado em reações de fosforilação com a cinase p38, foi sintetizado pelo Serviço Proteômico do CBMSO. A dissolução foi feita numa concentração final de 0,5 mM, em Tris 20 mM, em pH 7,6.

A determinação de proteínas se realizou pelo método
10 de Bradford ou pelo método de Lowry e outros, utilizando albumina de soro bovino como padrão para construir a reta padrão.

Eletroforese

Eletroforese em géis de poliacrilamida-SDS

15 Géis Unidimensionais

Foram utilizados géis de poliacrilamida-SDS, conforme o método descrito por Laemmli, cujas percentagens de acrilamida-bisacrilamida variaram entre 7 e 12%, em função da resolução requerida pelo experimento. Como padrões de peso
20 molecular foram empregadas as proteínas: miosina (200 kDa), β -galactosidase (116,25 kDa), fosforilase B (97,4 kDa), albumina de soro bovino (66,2 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (31 kDa), inibidor de tripsina de soja (21 kDa) e lisozima (14 kDa) (Rainbow Markers, da Bio-Rad). Em
25 alguns casos, os géis foram tingidos com azul de Coomassie. Após decompor as proteínas, o gel pode ser submetido à autoradiografia, caso as proteínas estejam marcadas com [γ -³²P]ATP, ou à fluorografia, caso as proteínas estejam

marcadas com [³⁵S]-metionina. Em ambos os casos, se requer uma etapa de fixação em metanol:acético (50:10), durante 20 minutos. Nas marcações metabólicas, freqüentemente, se recorreu à amplificação do sinal, incubando-se durante 20 minutos com Amplify (Amersham) para, depois, secar o gel e expô-lo com uma película de raios X, Agfa Curix RP2 de 100 NIF.

Géis Bidimensionais

Com o objetivo de analisar o número de resíduos do substrato da fosforilação por GRK2 em p38, se incubaram ambas as proteínas nas condições de reação que são especificadas adiante. As fosfo-proteínas resultantes foram decompostas em géis bidimensionais. O isoeletro-enfoque ou primeira dimensão eletroforética foi produzido se utilizando uma mistura resolutiva de anfólitos (BioRad), de faixa final de pH de 3-10, em um gel de acrilamida/bisacrilamida a 4%, com uréia, 8 M. Em certas ocasiões, a primeira dimensão se realizou de maneira alternativa, empregando-se as tiras previamente espalhadas da Biorad (IPG Strips, de faixa de pH 3-10). A segunda dimensão foi efetivada em um gel a 8% (SDS-PAGE) e as fosfo-proteínas foram detectadas por auto-radiografia.

Eletroforese de Ácidos Nucléicos em Géis de Agarose-TAE

A separação de fragmentos de ADN se realizou em géis de agarose de desenvolvimento horizontal, 0,8-1%. O tampão de eletroforese utilizado foi TAE (Tris-acético 40 mM, EDTA 2 mM) e o tampão de carga das amostras foi glicerol a 50%, EDTA 1 mM, azul de bromofenol a 0,4% e azul de xileno a 0,4%. Os padrões de peso molecular foram os fragmentos da

digestão enzimática com HindIII dos fagos e Φ 29 (supridos pelo Serviço de Fermentação do Centro de Biologia Molecular).

Seqüenciação Proteômica

A determinação da localização da modificação pós-traducional de interesse, foi realizada pelo Serviço Proteômico do Núdulo UAM (Universidade Autônoma de Madrid) da Red Cardiovascular, englobado dentro do Serviço Proteômico do Centro de Biologia Molecular Severo Ochoa (http://www.cbm.uam.es/mkfactory.esdomain/webs/CBMSO/plt_Servicio_Pagina.aspx?IdServicio=29&IdObjeto=118).

As amostras foram separadas eletroforéticamente (SDS-PAGE a 8%) e o gel é tingido, prestando-se especial atenção nas etapas de manipulação, para minimizar as contaminações com queratinas, que são proteínas muito abundantes no entorno. As faixas a analisar são recortadas do gel de poliacrilamida e são submetidas à digestão triptica (tripsina da Promega).

A mistura de peptídeos tripticos é analisada por MALDI-TOF: (Sigla do Inglês: Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time of Flight, modelo Autoflex, da Broker). Em resumo, as espécies peptídicas são adsorvidas por cristalização em uma matriz, após o que, e mediante a incidência de pulsos curtos de um laser, são desunidas na forma protonada. Este método de ionização da amostra está acoplado a um analisador de tempo de saque. Com efeito, os peptídeos monocarregados adquirem uma energia cinética proporcional à sua massa e "são sacados" por um tubo vazio até se chocar com o detector. Uma pequena fração (0,5 μ L) do

sobrenadante da digestão foi analisada diretamente em um espectrômetro de massa, do tipo MALDI-TOF, modelo Autoflex, da Bruker, equipado com refletor, empregando DHB (ácido 2,5-diidroxibenzóico) como matriz e uma superfície Anchor-Chip (Bruker) como porta-amostras. O espectro obtido corresponde finalmente aos peptídeos separados em função da relação massa-carga (m/z). Os espectros de fragmentação de GST-p38 e de GST-p38 fosforilada por GRK2 foram quantificados e se encontrou um peptídeo candidato.

Para corroborar neste aspecto, as amostras foram submetidas a outro tipo de análise espectrométrica, que permite a obtenção de espectros de fragmentação (MS/MS) de peptídeos individuais: ionização por eletrospray, acoplada à marcha iônica (ElectroSpray/Mass Spectrometry - Ionic Tramp ES/MS-IT, modelo Deca-XP, da Thermo-Finnigan, San José, Califórnia, USA). Antes da ionização e pelo fato desta poder ser efetuada em um capilar, quer dizer, com amostras líquidas, o peptídeo candidato foi separado (previamente "suspeito" pelo método de MALDI-TOF), mediante RP-HPLC (cromatografia líquida de alta pressão em fase reversa). Foi empregada uma coluna de 180 μ m de diâmetro interno (0,18 mm x 150 mm, BioBasic 18 RP Column, da Thermo-Keystone) em um fluxo de 1,5 μ L/m em modo de micro-spray com uma interface "metal needle-kit" (Thermo-Finnigan), com um gradiente de 5% a 60% de solvente B, para a eluição (90 minutos) dos peptídeos. A cromatografia está acoplada ao espectrômetro de massa de marcha iônica. Neste processo de fragmentação, as amostras são submetidas a um intenso campo elétrico, tendo

como resultado a geração de gotas carregadas, que, após evaporação do solvente, acabam emitindo ions correspondentes aos peptídeos da mistura da amostra. Estes podem estar multiprotonados, preferivelmente, no extremo terminal-N e nos
5 resíduos de histidina, arginina e lisina. O analisador de marcha iônica gera um campo elétrico tridimensional, que permite separar os ions procedentes da ionização por eletrospray. Assim, finalmente, se obtém um espectro de fragmentação ou espectro MS/MS que, ao trabalhar "em modo
10 SIM" (Monitoração de Ions Isolados), se limita ao espectro de fragmentação do peptídeo candidato. As amostras serão analisadas em um modo de alta sensibilidade ou modo "SIM", monitorando-se as seguintes m/z: 937,51 e 977,51. Após realizar uma suposição teórica das séries de fragmentação do
15 peptídeo, "supostamente" fosforilado, se atribuem vários fragmentos das séries "b e y" ao espectro obtido.

Imuno-protocolos

Na Tabela I são apresentados os anticorpos primários utilizados.

20 *Imunodeteção após eletroforese ("Imunoblot ou Western blot")*

As amostras para a análise (proteínas purificadas, lisados ou frações subcelulares, etc.) são decompostas em géis de poliacrilamida-SDS, junto com os padrões de peso molecular comercial (Bio-Rad). As proteínas assim separadas
25 se transferem para um filtro de nitrocelulose (Transblot, da Bio-Rad) mediante transferência líquida em tampão de carbonato (Na_2CO_3 3 mM, NaHCO_3 10 mM, 20% metanol, pH~10) durante 75 minutos (a 50 V, no caso de géis de 12 x 14 cm,

utilizando Trans-Blot Cell, da Bio-Rad, ou então a 30 V, durante 120 minutos). Após tingir a membrana de nitrocelulose com roxo Ponceau, se incubava durante toda a noite à temperatura de 4°C em um meio TBS (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM) suplementado com leite em pó desnatado (Molico) a 5% ou BSA a 5%, com o objetivo de bloquear os possíveis sítios de união inespecífica. Após descartar o meio de bloqueio, a membrana é colocada em contacto com o anticorpo correspondente, diluído (Tabela I) em TBS-BSA 1%. Antes de se incubar com o segundo anticorpo (anti-imunoglobulina de coelho unido a peroxidase, quando o primeiro anticorpo for policlonal, e anti-imunoglobulina de camundongo para os anticorpos monoclonais; ambos da Nordic Immunology) diluído 1:50.000, se lava a membrana três vezes (3 x 10 minutos) com TBS-Tween 20, a 0,15%. Finalmente, para a revelação se utiliza um método quimioluminescente, em que a peroxidase catalisa a oxidação do substrato luminol na presença de H₂O₂ (ECL, Amersham). A quantificação se realiza por densitometria a laser das películas expostas (Molecular Dynamics 300A, Computing Densitometer).

Foi gerado soro anti-fosfo-Thr123p38 policlonal em coelhos, procedente da Pacific Immunology, utilizando o peptídeo QKLpTDDHVQFLIYC, da proteína p38 α de camundongo, como imunógeno, e, posteriormente, se purificou mediante duas etapas em série, através de colunas de afinidade de peptídeo e anti-fosfo peptídeo. O anticorpo anti-His foi adquirido da Sigma.

Determinação da atividade de p38 e de ERK

A determinação do grau de atividade de p38 e de ERK transfectadas, promovida pelos diferentes estímulos ativadores se realizou por um método de imunodeteção. Foram
5 utilizados anticorpos específicos que reagem somente com a forma fosforilada e ativada destas cinases (anti-fosfop38 e anti-fosfoERKs, respectivamente (ver descrição na tabela de anticorpos)).

As células HEK293, são geralmente submetidas à
10 abstinência (meio sem soro) de duração variável: de 2 horas, no caso da p38, e toda a noite, no caso da ERK, se estimularam e, após o processamento dos lisados celulares, se efetivou a imunodeteção das fosfoproteínas com os anticorpos fosfo-específicos dos segmentos de ativação de ambas as
15 proteínas. Após a revelação desta primeira imunodeteção, os complexos imunes foram despreendidos com o tampão: SDS a 2%, β -mercaptoetanol 100 mM, Tris HCl 62,5 mM, pH 6,7 e se procedeu à reincubação das membranas com os anticorpos anti-p38 ou anti-ERK totais. A quantificação das bandas se
20 realizou em um densitômetro a laser. Em todos os casos, os valores obtidos para as bandas detectadas com o anticorpo anti-fosfo-proteína se normalizaram em relação à quantidade total de p38 ou ERK expressas nas células. Desta forma se representa o aumento de estimulação das diferentes cinases
25 com relação às condições basais. Em alguns casos, entretanto, dado o risco de interferência do primeiro revelado no segundo, se avaliou a ativação mediante densitometria de duas membranas diferentes, reveladas separadamente, uma com o

anticorpo fosfo-específico e a outra com o anticorpo contra a proteína total.

Imunoprecipitação

As amostras ou lisados celulares totais irão ser submetidos à imunoprecipitação se diluem em diferentes tampões suplementados com inibidores de proteases (STI - Soybean Tripsin Inhibitor) e benzamidina 100 µg/mL, PMSF 200 µg/mL e aprotinina 10 µg/mL). Os tampões irão variar conforme o anticorpo utilizado em cada caso, como se especifica em seguida. Em todos os casos, após deixar a lise transcorrer durante um mínimo de 1 hora a 4°C, em agitação, as amostras serão centrifugadas (24000 xg) e se tomarão frações (aproximadamente de 10%) para confirmar a expressão de proteínas específicas. À amostra restante foi adicionado BSA (500 µg por p60) e a quantidade de anticorpo correspondente em cada caso. Todas as imunoprecipitações se desenvolveram à temperatura de 4°C durante toda a noite. No dia seguinte, se adicionaram 30 µL a 50% de proteína A-Sepharose (Sigma) ou a proteína G-Sepharose (Zymed), conforme o anticorpo tenha sido policlonal ou monoclonal, respectivamente, e se incubou a 4°C durante mais 90 minutos. Esta etapa foi omitida quando os anticorpos estavam covalentemente unidos às resinas, em cujo caso se adicionou 5-10 µL da "imuno-resina". Se recolheram os complexos imunes por centrifugação e, após descartar o sobrenadante, se lavaram 3-5 vezes (800 xg, 5 minutos) com 10-15 mL de um tampão de lavagem.

Quando o destino dos imunoprecipitados eram reações de fosforilação, estas se lavaram mais duas vezes (2 x 10-15 mL) com o tampão de incubação da mesma, sem ATP.

5 As proteínas imunoprecipitadas foram novamente suspensas em um tampão de ruptura de eletroforese e, geralmente, foram fervidas durante 5 minutos, para depois introduzir toda a amostra em um gel de poliacrilamida-SDS, de percentagem adequada.

10 Tampão RIPA (Sigla do Inglês: "radioimmunoprecipitation assay")

Este tampão de solubilização foi amplamente utilizado, especialmente nas imunoprecipitações das GRKs: NaCl 300 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, Nonidet P-40 2%, ácido desoxicólico 1%, e SDS 0,2%.

15 Tampão de Imunoprecipitação "M2 anti-flag"

Para as imunoprecipitações com o anticorpo M2 anti-flag, as células foram colhidas em: tampão de fosfato sódico 10 mM, pH 7,4 (preparado a partir de soluções matriz de NaHPO₄ e NaH₂PO₄ 0,1 M), NaCl 150 mM e 1% de n-dodecil-β-D-maldósido. Após a lise, se completa até 300 µL (por placa p60) com o tampão salino composto de Tris-HCl 20 mM; NaCl 150 mM e inibidores de protease. Finalmente, os lavados dos imunoprecipitados são feitos no tampão composto por: Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, MgCl₂ 20 mM, 1% Tritón X-100, EDTA 1 mM, MgCl₂ 1 mM, NaF 15 mM, Pirofosfato 20 mM.

25

Experimentos de Precipitação ("pull-down")

As proteínas GST, GST-p38wt, GST-p38T123A e GST-p38T123D foram expressas em bactérias e isoladas utilizando Glutathiona-Sefarose 4B (GE-Amersham), conforme os procedimentos convencionais (Murga, C. et al., "High affinity
 5 *binding of beta-adrenergic receptor kinase to microsomal membranes; Modulation of the activity of bound kinase by heterotrimeric G protein activation*"; J. Biol. Chem. 271, 985-994 (1996)). His-MAPKAPK2 foi purificado utilizando uma resina Probond (Invitrogen), seguindo as indicações do
 10 fabricante. MKK6_{CAM} foi comprado da Upstate Biotech. A quantidade de proteínas detalhada na legenda de cada figura se incubou em um tampão de unção (Tris 25 mM, pH 7,5, NaCl 0,25 M, MgCl₂ 10 mM, NaF 5 mM e 0,5% de BSA) durante 30 minutos a 30°C, com agitação constante. Se adicionou ATP (50
 15 µM) para precipitar MAPKAPK2. Os precipitados foram lavados 3 vezes (10 mL) com o mesmo tampão contendo 0,5% de Triton X100. Os complexos precipitados foram decompostos mediante SDS-PAGE e foram revelados mediante o procedimento de Western Blot.

20 Ensaaios de Fosforilação

Fosforilação in vitro de Proteínas Recombinantes

Fosforilação de p38 por GRK2

Foram incubadas GST-p38 e GRK2 recombinantes (ambas eqüimolares, a 25-150 nM, salvo nos experimentos de cálculo
 25 dos parâmetros cinéticos e nos que se especificam) no tampão de fosforilação de p38 (Hepes 25 mM, pH 7,5, acetato de magnésio 10 mM, ATP 50 µM, [γ-32P] ATP 2000-3000 cpm/pmol) em um volume final de 40 µL. Normalmente, as reações de

fosforilação se deixam transcorrer durante 30 minutos a uma temperatura de 30°C. No caso das eletroforeses bidimensionais ou das amostras destinadas à seqüenciação proteômica, a reação perdura até 1 ou 2 horas.

5 Os compostos de heparina e SB203580 (Calbiochem), inibidores de GRK2 e de p38, respectivamente, se utilizaram em concentrações de dez vezes da IC₅₀, para assegurar a completa inibição de caminhos das cinases, isto é, a 1,5 µM para a heparina e a 0,5 µM para o SB. Os substratos
10 empregados foram MBP (14 µg por ponto) ou PHAS-I, a uma concentração final de 25 ng/µL para p38 e caseína (7,5 µg por ponto) para GRK2.

O processamento das amostras após interrupção da fosforilação é idêntico aos casos anteriores, salvo que a
15 decomposição das proteínas se faz em um gel (SDS-PAGE) a 8%.

As proteínas de fusão, a GST, p38α, Mxi2, Mxi2Δ17 e 280-360 p38 (0,5 µg de cada uma delas) se incubaram com GRK2 recombinante (200 nM), em um tampão de fosforilação (Hepes 25 mM, pH 7,5, acetato de magnésio 10 mM, ATP 50 µM, [γ-³²P] ATP
20 2000-3000 cpm/pmol) durante 30 minutos, a uma temperatura de 30°C. A heparina foi incluída (150 nM) como inibidor específico de GRK2. As reações foram interrompidas através da adição de um tampão de ruptura com SDS. As amostras foram decompostas em SDS-PAGE a 8%. Com o objetivo de garantir a
25 inclusão de quantidades idênticas de proteína, primeiro se visualizaram as mesmas no gel por tingimento com Azul de Coomassie. Em seguida, o gel foi seco e se detectou a radioatividade incorporada nas proteínas (³²P).

Os mutantes pontuais de p38 no hipotético sítio de fosforilação por GRK2 (T123) foram gerados e purificados como descrito anteriormente e foram submetidos à fosforilação por GRK2 no tampão de fosforilação de p38 (Hepes 25 mM, pH 7,5, acetato de magnésio 10 mM, ATP 50 μ M, [γ - ^{32} P] ATP 2000-3000 cpm/pmol), em um volume final de 40 μ L. A concentração foi variada em relação à (10-80 nM) de GRK2 e das isoformas de p38, tal como se resume nas Figuras.

Fosforilação de p38 por MKK6_{CAM}

Foram realizados ensaios de fosforilação (Hepes 25 mM, pH 7,5, acetato de magnésio 10 mM, NaF 15 mM, ATP 50 μ M e [γ - ^{32} P]ATP 1000-2000 cpm/pmol) *in vitro*, com as proteínas de fusão GST-p38 WT, GST-p38 T123A e GST-p38 T123D (150 nM) como substratos de fosforilação de MKK6_{CAM} (40 ng) recombinante (Upstate Biotechnology). Como nos casos anteriores, as reações se deixaram transcorrer a uma temperatura de 30°C durante 30 minutos e se separaram as proteínas em géis SDS-PAGE a 8%. Com o objetivo de garantir a inclusão nos ensaios de quantidades idênticas de proteínas p38, as mesmas foram visualizadas nos géis por tingimento com Azul de Coomassie. Em seguida, se determinou a radioatividade incorporada em cada isoforma de p38.

Fosforilação do Peptídeo APRTPGGRR por p38

A partir de células HEK293, são imunoprecipitadas Flag-p38alpha com M2Anti-Flag-agarose. Os imunoprecipitados são lavados três vezes com 10-15 mL de tampão M2 e duas vezes com outros tantos volumes de tampão equilibrado da fosforilação (NaF 15 mM, Hepes 25 mM. pH 7,5 e acetato de

magnésio 10 mM). Na última lavagem, novamente se suspendem os complexos imunes-agarose em 1 mL de tampão e se separa 10% de cada ponto (100 µL) para controlar a imunoprecipitação de Flag-p38. Com a Flag-p38 imunoprecipitada restante se
5 efetivam ensaios de cinase, utilizando como substrato o peptídeo APRTPGGRR. As reações se realizaram em um volume final de 25 µL, em um tampão de fosforilação composto por Hepes 25 mM, pH 7,5, acetato de magnésio 10 mM, NaF 15 mM, ATP 50 µM e [γ -³²P]ATP 500-1000 cpm/pmol e 1-2 mM do peptídeo
10 substrato. Quando se especifica, se adiciona SB203580 à reação *in vitro*, a uma concentração final de 0,5 µM. Se deixa transcorrer a fosforilação durante 30 minutos a uma temperatura de 30°C, após o que se interrompe mediante adição de 15 µL de TCA a 30%. As proteínas são precipitadas por
15 centrifugação (25.000 xg, 15 minutos, 4°C) e se recupera, de cada reação, o sobrenadante que contém o peptídeo fosforilado. Recortes quadrados (1 cm x 1 cm) de papel Whatman P81 são impregnados com o peptídeo em solução. Depois, são deixados secar e são lavados de forma abundante
20 com ácido fosfórico 75 mM e, finalmente, se quantifica a radioatividade incorporada pelo peptídeo adsorvido, através de quantificação da radiação de Cerenkov. A atividade da p38 sobre este peptídeo se refere, em cada caso, à radioatividade basal (o fundo) que se detecta nos pontos correspondentes
25 somente ao peptídeo.

Fosforilação de substratos de ATF2 e MEF2A por p38

As formas de ATF2 e MEF2A unidas à GST foram utilizadas para comprovar a atividade catalítica de GST-p38.

Na maioria dos casos, se empregaram 2 µg de GST-ATF2 ou GST-MEF2A, de produção própria. As condições de fosforilação são as mesmas que as expostas nos casos anteriores. Não obstante, em outras ocasiões, conforme descrito de forma pertinente nas Figuras, se empregaram 0,2 µg de substrato e se deixou transcorrer a reação de fosforilação somente durante 15 minutos.

Comparações de Sequências

Alinhamentos dos Ortólogos e Isoformas de p38

Os alinhamentos múltiplos que são apresentados foram feitos com o programa ClustalX (<http://www-igbmc.u-strasbg.fr/BioInfo/ClustalX/>) e ajustados manualmente mediante a introdução de descontinuidades (gaps) pelo Dr. Perdiguero, do Centro Nacional de Investigações Oncológicas de Madrid.

Tratamento Matemático e Estadístico dos Dados

Os experimentos se realizaram, no mínimo, duas vezes e, em geral, os pontos se duplicaram ou triplicaram. Os dados são expressos por meio de desvio padrão da média ($\pm$ SEM).

Para os cálculos das constantes cinéticas das reações enzimáticas, se assumiu o comportamento de Michaelis-Menten das cinases. Os gráficos foram feitos com o programa "Kaleidagraph", dotado de um algoritmo capaz de deduzir os parâmetros cinéticos: constante de Michaelis-Menten (Km) e velocidade máxima ($V_{max} = V_o$ (nmol de PO_4^{3-} incorporado.mg de enzima⁻¹minuto⁻¹).

A análise estatística se realizou mediante o "Teste T de Student bilateral" (de duas colas) e n-1 graus de liberdade, onde a hipótese nula é que não existe diferença significativa entre a situação ou condição cuja significância estatística queremos determinar e a situação controle ou basal. O valor correspondente à probabilidade do cumprimento da hipótese nula (p) obtido em cada caso variou de $p < 0,001$ ou $p < 0,0001$, como se apresenta detalhado nas Figuras.

II. RESULTADOS

10 Interrelações funcionais entre GRK2 e p38MAPK.

p38 se fosforila por GRK2

Os pesquisadores da presente invenção estudaram os mecanismos que regem a modulação da atividade de GRK2 e sua expressão por MAPK, dada à implicação preponderante de GRK2 e seus receptores substratos, tanto na fisiologia cardíaca, como na etiologia das doenças cardiovasculares, como hipertensão, deficiência cardíaca congestiva ou angina do peito; e dada à conhecida importância do módulo de p38 MAPK no desenvolvimento do miocárdio e sua posterior funcionalidade. Existe uma correlação inversa entre os níveis aumentados de GRK2 e a inativação da p38 na deficiência cardíaca congestiva. Além disso, os níveis de GRK2 são diminuídos em doenças de índole inflamatória, como por exemplo, a artrite reumatóide.

25 Por todas estas evidências, se decidiu proceder o estudo das possíveis interações entre GRK2 e p38. A primeira aproximação experimental constou de ensaios de fosforilação de ambas as proteínas. Na Figura 1, quadro **A**, se mostra que a

GRK2 fosforila a p38. Para descartar a possibilidade de que se tratou de uma autofosforilação de p38 promovida de alguma maneira pela presença de GRK2, se incluiu nos ensaios de fosforilação a heparina (16 ng/ μ L), amplamente empregada como inibidor de GRK2, tendo antes se certificado que que esta não afetar  a atividade catalítica de p38. Neste mesmo quadro se demonstra que a inibição da atividade catalítica de GRK2 leva a uma menor fosforilação de p38, pelo que diretamente, a atividade Ser/Thr cinase de GRK2 é a responsável da marca radioativa incorporada em GST-p38. Estes experimentos foram completados com controles negativos de fosforilação de GST por GRK2 e com o escrutínio da zona de união entre a por  o GST e a ORF de p38.

Uma recente publicação descreve a autofosforilação da p38 estimulada por sua interação com TAB1 e para demonstrar que este não é o caso da invenção, se incluiu o composto de piridinilimidazol SB203580, inibidor competitivo, pelo ATP específico da p38, em ensaios de fosforilação. No quadro B da Figura 1, se mostra o efeito do inibidor SB203580 sobre a atividade catalítica da p38, sobre um substrato genérico desta como MBP (proteína básica de mielina). Dado que a atividade basal da p38   é insignificante, não se observa uma grande fosforilação da MBP e ainda assim, se detecta a inibição por SB203580. Os dois sulcos seguintes informam que o piridinilimidazol não afeta a atividade cinase de GRK2. Finalmente, as duas últimas trilhas da autoradiografia mostram que não é a capacidade autofosforilativa da p38 que se potencia na presença de GRK2. A conclusão final

destes experimentos descritos é que a p38 se fosforila *in vitro* por GRK2.

Para comprovar que a fosforilação não estava tendo lugar nos resíduos fosforiláveis pelas cinases (MAPKK) 5 ativadoras de p3, como MKK3 e MKK6, as reações de fosforilação se realizaram a frio (quer dizer, sem [γ - ^{32} P]-ATP) e a imunodeteção empregando o anticorpo fosfoespecífico de Anti-P-p38 (Figura 1, seção C). Este anticorpo reconhece os epítomos fosforilados na sequência da treonina 180 ou na 10 tirosina 182 da p38. Como se observa no quadro inferior, apenas a presença da proteína recombinante MKK6 dá lugar ao reconhecimento de fosfo-p38 pelo mencionado anticorpo. No quadro superior, são reveladas as proteínas totais com um anticorpo anti-GRK2 que reconhece a GST (para ver GST-p38). 15 Estes experimentos demonstram que GRK2 fosforila a p38 em um resíduo diferente da T180.

GRK2 Fosforila a p38 de Forma Rápida e com Alta Afinidade

O estudo dos parâmetros cinéticos da reação mostra que estes são indicativos da possibilidade de que a reação 20 tenha lugar *in vivo*. A Figura 1 versa sobre a caracterização cinética da fosforilação. Inicialmente, se realizaram experimentos de curso temporal (quadro D), nos quais se comprova que a fosforilação é rapidamente detectada (aos 5 minutos), estimando-se um tempo médio de 15 minutos para 25 alcançar 50% da fosforilação máxima. GRK2 é uma cinase eclética, capaz de fosforilar numerosos substratos não particulados, como tubulinas, sinucleínas, e fosducinas. A afinidade que GRK2 exhibe por seus substratos é variável.

Assim, a K_m para as sinucleínas e para as β -tubulinas, dependendo dos subtipos de ambas, está em torno de 1-2 μM . No caso da p38, o valor da $K_m=80$ nM (ver tabela da Figura 1, quadro E) está mais próximo ao descrito para outros substratos fisiológicos de GRK2, como a fosducina e a proteína similar à fosducina (PhD e PhLP, K_m entre 40-100 nM ou os receptores m_2 -muscarínicos. Os valores de estequiometria achados em pelo menos três quantificações por Cerenkov, oscilaram entre 0,4-0,8 mol P_i /mol p38, o que mostra a existência de um sítio de fosforilação por GRK2.

GRK2 e p38 Interação Dependente do Agonista.

A GRK2 interage com diversas proteínas implicadas tanto na sinalização como no tráfego celular. Assim, a GRK2 interage com $G\alpha_q$, $G\beta\gamma$, $PI3K\alpha$ e γ , clatrina, GIT (GRK Interacting protein) e caveolina, além de outras moléculas, de cuja interação resulta a modulação de sua atividade (como fosfolipídeos, Ca^{2+} -calmodulina, cinases, etc.). A GRK2 é uma cinase modular e sua atividade catalítica está reprimida por interações intramoleculares entre seus diferentes domínios. Dessa forma, para ver sua capacidade de associação com a p38, se promoveu a aquisição de sua conformação ativa mediante a estimulação de receptores β_2AR , sendo a ativação da p38, por causa disso, escassa. Foram empregadas células HEK293, transfectadas transitoriamente com os plasmídeos codificantes do receptor β_2AR , Flag-p38 e GRK2. Após submeter as células a uma abstinência noturna, foi feita a estimulação com o agonista isoproterenol, a uma concentração de 10 μM . Nestas condições, a imunoprecipitação da p38 traz consigo a detecção

da cinase GRK2 nos imunoprecipitados, e este efeito se observa potenciado por estimulação do receptor β_2 AR (Figura 2, quadro A). Tal como se mostra nos diferentes detalhes separados que compõem a Figura 2, a máxima associação se obtém aos cinco minutos de exposição ao isoproterenol. Por outro lado, se observa que a associação entre ambas as cinases não é mandatória da estimulação do β_2 AR, posto que se co-imunoprecipitam também em condições basais (0 minuto). No quadro **A**, se incluem os controles de arraste inespecífico (Cneg) da imunoprecipitação anti-Flag, e a constatação de que outro estímulo notório de p38 (NaCl) não desencadeia esta associação. Finalmente, se apresentam os níveis de ativação da p38 sob estas condições. Estes revelam, primeiro, que a ativação da p38 por isoproterenol não é muito forte e, segundo, que a ativação é tanto menor quanto mais se une à GRK2.

Foram realizados experimentos de imunoprecipitação "recíproca", quer dizer, no mesmo sistema celular, porém, empregando anticorpos anti-GRK2 para detectar a p38 nos imunoprecipitados. No detalhe separado B se observou que a p38 e a GRK2 interagem de maneira dependente de agonista (5 minutos de isoproterenol). Foi comprovado, ver a secção **C**, que diminuindo a concentração de GRK2, se continuava permutando unida à Flag-p38. De novo, se encontrou uma união potenciada aos 5 minutos de estimulação pelo agonista do β_2 AR.

Na secção D, se examinou a capacidade da p38 de co-imunoprecipitar-se com o mutante catalíticamente inativo de

GRK2, K220R. Pode ser observado como a níveis de expressão similares de GRK2-K220R e de GRK2-WT (ver o terceiro quadro), o mutante não apenas é capaz de associar-se em maior grau a p38, como também sua interação parece independente do estímulo β_2 AR.

A Sobreexpressão de GRK2 Reduz a Capacidade da p38 de ser Ativada pela cinase MKK6.

Foi colocada à prova a interface entre a p38 e uma de suas ativadoras mais comuns, a MKK6. Com o objetivo de delimitar e cercar possíveis ativações cruzadas, se empregou o mutante constitutivamente ativo desta MAPKK, o mutante MKK6CAM. Na Figura 3, no detalhe separado A são incluídos uns quadros representativos de experimentos de transfecção transitória em células HEK293, nos quais se sobreexpresam doses crescentes de plasmídeo pCDNA3-GRK2 (completando sempre a quantidade de ADN total com pCDNA3-GFP), junto com Flag-p38 e MKK6CAM. Se observa que a ativação da p38 dependente de MKK6CAM diminuía mais, quanto mais quantidade de GRK2 se expressava nas células. A sobreexpressão permitia assegurar a avaliação do resultado das mesmas células. Certamente, ao tomar somente a imunodeteção de Flag-p38, se selecionam as células transfectadas (e, portanto, submetidas aos efeitos de GRK2 e MKK6CAM) e se deixam dado os efeitos do resto. Por outro lado, nestas células resultava difícil se detectar em todas as ocasiões a p38 endógena. Foram utilizadas algumas células que expressam quantidades fixas de GRK2, duas populações de HEK293 que expressam estavelmente diferentes quantidades de GRK2, introduzindo transitoriamente os ADNs

que codificam Flag-38 e MKK6CAM (ou seu controle). Os resultados são apresentados na seção B e mostram que, neste sistema, de novo se observa uma diminuição da capacidade da p38 de ser ativada por MKK6CAM.

5 A Sobreexpressão de GRK2 Reduz a Atividade Cinase da p38 sobre um Peptídeo-Substrato

Em seguida, foi realizado um teste da atividade catalítica de uma p38 submetida tanto ao estímulo de seu ativador MKK6CAM, como ao de doses crescentes de GRK2 sobre
10 um substrato exógeno. Para isto, as células HEK293 foram deixadas em um meio com soro durante os dias de espera requeridos para que tenha lugar a sobreexpressão ótima; a consequência disso é que a GRK2 podia estar sendo estimulada por fatores presentes no soro, como LPA, etc. cujos sinais
15 são provenientes dos GPCRs. As células são recolhidas e a partir da imunoprecipitação das mesmas, a cinase Flag-p38 é reconhecida pelo anticorpo monoclonal anti-flag, unido a uma resina de agarose. Em cada ponto (sempre em duplicata), se reservou uma fração do imunoprecipitado para comprovar a
20 quantidade do mesmo por imunodeteção, (ver o quadro inserido no detalhe separado B da Figura 4). Os imunoprecipitados, lavados repetidas vezes, são testados então em uma reação de fosforilação sobre o substrato peptídico APR. Este peptídeo, denominado assim pelos três primeiros aminoácidos de sua
25 sequência, corresponde aos resíduos 94 a 102 de MBP e foram utilizados anteriormente para testar a atividade de MAPK, pelo fato de possuírem o consenso de fosforilação destas enzimas. Na seção **A** se incluem os controles de lisados que

indicam tanto a quantidade da expressão de GRK2 como o estado de ativação que a p38 alcança nessas condições. A análise do detalhe separado B permite emitir diferentes conclusões. A primeira é que a atividade catalítica da p38 imunoprecipitada se correlaciona, em cada ponto, com seu respectivo estado de ativação, revelado com o anticorpo anti-fosfo p38 em **A** e que se caracteriza por ser atenuada pela sobreexpressão de GRK2. A segunda é que, Flag-p38 submetida a estímulos presentes no soro do meio de cultura exibe também uma atividade catalítica desprezível em relação ao peptídeo-substrato APR. Estes níveis foram tomados como referência para a quantificação gráfica. Cabe destacar, finalmente, que a fosforilação do peptídeo APR era estritamente dependente da p38, dado a sua ostensiva inibição por SB 203580.

15 A redução dos Níveis de GRK2 Repercute em uma maior Ativação da p38 por MKK6_{CAM}.

Com o objetivo de avaliar os resultados anteriores, os experimentos recíprocos são analisados, quer dizer, se a GRK2 está influenciando negativamente na atuação da p38. Independentemente de sua atividade cinase sobre GPCRs, a redução dos níveis de GRK2 deveria permitir um maior sinal anti-fosfo-p38 no mesmo contexto, a saber, por MKK6_{CAM}. Foram empregadas células HEK293 para realizar transfecções transitórias de quantidades crescentes de ADN anti-sentido (AS) contra GRK2 (Figura 5 A, esquerda) cujo controle em paralelo são as mesmas quantidades do plasmídeo que codifica a GFP (C). Na Figura se apresentam os quadros de um experimento representativo. Nos níveis de GRK2 como média, se

obtem de 20-50% de diminucao, em funcao da dosagem de ADN empregada. Estes dados corroboram o inferido dos experimentos anteriores de sobreexpressao de GRK2, a saber, que com uma menor quantidade de GRK2 nas celulas, a p38 e capaz de sofrer
5 uma maior ativacao por MKK6_{CAM}. Se junta uma estimativa grafica representativa deste efeito (Figura 5 A, direita). Os niveis de ativacao da p38 (anti-fosfo-p38/anti-p38) se referem a sua ativacao basal, em cada situacao: tanto de maior reducao de GRK2 (AS), como de GFP (C, controle).

10 Nestes mesmos experimentos se avalia a ativacao de Flag-p38 em condicoes basais. A ativacao em repouso, quer dizer, sem MKK6_{CAM}, da p38 α isolada pode ser escassa. E possivel se chegar a determinacao por imunodeteccao, deixando amplas exposicoes durante o revelado quimioluminescente
15 (referido como "sobreexposicao" na Figura 5, detalhe separado B). Assim, tal como se pode observar, o perfil de ativacao da p38 em condicoes de nao co-transfeccao de MKK6_{CAM} emula o da p38 submetida a ativacao deste mutante constitutivamente ativo. Conforme a eliminacao de uma das variaveis, a saber, a
20 sobreexpressao de MKK6_{CAM} que redundava numa inconstante ativacao da p38, os dados de ativacao basal da p38 influenciados pela presenca de maiores ou menores niveis de GRK2 total sao mais quantitativos. Assim, sao mostrados na parte inferior da Figura os dados provenientes da quantificacao da ativacao de
25 Flag-p38 α sem MKK6_{CAM}. Condicionando em cada ponto de ADN anti-sentido a ativacao da p38 ao controle paralelo de GFP, se obtem uma acentuada tendencia da p38 ser melhor substrato de seus ativadores celulares, quanto menor for a presenca de

GRK2 (Figura 5, gráfico do detalhe separado B). A significância indicada mediante um asterisco se refere, portanto, que no teste estatístico T de Student, se obteve um valor de $p < 0,05$ em cada ponto de ADN anti-sentido comparado com seu respectivo controle de GFP.

A Localização do Sítio de Fosforilação por GRK2 em p38 mediante Construções Truncadas Revela a Implicação de Determinantes Estruturais Terciários na Interação p38-GRK2.

Mxi2 é uma variante de processamento alternativo de p38, cujo terminal-C difere do da p38 α . Mxi2 é uma proteína inicialmente isolada em experimentos de duplo híbrido, por interrelacionamento com a proteína Max. Dos aminoácidos 1 a 280 é idêntica a p38 α , porém ostenta um terminal-C de 17 restos completamente diferentes (ver esquemas na Figura 6).

Foram empregados além de Mxi2, o mutante truncado Mxi Δ 17, (que corresponde exatamente a p38 α Δ 80) para determinar se algumas das serinas ou treoninas do terminal-C de p38 eram as dianas de fosforilação de GRK2. Foram obtidas as proteínas de fusão, por métodos padrões de purificação de proteínas e se testou, comparando com p38 α , sua capacidade de ser substrato de GRK2 (Figura 6, detalhe separado A), com quantidades comparáveis de p38 α , Mxi2 e Mxi Δ 17, estas duas últimas não sendo fosforiladas por GRK2. Além disso, os projetos de fosforilação que se distinguem em Mxi2 e Mxi Δ 17 são mais tênues que os correspondentes à fosforilação de p38 α na presença de heparina. Na Figura, se incluem também controles de autofosforilação de cada uma destas cinases.

A partir desses resultados se determinou a geração e purificação dos 80 últimos aminoácidos da sequência de p38 α , fundidos, novamente à GST. Esta construção se elaborou mediante o protocolo de mutagênese de QuickChange, e posterior inclusão do fragmento de ADN que codificava o GST-280-360p38 α no sistema polivalente de Gateway. Surpreendentemente, após purificar a proteína de fusão e testá-la em relação à GRK2, não se obteve rastro algum de fosforilação. Estes resultados são apresentados no detalhe separado B da Figura 6. Em tal figura, se observa como com uma quantidade muito maior de GST-280-360 p38 α que de GST-Mxi Δ 17 e de GST-p38 α (WB anti-GST, quadro inferior), não se obtém nenhuma fosforilação das duas primeiras e sim da última.

A partir destes dados, se infere que se necessitam determinantes estruturais presentes na proteína p38 α WT, e ausentes nas suas partes truncadas e terminais-N e C, para o reconhecimento e posterior fosforilação por GRK2.

GRK2 Fosforila a p38 em um Único Resíduo

Após constatar a inadequação das aproximações anteriores para determinar o resíduo fosforilado por GRK2, se buscou o resíduo por técnicas proteômicas. Para se certificar que a estequiometria calculada correspondia a um único sítio de fosforilação, os ensaios de fosforilação de GRK2 e p38 sofreram resolução mediante eletroforeses bidimensionais, cujo resultado se mostra no detalhe separado A da Figura 7. Na primeira eletroforese se aproveita a troca do ponto isoelétrico das proteínas em consequência da incorporação do

fosforilo, enquanto na segunda, estas se separam em função de sua massa, conforme o método de rotina SDS-PAGE. Apenas no quadro correspondente à fosforilação, na presença de GRK2, se pode observar uma intensa banda radioativa correspondente à GST-p38. Desse modo, se distinguem neste quadro traços difusos de ^{32}P , indicativos da autofosforilação múltipla de GRK2.

No Serviço Proteômico do Nodo UAM da Red Cardiovascular, englobado dentro do Serviço Proteômica do Centro de Biologia Molecular Severo Ochoa (http://www.cbm.uam.es/mkfactory.esdomain/webs/CBMSO/plt_Servicio_Pagina.aspx?IdServicio=29&IdObjeto=118), se identificou a modificação pós-traducional. Quantificando os espectros de fragmentação de GST-p38 e de GST-p38 fosforilada por GRK2, após a digestão triptica e espectrometria de massa pelo método de MALDI-TOF, se observou a existência, na amostra fosforilada, de um peptídeo cuja massa podia corresponder à de outro peptídeo, detectado em caminhos de amostras, de mais de 80 Da. Com efeito, se percebe a presença minoritária, porém exclusiva, da amostra submetida à fosforilação por GRK2, deste peptídeo, modificado pós-traducionalmente com um grupo fosfato ($1954,330=1874,326+80$). Se inclui nesta Figura (seção B da Figura 7) a ampliação da zona do espectro, na qual se detectaram rastros deste suposto portador da fosforilação, proporcionando-se a Figura inteira no item separado de Materiais e Métodos. A análise detalhada do espectro de massa permitiu a identificação do peptídeo candidato, fruto da digestão com tripsina: LTDDHVQFLIYQILR.

Para corroborar este aspecto, se separou o peptídeo candidato por HPLC e se realizou uma análise espectrométrica mais fina: ionização por eletrospray acoplada à marcha iônica (ES/MS-IT), monitorando isoladamente o íon correspondente ao peptídeo anteriormente citado. Os resultados mostram primeiramente a informação procedente da cromatografia líquida de alta pressão no que concerne ao tempo de eluição do peptídeo monitorado em ambas as amostras. Se observa um progresso na saída, no caso do peptídeo procedente da fosforilação por GRK2, originado pelo fundamento da cromatografia, que separa os peptídeos por hidrofobicidade, deixando os mesmos mais retidos e menos polares.

Em segundo lugar, se apresentam os espectros a fragmentação de ambos os peptídeos e a atribuição das séries aos picos obtidos. Esta análise permitiu identificar a treonina do peptídeo candidato LTDDHVQFLIYQILR como a portadora da fosforilação. Na Figura 8, se destacam em amarelo os picos correspondentes à masa total do peptídeo em suas diferentes espécies, em caminhos de amostras e em laranja, o pico de 938,3 Da, correspondente à espécie diferencial entre o espectro da amostra fosforilada e a não fosforilada.

A conclusão final das aproximações espectrométricas e proteômicas foi que a fosforilação de GRK2 sobre p38 se produz na treonina 123 da sequência de p38 α .

A mutação da treonina 123 de p38 α impede a fosforilação GRK2

Com o objetivo de verificar a localização do resíduo diana da fosforilação por GRK2, se geraram dois

mutantes de p38 α na T123. O mutante p38 α T123A representa a forma de p38 não fosforilável por GRK2, enquanto que o mutante p38 α T123D, pela carga negativa do aspártico, a extensão de sua cadeia lateral, imita a forma constitutivamente fosforilada da treonina 123. Se purificaram as proteínas de fusão GST-p38 α T123A e GST-p38 α T123D e se submeteram à fosforilação por GRK2, levando sempre como controle a proteína p38 α WT (Figura 9, detalhe separado A). Tanto sob concentrações de substrato baixas como equimolares com relação à cinase, se confirma que nenhum dos dois mutantes é substrato de GRK2, ratificando a identidade da treonina 123 como substrato da dita fosforilação. Na seção **A** da Figura, se incluem também os controles de quantidade de p38 total quantificados por imunodeteção com um anticorpo anti-p38. Em **B**, se inclui um esquema em escala, representativo de p38 α (número de acesso da base de dados Swiss-Prot Q16539, www.expasy.org), onde cabe destacar seu grande domínio cinase, que envolve quase a proteína inteira. Ao final da proteína, se ubica uma pequena região, denominada CD, (Common Docking) que constitui o domínio de ancoramento comum, tanto de substratos como de ativadores de p38 e que foi visto como meio de reconhecimento proteína-proteína na família das MAPK. A análise do cristal de p38 junto com peptídeos procedentes de MKK3 e de MEF2A, permitiu corrigir e afinar a descrição deste sulco de ancoramento.

A Treonina 123 é um Resíduo Sumamente Conservado entre Isoformas e entre Espécies

Na Figura 10, são mostrados dois alinhamentos das seqüências de diferentes proteínas p38, feitos pelos presentes inventores. No quadro superior se comparou as isoformas α das p38 (MK14 nas bases de dados Swiss-Prot) de

5 diferentes espécies: *Cyprinus carpio* (carpa comun, MK14A_CYPCA: Q90336), *Drosophila melanogaster* (mosca da fruta, MK14A_DROME: O62618), *Xenopus laevis* (Rã de unhas africana, MK14_XENLA: P47812), *Pan troglodytes* (chimpanzé, MK14_PANTR: Q95NE7), *Canis familiaris* (cachorro, MK14_CANFA:

10 O02812), *Homo sapiens* (ser humano, MK14_HUMAN: Q16539), *Mus musculus* (camundongo, MK14_MOUSE: P47811) e *Rattus norvegicus* (ratazana, MK14_RAT: P70618). Se utiliza um simples código de cores que diferencia os aminoácidos idênticos entre os ortólogos de p38 (amarelo), de aminoácidos muito conservados e idênticos ao do consenso (azul), de aminoácidos muito

15 conservados equivalentes ao do consenso (verde). O resto de resíduos não conservados permanece em branco. As regiões nas quais uma maior variabilidade é permitida são precisamente as exteriores ao domínio cinase da p38, entre as que se cabe

20 destacar, a zona do terminal-C, onde se ubica o domínio CD, cujos aminoácidos ácidos permitem, devido ao estabelecimento de interações eletrostáticas com aminoácidos básicos de substratos, ativadores e desativadores, o reconhecimento destes. Mediante uma elipse roxa se destaca a localização da

25 T123 na seqüência de todas as p38 α alinhadas. Não apenas a treonina 123 está presente em quase todas as isoformas, pelo que quando não aparece, se encontra uma serina, igualmente fosforilável, em seu lugar. Além disso, a região de

flanqueamento de aminoácidos ácidos que se supõe constituir o consenso de fosforilação por GRK2 está conservada em todos os ortólogos.

Em seguida, se estudou se a regulação descrita pelos presentes inventores podia ser comum a todas as quatro isoformas pré-eminentes da p38, a saber α , β , γ , e δ . Para isso, se alinharam as zonas que compreendem os resíduos 120 a 140 das isoformas de p38 de leveduras: HOG1 de *Candida albicans* (Q92207), HOG1 de *Saccharomyces cerevisiae* (P32485), Styl de *Schizosaccharomyces pombe* (Q09892); as isoformas α e de p38 de ser humano, de camundongo, de ratazana e de rã africana (isoformas MK12 no aliamento, P53778, O08911, Q63538, P47812); isoformas δ de p38 de ser humano, de chimpanzé, de camundongo e de ratazana (isoformas MK13: O15264, Q9N272, Q9Z1B7 e Q9WTY9 respectivamente, no alinhamento); as duas isoformas de p38 de drosófila (MK14_DROME, O62618 e O61443), as isoformas β de ser humano (β_2 difere da inicialmente isolada β , a qual carece da inserção, por processamento alternativo, de oito aminoácidos presentes nesta. A isoforma β é minoritária e difícil de isolar, por isso, somente se identifica a forma β com a variante β_2) e de camundongo (MK11: Q105759, Q9WUI1); e finalmente as isoformas α (MK14) de *Xenopus*, de *Cyprinus* (isoforma MK14A antes incluída na comparativa e isoforma MK14B, Q9I958) de chimpanzé, de cachorro, de homem, de camundongo e de ratazana, anteriormente alinhadas. Resulta o chamamento para a alta conservação das seqüências entre todas elas, inclusive as procedentes de leveduras. Com relação à

treonina em questão (T123 de p38 α humana), pode-se dizer que se encontra conservada em vertebrados - e incluso em metazoos-, assim como, os aminoácidos circundantes, entre os quais se encontram os resíduos ácidos D e E. Assim, incluso, se o alinhamento sofre uma interrupção à altura justo deste resíduo, segue estando conservado nas isoformas δ de p38. A única isoforma das incluídas neste alinhamento que carece de uma serina ou treonina em um contexto homólogo é a p38 γ humana.

10 A Fosforilação de p38 por GRK2 Diminui tanto a Atividade Catalítica de p38 sobre seus Substratos como a Capacidade de ser Substrato de MKK6

Nas Figuras 11 e 12 se reúnem os experimentos que foram idealizados para determinar quais conseqüências funcionais podia ter a fosforilação de GRK2 sobre a T123 de p38. O primeiro que se estudou foi se a fosforilação de GRK2 sobre p38 diminuiria a ativação desta por MKK6_{CAM} *in vitro*. Nos quadros que modelam A na Figura 11, se apresentam os resultados, em duplicata, obtidos em experimentos de fosforilação de MKK6_{CAM} sobre GST-p38 e os mutantes GST-p38T123A e GST-p38T123D. Em quantidades similares de proteínas recombinantes (Azul de Coomassie), GST-p38T123D é muito pior substrato de MKK6_{CAM} que as outras duas p38 (³²P).

Em seguida se estudou se esta capacidade diminuída por parte de GST-p38T123D de ser fosforilada por MKK6_{CAM} se correlacionava com uma diminuição de sua atividade catalítica *in vitro*. Para isto, foram feitos alguns testes de fosforilação que, devido à indetectável atividade basal de

GST-p38, requeriam a inclusão da cinase ativadora MKK6_{CAM}. Na parte B da Figura 11, se provou a capacidade de GST-p38^{WT} e dos dois mutantes GST-p38T123A e GST-p38T123D de fosforilar um substrato conhecido se p38, como é ATF2, previamente purificado como proteína de fusão em GST. Assim, em cada reação de fosforilação, se incluem substrato, MAPK e MAPKK. Se mostra um experimento representativo (³²P), onde os pontos estão em duplicata, assim como, seu respectivo controle de quantidades de proteína (Azul de Coomassie). Assim, estes testes revelam que p38Tα123D carece da mínima atividade catalítica sobre GST-ATF2, enquanto que p38α e p38Tα123A o fosforilam de maneira análoga.

Se decidiu corroborar os dados com um substrato mais específico de p38, pois ATF2 é também fosforilado por JNK. Se purificou GST-MEF2A, por ter sido recentemente cristalizado junto à p38, assim como, por ser um substrato preferido de p38. Na Figura 12 se reúnem os testes realizados com este substrato. O detalhe separado A garante as deduções anteriores, a saber, a atividade de p38Tα123D sobre MEF2A está completamente abolida, enquanto que o mutante p38Tα123A conserva a capacidade de fosforilar este substrato. Se observa, além disso, que a fosforilação é acompanhada de uma troca correlativa de mobilidade do substrato GST-MEF2A, detectado por tingimento com Azul de Coomassie. É freqüente que a hiperfosforilação de uma proteína redunde em uma troca de sua mobilidade eletroforética, apreciavelmente inclusa em géis desnaturalizantes de poliacrilamida e SDS. Após analisar os testes de fosforilação em conjunto, pode ser observado,

além disso, que o mutante p38T α 123A, caso seja corretamente fosforilado por MKK6_{CAM}, exibe uma atividade cinase reduzida frente aos dois substratos que foram comprovados. Se decidiu dividir um pouco mais este efeito diferencial entre p38T α 123A e p38 α WT, para o qual os pesquisadores se fixaram em sua respectiva atividade basal, quer dizer, na ausência da cinase ativadora MKK6 e frente à MEF2A (Figura 12, detalhe separado B). A atividade basal da p38 pode ser avaliada em condições de suficiente substrato e ampla exposição e se pode comprovar que sendo os mutantes na T123, possuem menor atividade catalítica basal que a cinase silvestre. p38T α 123A se comporta como o término médio entre p38 α WT e p38T α 123D. Assim posto, o mutante p38T α 123A, em condições enzimáticas mais restritivas (10 vezes menos substrato e 15 minutos de fosforilação; quadro **C** da Figura 12), apresenta maior diferença catalítica com relação à p38 α WT do que os experimentos iniciais indicavam.

O Mutante p38T123D apresenta Menor Capacidade de se Ativar por MKK6_{CAM} in situ

Os resultados, que paralelamente expõem uma explicação coerente aos dados iniciais em células HEK293, se corroboraram neste mesmo sistema. Antes, se gerou por PCR o mutante pCDNA3-Flag-p38T123D de expressão eucariótica. Assim posto, seguindo aproximações experimentais análogas às de sobreexpressão ou redução de GRK2 em HEK293, se transfectou Flag-p38WT e Flag-p38T123D junto com o ativador MKK6_{CAM}. O gráfico da Figura 13 ilustra, comparando em cada experimento, a ativação de Flag-p38T123D (frente à sua ativação basal) com

a ativação de Flag-p38WT, uma notável redução da mesma. A ativação de p38T123D nas células é menos provável que a da cinase silvestre. Se incluem, dessa modo, nesta Figura, quadros ilustrativos das imunodeteccões que proporcionavam estes experimentos.

Na Figura 14, a união dos substratos (MK2) e ativadores (MKK6) a p38 ou seus mutantes em T123 é analisada mediante um ensaio de união *in vitro*, utilizando proteínas purificadas. Tal como se mostra, a capacidade do mutante T123D para associar-se à MK2 ou à MKK6 está severamente reduzida em relação a do mutante T123A ou à da proteína tipo silvestre.

GRK2 Regula Negativamente a Diferenciação Induzida por Insulina da linha pré-adipocítica 3T3-L1

A linha pré-adipocítica 3T3-L1 se utilizou como modelo celular que permitira estudar a regulação da p38 por GRK2. Estes fibroblastos apresentam a interessante particularidade de que, submetidos a determinados estímulos, entre os quais se destaca a insulina, adquirem, ao final de um tratamento de aproximadamente duas semanas, um fenótipo adipocítico. Esta diferenciação é facilmente distinguível pela acumulação de gotas de gordura que se tingem com um corante roxo lipofílico e que chegam a ocupar a prática totalidade do citoplasma das 3T3-L1.

Uma das funções fisiológicas da p38, diferente da mais ortodoxa resposta ao estresse celular, é seu papel no processo de diferenciação. No caso concreto dos fibroblastos 3T3L1, foi demonstrada a implicação da p38 em tanto e em

quanto a diferenciação em adipócitos se bloqueia por SB203580 e a presença de MKK6_{CAM} é suficiente para isso. Os fatores de transcrição C/EBP (CCAAT/enhancer-binding protein) e PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ), cuja
5 expressão varia no transcurso da diferenciação, parecem submetidos à regulação pela p38. Mais concretamente, C/EBP β é suposto de ser fosforilado por p38, que por sua vez, está ativa somente nas etapas iniciais da diferenciação; o que promoveria a posterior expressão de PPAR γ e dos marcadores
10 adipocíticos que se encontram abaixo de seu controle.

Para investigar o efeito que GRK2 poderia ter na diferenciação adipocítica de 3T3L1, se geraram linhas estavelmente transfectadas com os plasmídeos pCDNA3-GRK2 e pCDNA3-GRK2K220R, que são resistentes à neomicina. Depois da
15 pertinente comprovação de que os níveis de GRK2 estavam em efeito de sobreexpressão em ambos os casos, em comparação com a linha 3T3-L1 (janela inserida no gráfico da Figura 15), se procedeu ao desencadeamento da diferenciação conforme o protocolo padrão. As células 3T3-L1, na ausência de estímulos
20 lipogênicos, têm um saudável aspecto de fibroblastos (foto correspondente ao controle em 3T3-L1) que se converte claramente em um fenótipo adipocítico, como atestam as gotas lipídicas roxas e a morfologia redonda que estas células adquirem (foto + insulina nas 3T3-L1). No caso das estáveis
25 de GRK2, o número de adipócitos por campo é visivelmente menor que no caso dos fibroblastos com níveis endógenos desta cinase. E no que se refere às células 3T3L1-K220R, o efeito adipogênico é substancialmente maior que das células controle.

GRK2 inibe, assim, a aquisição da morfologia adipocítica mediada por insulina, enquanto que K220R a estimula. Além disso, este efeito é dependente de p38, pois a adição do inibidor farmacológico SB203580 reverte toda a adipogênese.

5 Mais ainda, quando se reservavam como controles internos do experimento placas sem submeter aos tratamentos diferenciadores, as estáveis de K220R sofriam muito mais conversão espontânea em adipócitos que as outras células. No gráfico da direita, se representa a recontagem do número de
10 adipócitos por campo em cada uma das três linhas celulares. Se entende por campo, uma zona visualizada com o microscópio ótico em cada p100 o p60. Em cada placa, se contabilizavam normalmente até um total de uns 25 campos aleatórios. A significância dos dados se calculou mediante o Teste T de
15 Student ($p < 0,001$) para dados emparelhados (cada linha celular estável comparada com a 3T3-L1).

Os dados das Figuras 16 e 17 conduzem à conclusão de que um anti-soro policlonal frente a um peptídeo de p38 fosforilado em Thr123 é capaz de reconhecer a proteína p38
20 fosforilada *in vitro* por GRK2, porém não por MKK6 em outros restos, e que este reconhecimento é específico para o resto Thr123, já que o mutante T123A não é imunodetectado por esse anti-soro. Também, esta sobreexpressão de GRK2 pode promover um incremento na imunodeteção deste epítipo, por este
25 anticorpo, sinal de que está reduzida quando um mutante GRK2 inativo (K220R) está sobreexpresso.

Tabela 1

5

Anticorpo (Ac)	Epítipo/ Proteína Pm(KDa)	Tipo	Diluição (WB)	Diluição (IP ou IF)	Peptídeo Imunogênico
Anti-HA (12CA5)	HA 1,1	MR	-	2µg/ml	Resíduos 76-111 da hemaglutinina : nonapeptídeo YPYDVPDYA
Anti-HA (Y-11)	HA	PC	1:500	-	Resíduos internos da hemaglutinina
Anti-Flag M2-agarose	FLAG 0,96	MR unido a resina de agarose	-	0,01-0,02µl de Ac-resina/µl de tampão de lise	Octa-peptídeo FLAG (DYKDDDDK)
Anti-Myc-agarose	c-Myc 2,1	MR unido a resina de agarose	-	0,01-0,02µl de Ac-resina/µl de tampão de lise	Peptídeo correspondente a aminoácidos 408-439 de c-Myc de origem humana MEQKLISEEDLLRKGST
Anti-Myc	c-Myc 2,1	MR	-	1:1000 (IF)	Hibridoma 9E10 contra a seqüência EQKLISEEDL humana
Anti-PF1(GRK2)	GRK2 79,6	PC	1:1000	1:300	Proteína de fusão GST-PF1 (aminoácidos 50-145 de GRK2 bovina)
910 (GRK2)	GRK2	PC	1:1000	-	Proteína de fusão GST-PF1 (aminoácidos 50-145 de GRK2 bovina).
Anti-PF2 (GRK2)	GRK2	PC	1:1000	1:200	Proteína de fusão GST-PF2 (aminoácidos 436-689 de GRK2 bovina)
Anti-GRK2/3	GRK2/3	MR	1:1000	1µg/ml	Proteína de fusão GST-GRK3 (467-688).
Anti-GRK3 (sc-563)	GRK3 79,7	PC	1:1000	-	Peptídeo terminal-C de GRK3 bovina
Anti-GRK5 (sc-565)	GRK5 67,8	PC	1:1000	0.2µg/ml	Peptídeo terminal-C de GRK5 humana

Anticorpo (Ac)	Epítipo/ Proteína Pm(KDa)	Tipo	Diluição (WB)	Diluição (IP ou IF)	Peptídeo Imunogênico
Anti-GRK6 (sc-566)	GRK6 66	PC	1:500	0.2µg/ml	Peptídeo terminal-C de GRK6 humana
Anti-ERK1 (sc-93)	ERK1 P44	PC	0,75µg/ml	-	Peptídeo emplacado en terminal-C de ERK1 de rato
Anti-ERK2 (sc-154)	ERK2 42	PC	0,75µg/ml	-	Peptídeo emplacado en C-terminal de ERK2 de rata
Anti-P-ERK ½	ERK1 y ERK2	MR	1:500	-	Fosfo T202/Y204.(forma activa.). Peptídeo sintético correspondente à região entorno aos ditos resíduos da p44MAPK humana
Anti-p38	p38 42	PC	1:1000	-	Peptídeo sintético derivado da p38 humana
Anti-p38N	P38	PC	1:1500	-	14 últimos aminoácidos (terminalis-C) de p38α de Xenopus
Anti-P-p38	p38	PC	1:1000	-	Fosfo T180/Y182. Peptídeo sintético correspondente à região en torno aos ditos resíduos da p38 humana
Anti-MKK6/ SKK3	MKK6 40	PC	1:500	-	Proteína de fusão MBP-MKK6 humana
Anti-MKK6/ SKK3	MKK6	PC	1:1000	-	Proteína de fusão MalE-MKK6 humana
Anti-Gαs (K-20)	Gαs 45	PC	1:1000	-	Epítipo terminal-N de Gαs humana
Anti-Gαq/11 (C-19)	Gαq/11 42	PC	1:1000	-	Peptídeo dentro de domínio comum a Gαq y Gα11 de rato
Anti-Gαi comum	Gαi-1 (I-20), Gαi-2(T-19) y Gαi-3(C-10) 41-45	PC	1:1000	-	Mistura própria dos anticorpos contra as distintas Gαi, de origem humana e de rato
Anti-Gα12 (S-20)	Gα12 44	PC	1:1000	-	Peptídeo do terminal-N de Gα12 de rato



PI0611598-5

REIVINDICAÇÕES

1. Proteína MAPK (sigla do Inglês, *Mitogen-Activated Protein Kinase* - Proteína Cinase Ativada por Mitógeno), **caracterizada** pelo fato de ser selecionada dentre:

a) uma proteína MAPK que compreende um resto fosforilado em um sítio de fosforilação diferente do sítio ou sítios de fosforilação presentes no segmento de ativação da dita proteína MAPK, ou um fragmento da dita proteína que compreende o dito resto fosforilado, em que:

- o dito sítio de fosforilação diferente é o resto de treonina na posição 123 (Thr123) da p38, isoforma α , de camundongo, ou um resto de um aminoácido suscetível de fosforilação, posicionalmente equivalente em outra proteína MAPK, tal como se define por alinhamento múltiplo de seqüências de aminoácidos, e

- a fosforilação no dito sítio de fosforilação diferente, impede a ativação da dita proteína MAPK e também sua atividade com relação a seus substratos; e

b) uma proteína MAPK que compreende uma carga negativa ou um resto volumoso em um sítio de fosforilação, ou na área que envolve o dito sítio de fosforilação, que é diferente do sítio ou sítios de fosforilação presentes no segmento de ativação da dita proteína MAPK, ou um fragmento da dita proteína que compreende o dito resto fosforilado, em que:

- o dito sítio de fosforilação diferente é o resto de treonina na posição 123 (Thr123) da p38, isoforma α , de

camundongo, ou um resto de um aminoácido suscetível de fosforilação posicionalmente equivalente em outra proteína MAPK, tal como se define por alinhamento múltiplo de seqüências de aminoácidos, e

5 - a introdução da dita carga negativa ou do dito resto volumoso no dito sítio de fosforilação, ou na área que envolve o dito sítio de fosforilação, impede a ativação da dita proteína MAPK e também sua atividade com relação a seus substratos.

10 2. Proteína, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que a dita proteína MAPK é selecionada entre as proteínas cinase ERK, JNK e p38, e suas respectivas isoformas, de qualquer espécie.

15 3. Proteína, de acordo com as reivindicações 1 ou 2, **caracterizada** pelo fato de que a dita proteína MAPK é a p38 de um mamífero.

20 4. Proteína, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizada** pelo fato de que a dita proteína MAPK é a p38, isoforma α , de camundongo e tem a seqüência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 1.

5. Proteína, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que a dita proteína MAPK compreende um segmento de ativação selecionado dentre:

25 - um segmento de ativação que compreende a tríade de aminoácidos de fórmula (I):



onde:

- Thr é treonina,

- Tyr é tirosina, e
- Xaa é o resto de um aminoácido, preferencialmente, de um aminoácido selecionado dentre ácido aspártico, ácido glutâmico, glutamina, glicina e prolina; e
- 5 - um segmento de ativação que compreende a tríade de aminoácidos de fórmula (II):



onde:

- Ser é serina,
- 10 - Glu é ácido glutâmico, e
- Gly é glicina.

6. Proteína, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de compreender a seqüência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 2.

- 15 7. Uso de uma proteína, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o dito uso ocorre no diagnóstico de uma patologia mediada por uma MAPK na forma ativa, ou para determinação do risco ou predisposição de um sujeito desenvolver a dita patologia,
- 20 ou para avaliação ou monitoramento do efeito de uma terapia administrada a um sujeito que apresenta a dita patologia, ou para analisar o estado ou gravidade e/ou evolução da dita patologia, assim como, para identificação de compostos potencialmente úteis para o tratamento da dita patologia.

- 25 8. Uso, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado** pelo fato de que a dita patologia mediada por uma MAPK na forma ativa compreende câncer e doenças

cardíacas, doenças infecciosas, neuronais, pulmonares e inflamatórias.

9. Método, *in vitro*, para detectar em um sujeito uma patologia mediada por uma MAPK na forma ativa, ou para
5 analisar o risco ou predisposição de um sujeito a desenvolver uma patologia mediada por uma MAPK na forma ativa, **caracterizado** pelo fato de compreender:

- 10 a) detectar e/ou quantificar o nível de uma proteína MAPK, de acordo com quaisquer das reivindicações 1 a 6, em uma amostra biológica proveniente do dito sujeito; e
b) comparar o dito nível com o de uma amostra de controle, onde uma redução no dito nível em relação à amostra de controle, é indicativo de risco do sujeito desenvolver a dita patologia mediada por uma MAPK na forma ativa.

15 10. Método, *in vitro*, para avaliar ou monitorar o efeito de uma terapia administrada a um sujeito que apresenta a dita patologia mediada por uma MAPK na forma ativa, ou para analisar o estado ou gravidade e/ou a evolução da dita patologia mediada por uma MAPK na forma
20 ativa, **caracterizado** pelo fato de compreender:

- a) detectar e/ou quantificar o nível de uma proteína MAPK, de acordo com quaisquer das reivindicações 1 a 6, em uma amostra biológica proveniente do dito sujeito; e
b) comparar o dito nível com o de uma amostra de controle
25 procedente do mesmo sujeito.

11. Método, *in vitro*, para identificar um composto potencialmente útil para o tratamento de

patologias mediadas por proteínas MAPK na forma ativa, **caracterizado** pelo fato de compreender:

a) colocar em contato o composto candidato com uma proteína MAPK, e

5 b) detectar a fosforilação da dita proteína MAPK em um sítio de fosforilação diferente do sítio ou sítios de fosforilação presentes no segmento de ativação da dita proteína MAPK, e

c) analisar se o dito sítio de fosforilação (i) é a Thr123
10 da p38, isoforma α , de camundongo, no caso da proteína MAPK utilizada tenha sido a dita proteína, ou então um resto de um aminoácido suscetível de fosforilação posicionalmente equivalente em outra proteína MAPK, conforme definido por alinhamento múltiplo de seqüências de aminoácidos, e se
15 (ii) a fosforilação no dito sítio de fosforilação diferente, impede a ativação da dita proteína MAPK;
ou, alternativamente,

i) colocar em contato um composto candidato, selecionado dentre um composto capaz de fosforilar a dita
20 proteína MAPK, ou um composto que imita o efeito da dita fosforilação, com uma proteína MAPK;

ii) detectar a fosforilação da dita proteína MAPK em um sítio de fosforilação do segmento de ativação da dita proteína MAPK para medir o efeito do composto candidato
25 sobre a ativação da proteína MAPK, ou detectar o efeito de imitar a dita fosforilação sobre a dita proteína MAPK para medir o efeito do composto candidato sobre a ativação da MAPK;

iii) analisar a atividade da dita proteína MAPK na presença do composto candidato com relação a seus substratos para avaliar a possível inibição da ação e/ou atividade da proteína MAPK sobre seus substratos na
5 presença de um composto competitivo; e

(iv) analisar (i) se o dito sítio de fosforilação na Thr123 da proteína p38, isoforma α , de camundongo (caso a proteína MAPK utilizada tenha sido a dita proteína) é afetado pelo composto candidato, e (ii) se a fosforilação
10 no dito sítio de fosforilação impede a ativação da dita proteína MAPK.

12. Composto, **caracterizado** pelo fato de ser capaz de se unir a uma proteína MAPK, de acordo com quaisquer das reivindicações 1 a 6, e/ou ser capaz de
15 detectar a dita proteína MAPK, de acordo com quaisquer reivindicações 1 a 6.

13. Composto, de acordo com a reivindicação 12, **caracterizado** pelo fato de que o dito composto é:

- um anticorpo; ou
- 20 - um composto capaz de se unir a uma proteína MAPK, de acordo com quaisquer das reivindicações 1 a 6, que se une à dita proteína MAPK na Thr123 da proteína p38, isoforma α , de camundongo, ou a um resto de um aminoácido posicionalmente equivalente em outra proteína MAPK,
25 conforme definido por alinhamento múltiplo de seqüências de aminoácidos, e a associação do dito composto no dito sítio de fosforilação Thr123 provoca uma fosforilação reduzida da proteína MAPK no segmento de ativação e, por isso, impede

sua ativação e/ou sua atividade em relação a seus substratos; ou

- um composto capaz de se unir à região de ação da p38 e capaz de imitar a introdução de uma carga negativa na dita região, introduzindo o dito composto uma carga negativa ou um resto volumoso na Thr123 ou na área que a envolve, da p38, isoforma α , de camundongo, ou um resto de um aminoácido posicionalmente equivalente em outra proteína MAPK, conforme definido por alinhamento múltiplo de seqüências de aminoácidos, e a associação do dito composto no dito sítio de fosforilação Thr123, ou na área que envolve a dita Thr 123, impede a ativação da dita proteína MAPK; ou

- um composto capaz de se unir à região de ação da p38 e capaz de imitar a introdução de uma carga negativa na dita região, introduzindo o dito composto uma carga negativa ou um resto volumoso na Thr123 ou na área que a envolve, da p38, isoforma α , de camundongo, ou um resto de um aminoácido posicionalmente equivalente em outra proteína MAPK, conforme definido por alinhamento múltiplo de seqüências de aminoácidos, e a associação do dito composto no dito sítio de fosforilação Thr123, ou na área que envolve a dita Thr 123, impede a atividade da dita proteína MAPK com relação a seus substratos.

14. Composto, de acordo com a reivindicação 13, **caracterizado** pelo fato de que o dito anticorpo é um anticorpo capaz de se unir ao epítipo que compreende a seqüência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 2.

15. Uso do dito composto, de acordo com quaisquer das reivindicações 12 a 14, **caracterizado** pelo fato de que o dito uso ocorre para analisar o risco ou predisposição de um sujeito desenvolver uma patologia mediada por uma MAPK na forma ativa, ou para avaliar ou monitorar o efeito de uma terapia administrada a um sujeito que apresenta a dita patologia, ou para analisar o estado ou gravidade e/ou evolução da dita patologia, assim como, para identificação de compostos potencialmente úteis para o tratamento da dita patologia.

16. Vetor, **caracterizado** pelo fato de compreender:

(i) uma sequência de ácido nucléico que codifica um composto que fosforila um sítio de fosforilação diferente do sítio ou sítios de fosforilação presentes no segmento de ativação de uma proteína MAPK, onde o dito sítio de fosforilação diferente é a Thr123 da p38, isoforma α , de camundongo, ou um resto de um aminoácido suscetível de fosforilação posicionalmente equivalente em outra proteína MAPK, conforme definido por alinhamento múltiplo de sequências de aminoácidos, e a fosforilação no dito sítio de fosforilação diferente impede a ativação da dita proteína MAPK; ou

(ii) uma sequência de ácido nucléico que codifica um composto que impede a fosforilação de um sítio de fosforilação diferente do sítio ou sítios de fosforilação presentes no segmento de ativação de uma proteína MAPK; ou

(iii) um composto que fosforila um sítio de fosforilação diferente do sítio ou sítios de fosforilação presentes no segmento de ativação de uma proteína MAPK, onde o dito sítio de fosforilação diferente é a Thr123 da p38, isoforma α , de camundongo, ou um resto de um aminoácido suscetível de fosforilação posicionalmente equivalente em outra proteína MAPK, conforme definido por alinhamento múltiplo de seqüências de aminoácidos, e a fosforilação no dito sítio de fosforilação diferente impede a ativação da dita proteína MAPK; ou

(iv) um composto que impede a fosforilação em um sítio de fosforilação diferente do sítio ou sítios de fosforilação presentes no segmento de ativação de uma proteína MAPK.

17. Composição farmacêutica, **caracterizada** pelo fato de compreender uma quantidade terapeuticamente efetiva de:

(i) um composto que fosforila um sítio de fosforilação diferente do sítio ou sítios de fosforilação presentes no segmento de ativação de uma proteína MAPK, onde o dito sítio de fosforilação diferente é a Thr123 da p38, isoforma α , de camundongo, ou um resto de um aminoácido suscetível de fosforilação posicionalmente equivalente em outra proteína MAPK, conforme definido por alinhamento múltiplo de seqüências de aminoácidos, e a fosforilação no dito sítio de fosforilação diferente impede a ativação da dita proteína MAPK; ou

(ii) um composto que imita a fosforilação em um sítio de fosforilação diferente do sítio ou sítios de fosforilação presentes no segmento de ativação de uma proteína MAPK, onde o dito sítio de fosforilação diferente é a Thr123 da p38, isoforma α , de camundongo, ou um resto de um aminoácido suscetível de fosforilação posicionalmente equivalente em outra proteína MAPK, conforme definido por alinhamento múltiplo de seqüências de aminoácidos, e a fosforilação no dito sítio de fosforilação diferente impede a ativação de dita proteína MAPK; ou

(iii) um composto que impede a fosforilação em um sítio de fosforilação diferente do sítio ou sítios de fosforilação presentes no segmento de ativação de uma proteína MAPK; ou

(iv) um vetor, de acordo com a reivindicação 16; ou

(v) um composto capaz de se unir a uma proteína MAPK, de acordo com quaisquer das reivindicações 1 a 6, que se une à dita proteína MAPK na Thr123 da p38, isoforma α , de camundongo, ou em um resto de um aminoácido posicionalmente equivalente em outra proteína MAPK, conforme definido por alinhamento múltiplo de seqüências de aminoácidos, e a associação do dito composto ao dito sítio de fosforilação Thr123 provoca uma fosforilação reduzida da proteína MAPK no segmento de ativação e, por meio disso, impede sua ativação e/ou atividade com relação a seus substratos; ou

(vi) um composto capaz de se unir à região de ação da p38 e capaz de imitar a introdução de uma carga negativa na dita região, introduzindo o dito composto uma carga

negativa ou um resto volumoso na Thr123, ou na área que a envolve, da p38, isoforma α , de camundongo, ou um resto de um aminoácido posicionalmente equivalente em outra proteína MAPK, conforme definido por alinhamento múltiplo de
5 seqüências de aminoácidos, e a associação do dito composto no dito sítio de fosforilação Thr123, ou na área que envolve a dita Thr 123, impede a ativação da dita proteína MAPK; ou

(vii) um composto capaz de se unir à região de ação da
10 p38 e capaz de imitar a introdução de uma carga negativa na dita região, introduzindo o dito composto uma carga negativa ou um resto volumoso na Thr123 da p38, isoforma α , de camundongo, ou um resto de um aminoácido posicionalmente equivalente em outra proteína MAPK, conforme definido por
15 alinhamento múltiplo de seqüências de aminoácidos, e a associação do dito composto no dito sítio de fosforilação Thr123 impede a atividade da dita proteína MAPK em relação a seus substratos,
junto com, opcionalmente, um veículo farmacologicamente
20 aceitável.

18. Composição, de acordo com a reivindicação 17,
caracterizada pelo fato de compreender uma cinase.

19. Composição, de acordo com a reivindicação 18,
caracterizada pelo fato de que a cinase é a cinase GRK2 ou
25 um fragmento ativo da mesma.

20. Uso de:

(i) um composto que fosforila um sítio de fosforilação diferente do sítio ou sítios de fosforilação presentes no

segmento de ativação de uma proteína MAPK, onde o dito sítio de fosforilação diferente é a Thr123 da p38, isoforma α , de camundongo, ou um resto de um aminoácido suscetível de fosforilação posicionalmente equivalente em outra
5 proteína MAPK, conforme definido por alinhamento múltiplo de seqüências de aminoácidos, e a fosforilação no dito sítio de fosforilação diferente impede a ativação da dita proteína MAPK; ou

(ii) um composto que imita a fosforilação em um sítio
10 de fosforilação diferente do sítio ou sítios de fosforilação presentes no segmento de ativação de uma proteína MAPK, onde o dito sítio de fosforilação diferente é a Thr123 da p38, isoforma α , de camundongo, ou um resto de um aminoácido suscetível de fosforilação posicionalmente
15 equivalente em outra proteína MAPK, conforme definido por alinhamento múltiplo de seqüências de aminoácidos, e a fosforilação no dito sítio de fosforilação diferente impede a ativação da dita proteína MAPK; ou

(iii) um composto que impede a fosforilação em um
20 sítio de fosforilação diferente do sítio ou sítios de fosforilação presentes no segmento de ativação de uma proteína MAPK; ou

(iv) um vetor, de acordo com a reivindicação 16; ou

(v) um composto capaz de se unir a uma proteína MAPK,
25 de acordo com quaisquer das reivindicações 1 a 6, que se une à dita proteína MAPK na Thr123 da p38, isoforma α , de camundongo, ou em um resto de um aminoácido posicionalmente equivalente em outra proteína MAPK, conforme definido por

alinhamento múltiplo de seqüências de aminoácidos, e a associação do dito composto ao dito sítio de fosforilação Thr123 provoca uma fosforilação reduzida da proteína MAPK no segmento de ativação e, por meio disso, impede sua
5 ativação e/ou atividade com relação a seus substratos; ou

(vi) um composto capaz de se unir à região de ação da p38 e capaz de imitar a introdução de uma carga negativa na dita região, introduzindo o dito composto uma carga negativa ou um resto volumoso na Thr123, ou na área que a
10 envolve, da p38, isoforma α , de camundongo, ou um resto de um aminoácido posicionalmente equivalente em outra proteína MAPK, conforme definido por alinhamento múltiplo de seqüências de aminoácidos, e a associação do dito composto no dito sítio de fosforilação Thr123, ou na área que
15 envolve a dita Thr 123, impede a ativação da dita proteína MAPK; ou

(vii) um composto capaz de se unir à região de ação da p38 e capaz de imitar a introdução de uma carga negativa na dita região, introduzindo o dito composto uma carga
20 negativa ou um resto volumoso na Thr123 da p38, isoforma α , de camundongo, ou um resto de um aminoácido posicionalmente equivalente em outra proteína MAPK, conforme definido por alinhamento múltiplo de seqüências de aminoácidos, e a associação do dito composto no dito sítio de fosforilação
25 Thr123 impede a atividade da dita proteína MAPK com relação a seus substratos,

caracterizado que o dito uso ocorre na elaboração de uma composição farmacêutica para o tratamento de uma patologia mediada por MAPKs na forma ativa.

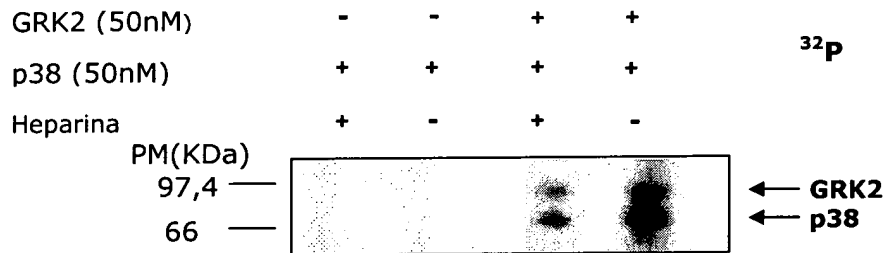
21. Kit, que compreende uma proteína MAPK, de
5 acordo com quaisquer das reivindicações 1 a 6, ou um composto capaz de se unir e/ou detectar a dita proteína MAPK, de acordo com quaisquer das reivindicações 12 a 14.

22. Kit, de acordo com a reivindicação 21,
caracterizado pelo fato de que o dito kit é de utilidade
10 para o diagnóstico de uma patologia mediada por uma MAPK na forma ativa, ou para determinar o risco ou predisposição de um sujeito a desenvolver a dita patologia, ou para avaliar ou monitorar o efeito de uma terapia administrada a um
15 sujeito que apresenta a dita patologia, ou para analisar o estado ou gravidade e/ou a evolução da dita patologia, assim como, na identificação de compostos potencialmente úteis para o tratamento da dita patologia.

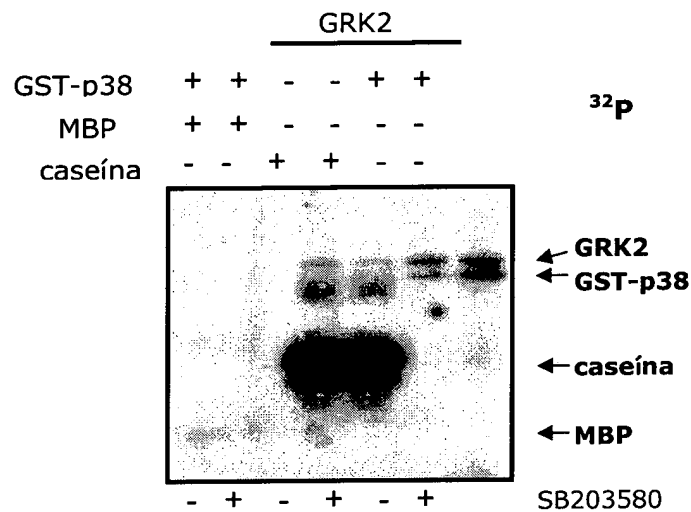
23. Kit, de acordo com as reivindicações 21 ou 22, **caracterizado** pelo fato de que a dita proteína MAPK é
20 uma cinase p38 de mamífero, fosforilada na Thr123 de uma p38 de mamífero, isoforma α .

FIGURA 1

A



B



C

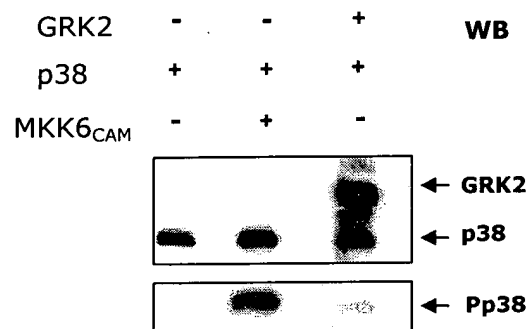
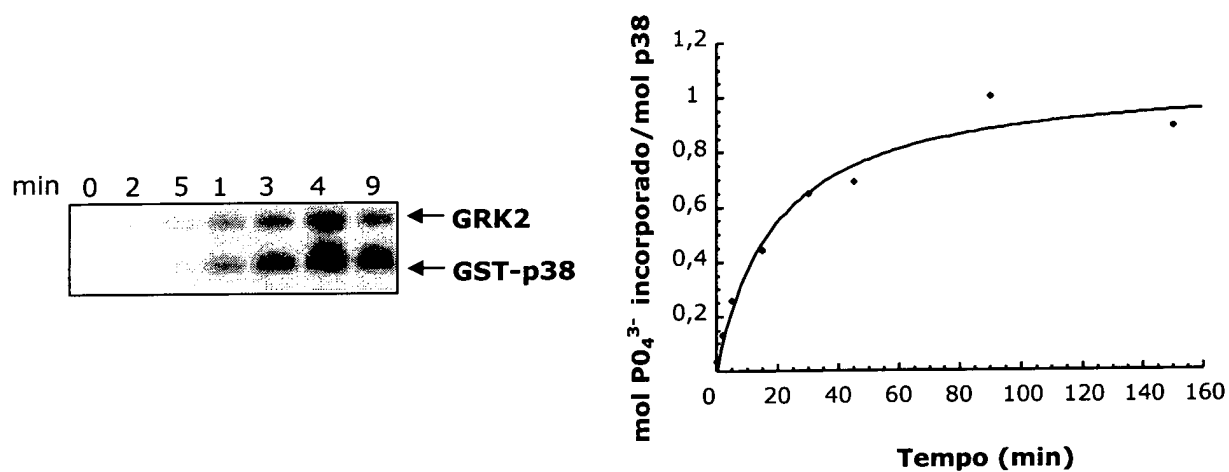


FIGURA 1 (cont.)

D



E

12,5 25 50 100 200 400 [p38]nM

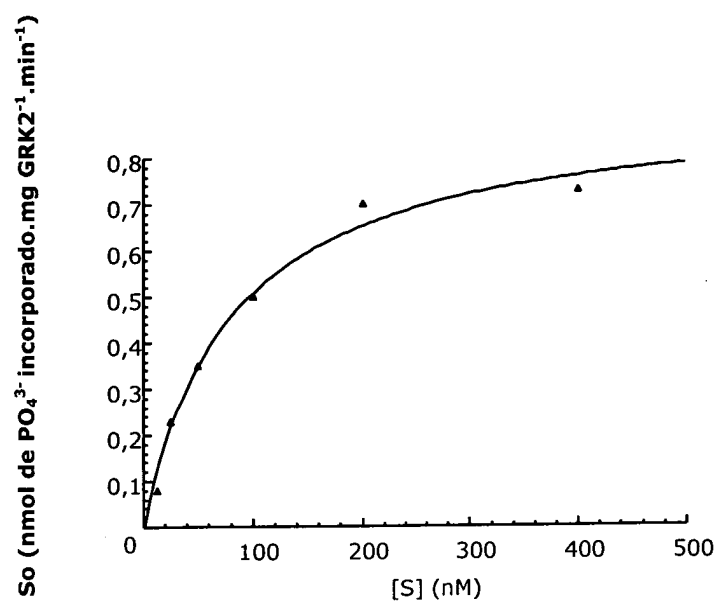
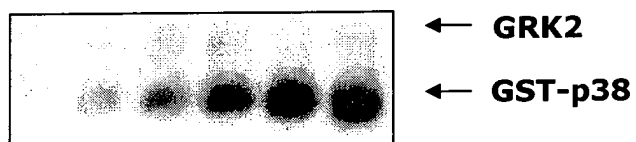


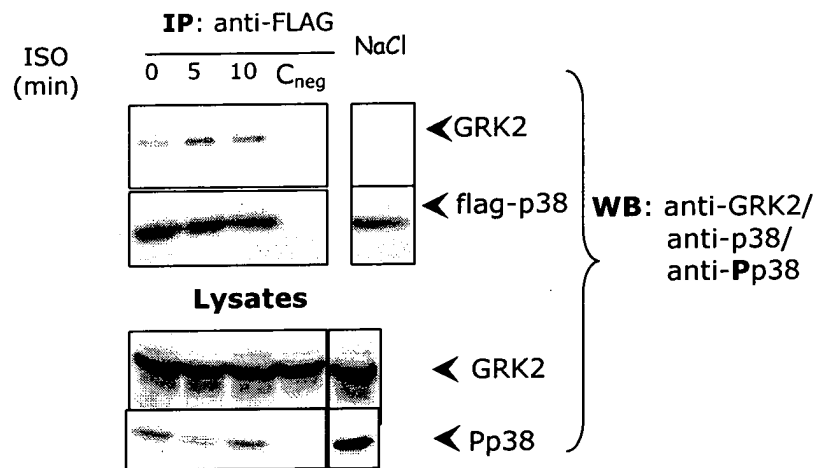
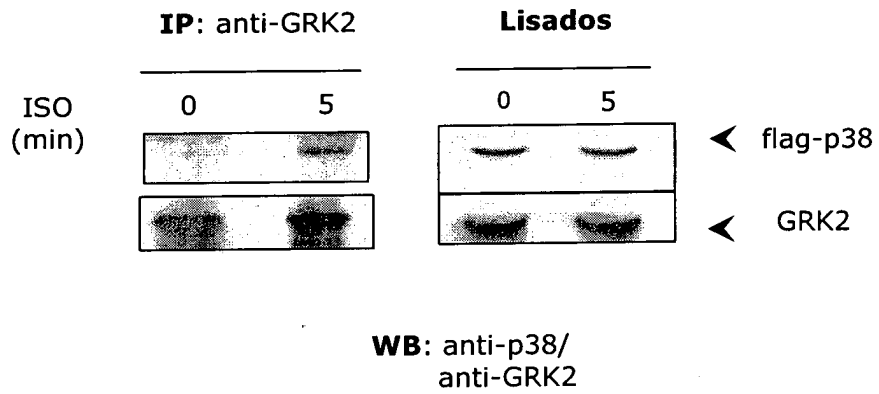
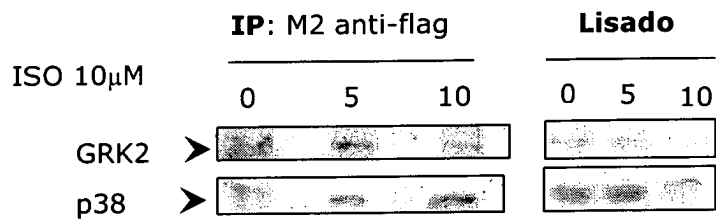
FIGURA 2**A****B**

FIGURA 2 (cont.)**C**

**WB: anti-p38/
anti-GRK2**

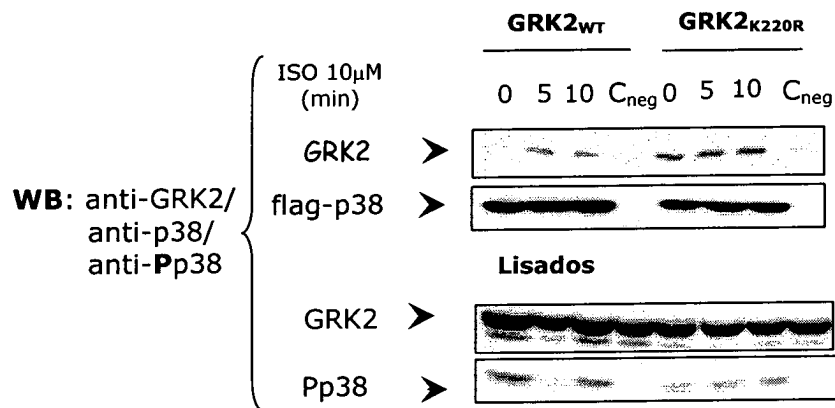
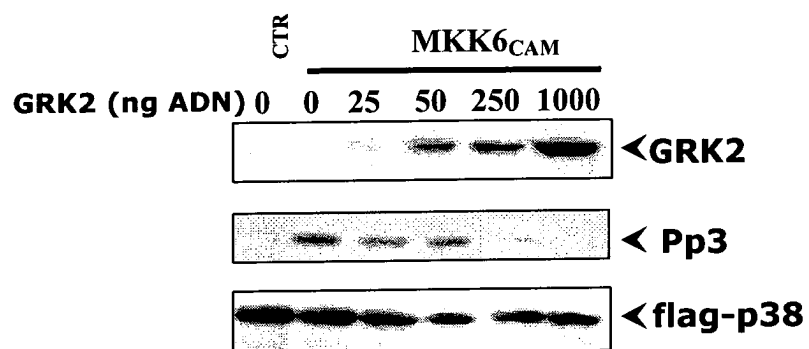
D**IP: M2 anti-flag**

FIGURA 3

A



B

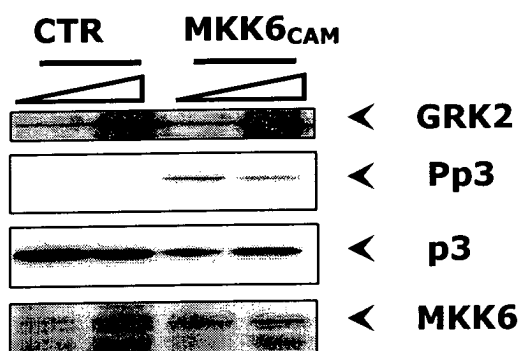


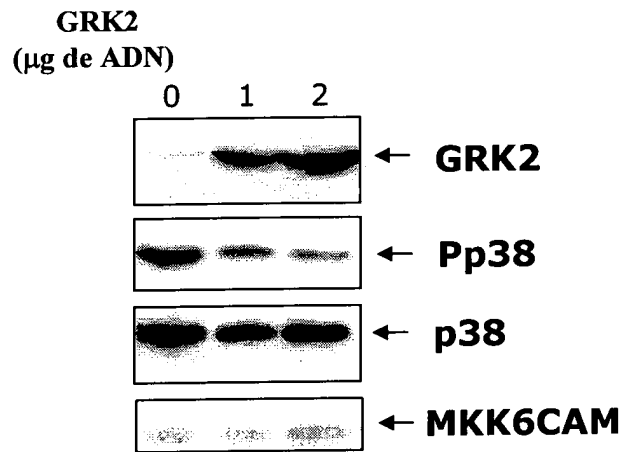
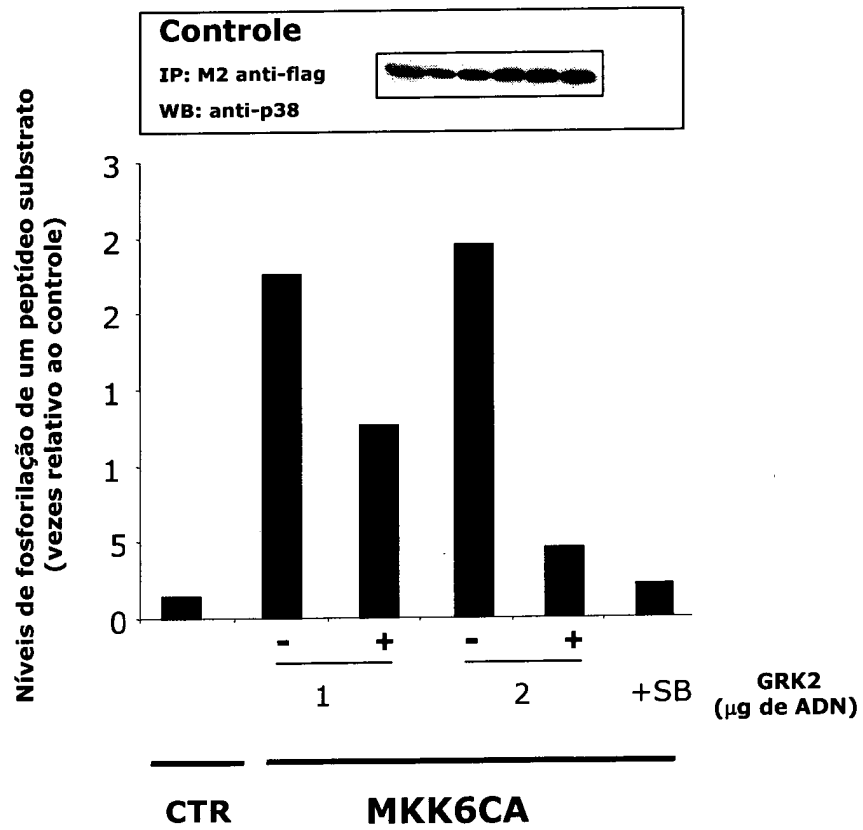
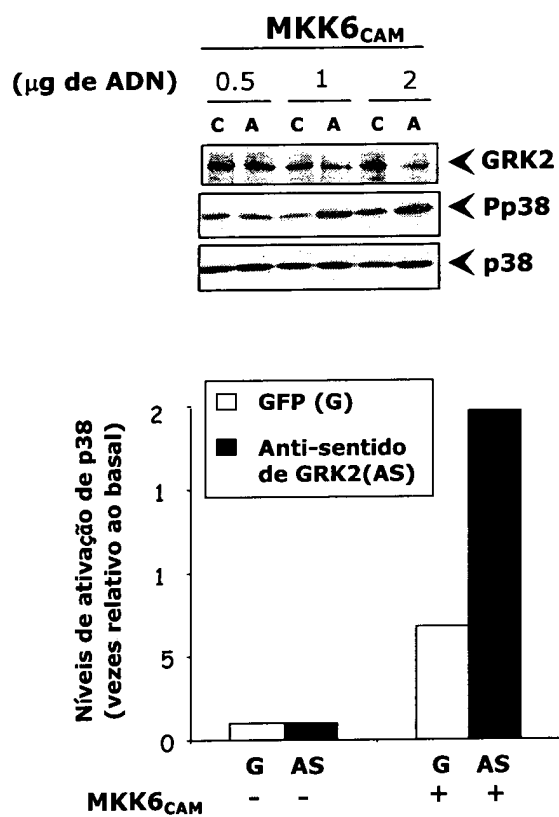
FIGURA 4**A****B**

FIGURA 5

A



B

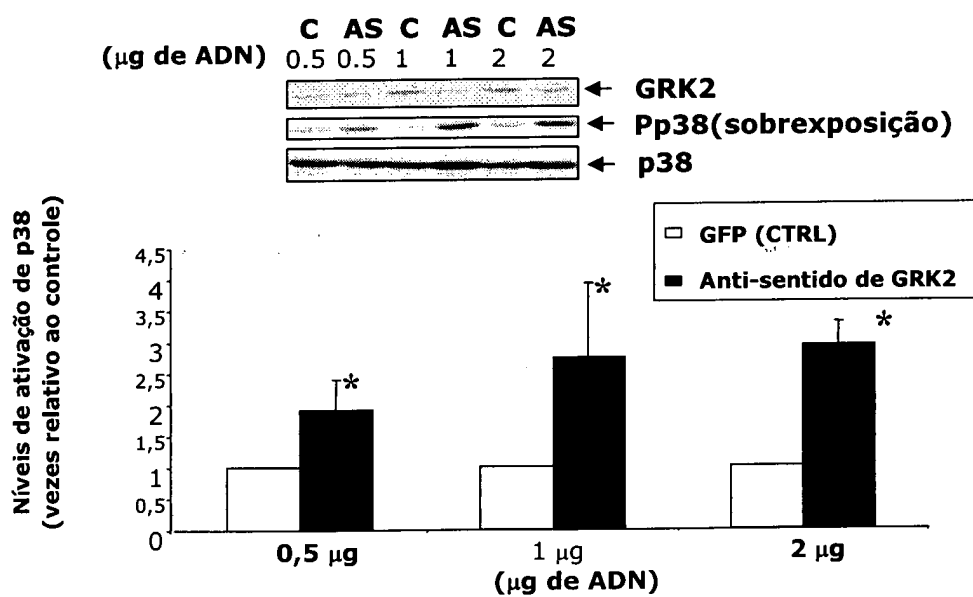


FIGURA 6

A

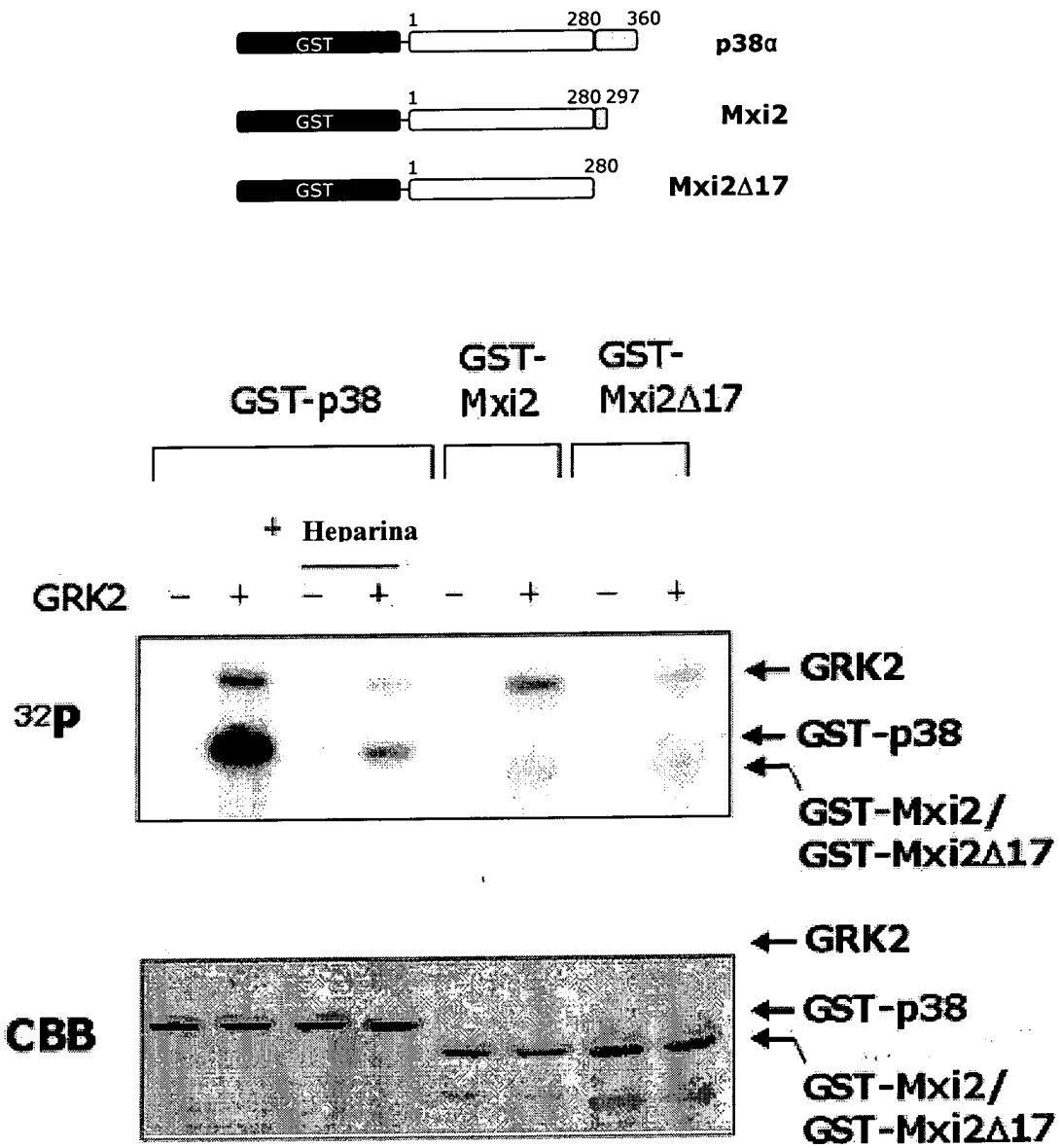


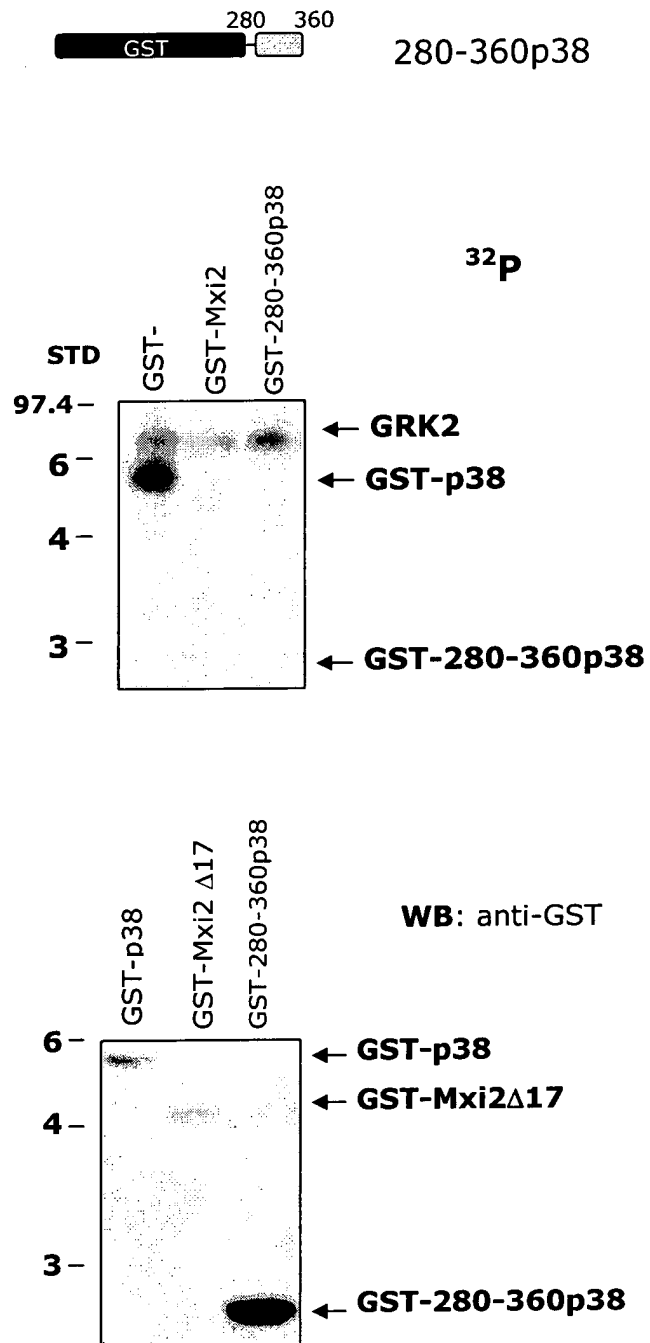
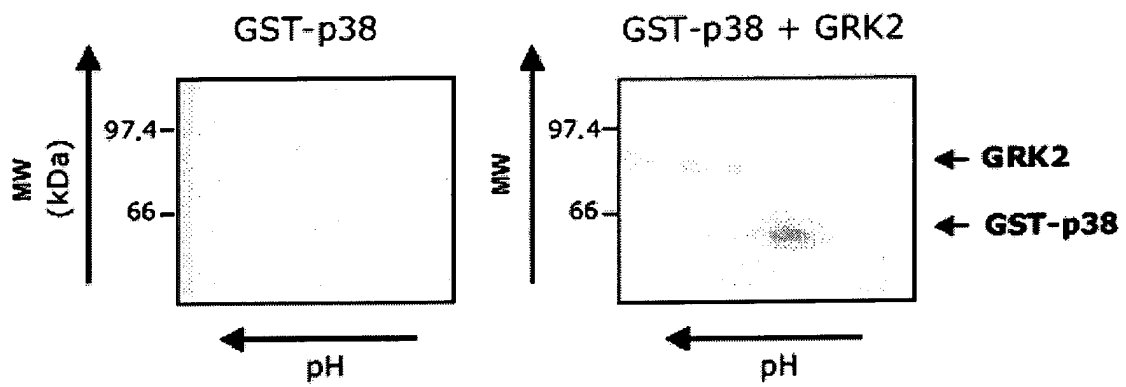
FIGURA 6 (cont)**B**

FIGURA 7

A



B

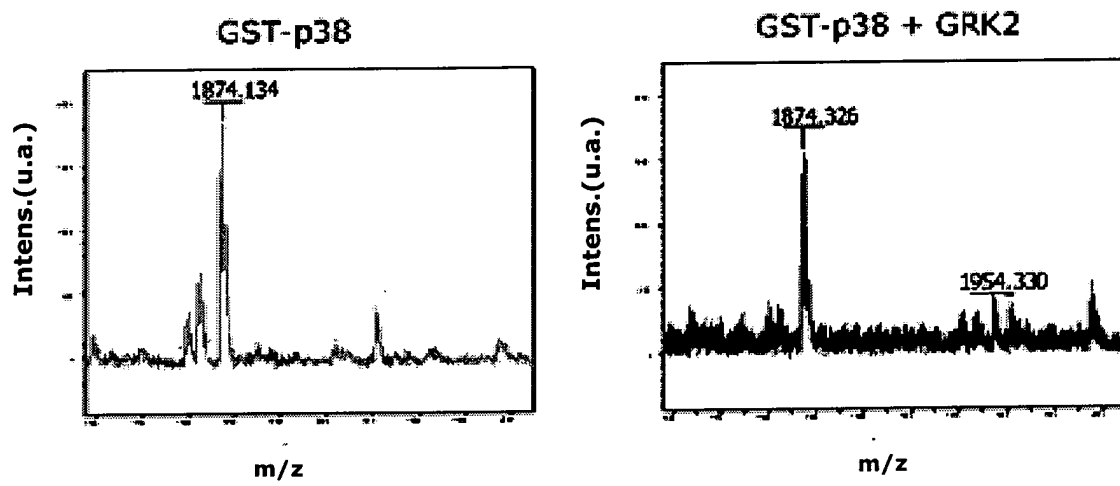
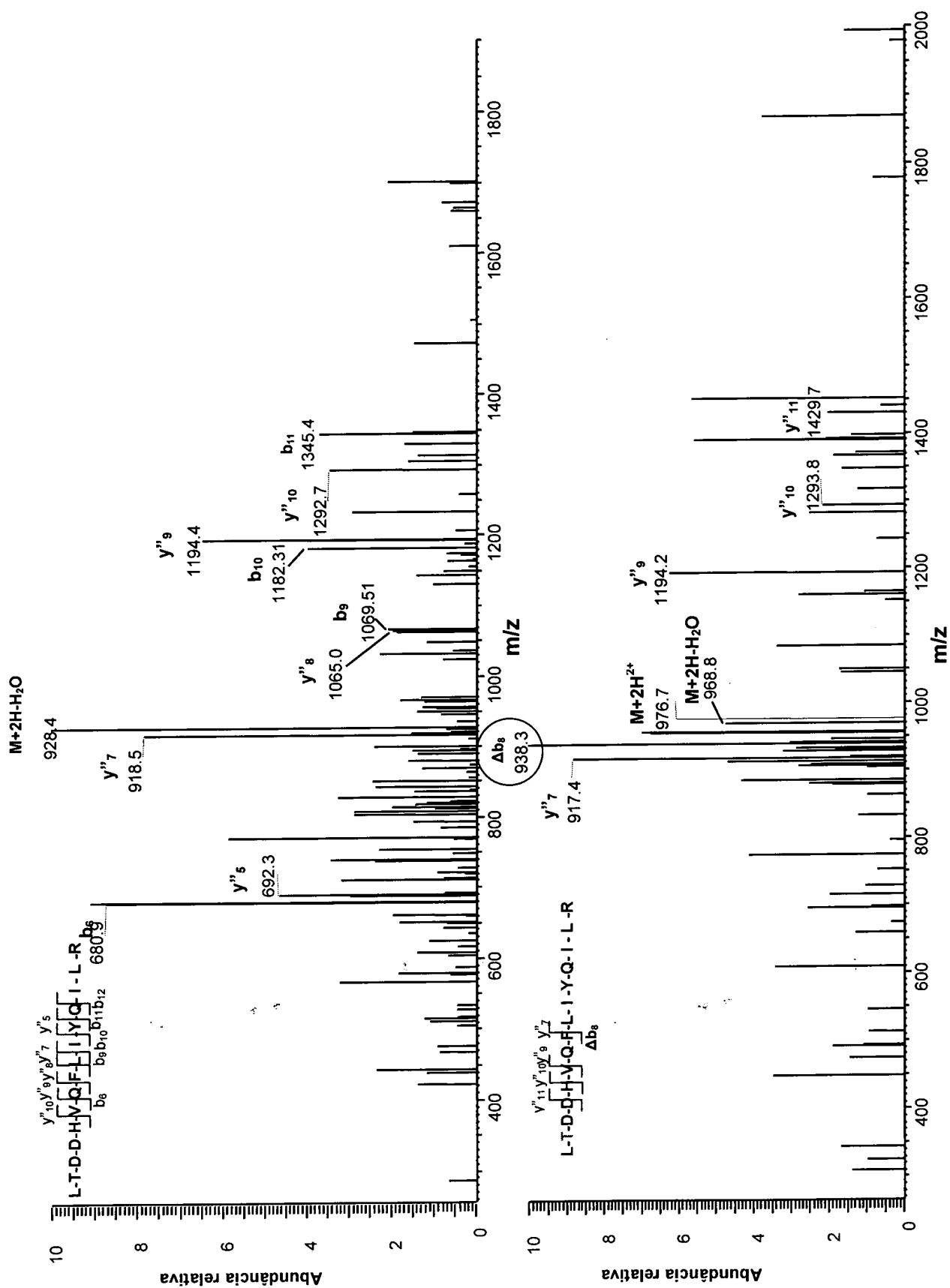


FIGURA 8



12/20

FIGURA 8 (cont.)

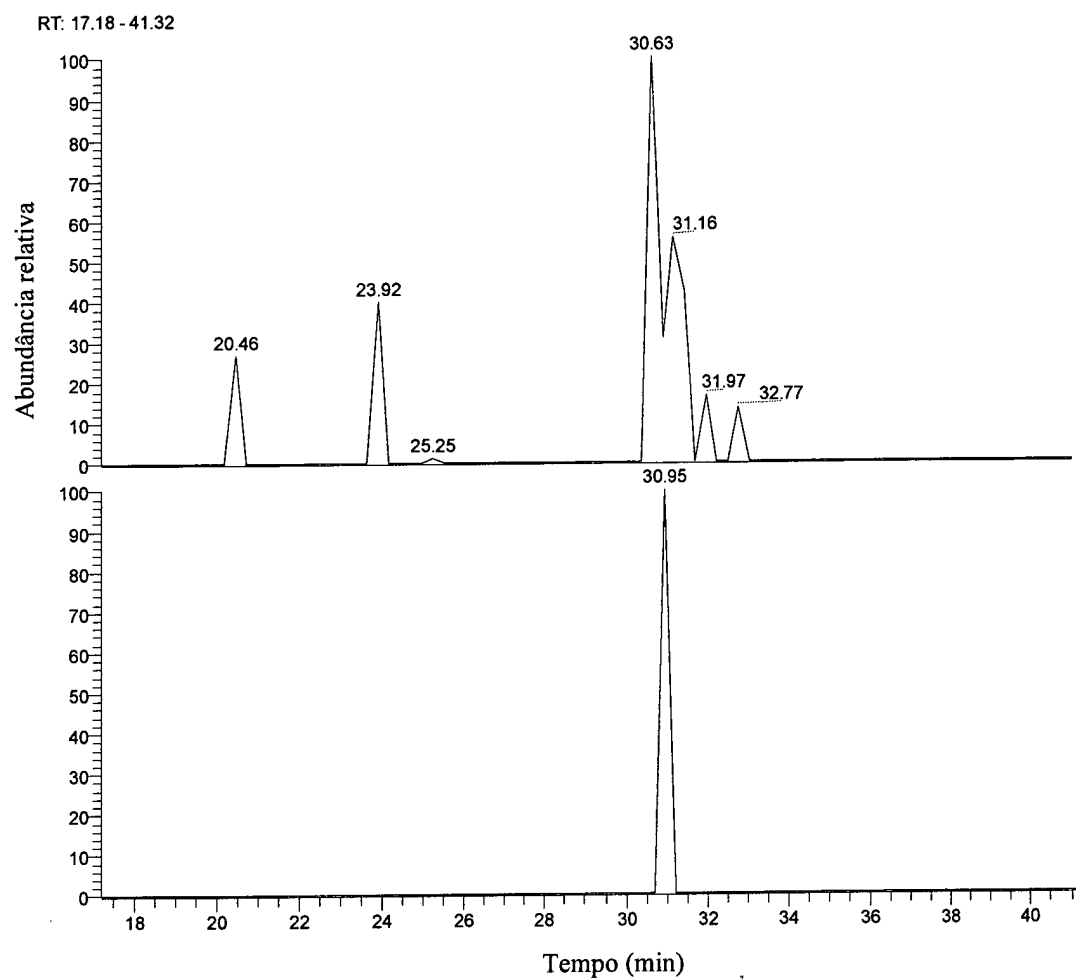
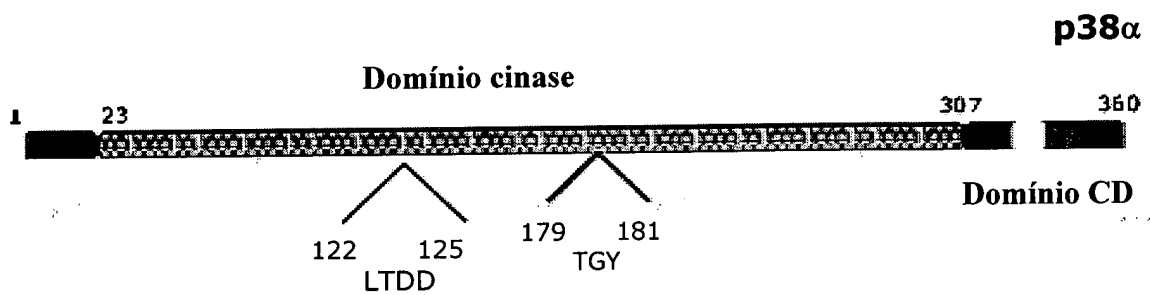
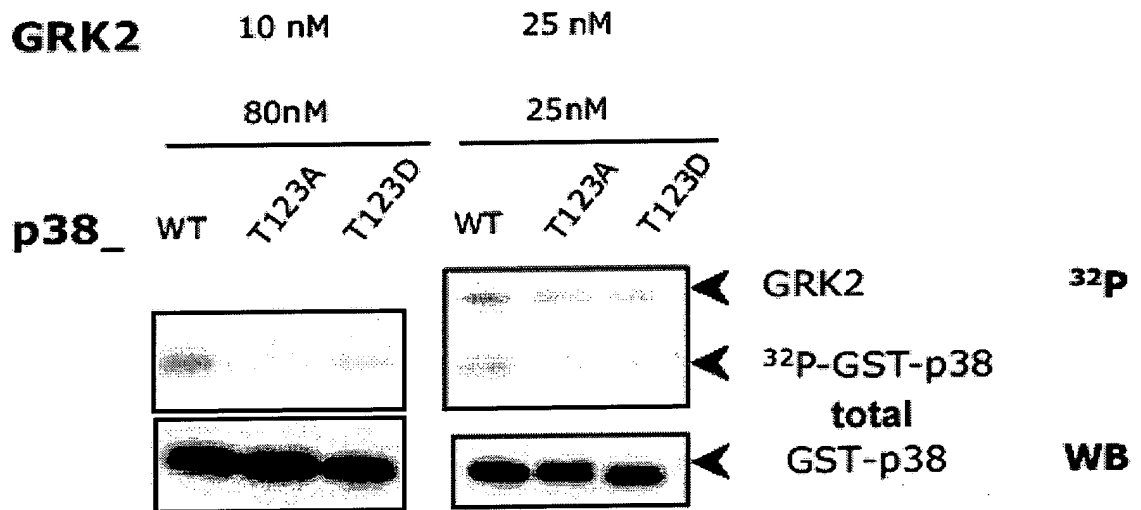


FIGURA 9



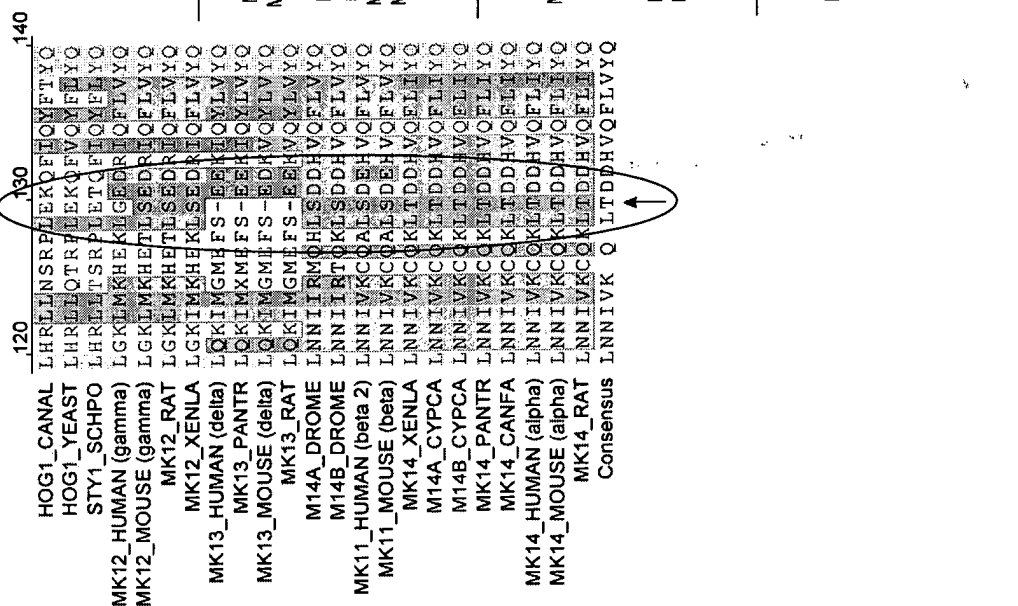
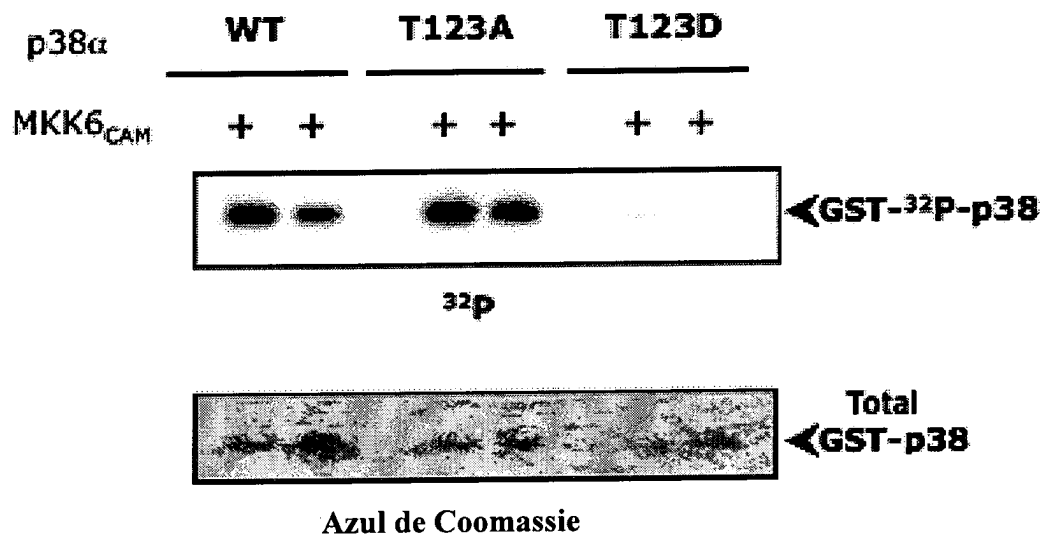


FIGURA 11

A



B

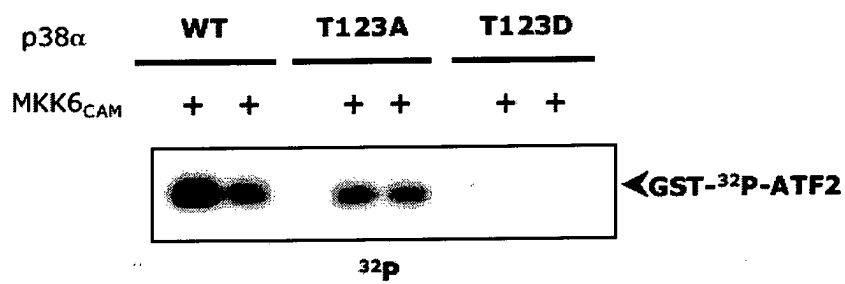
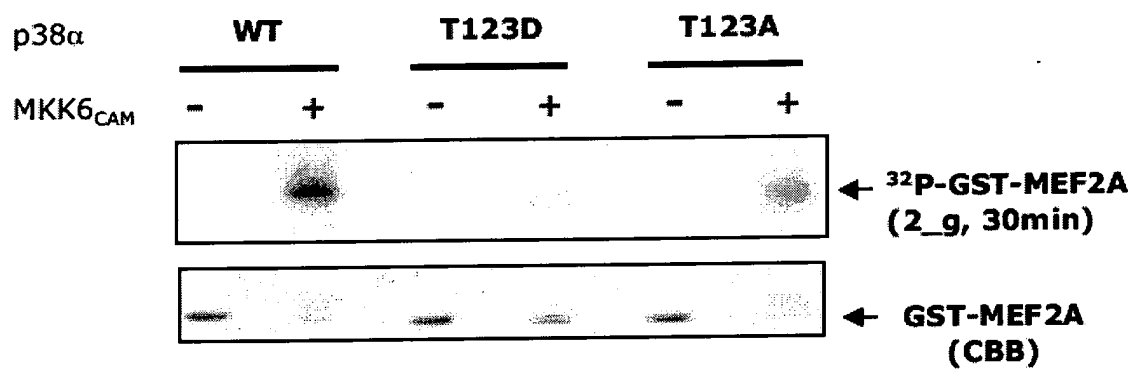


FIGURA 12

A



B

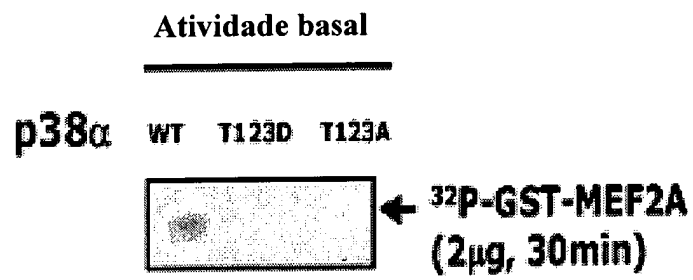


FIGURA 13

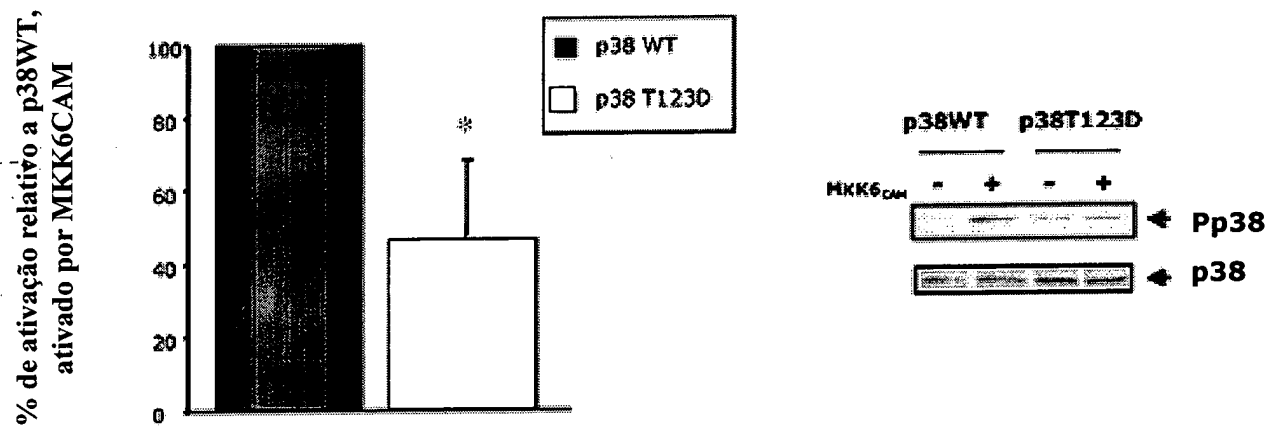


FIGURE 14

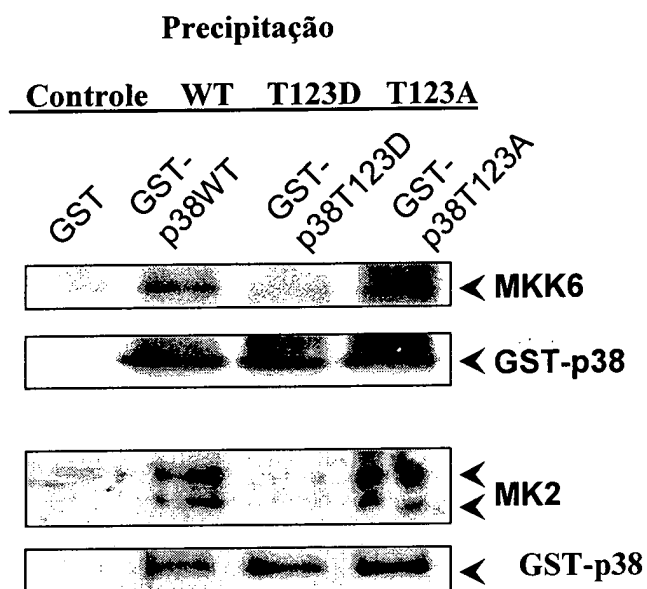


FIGURA 15

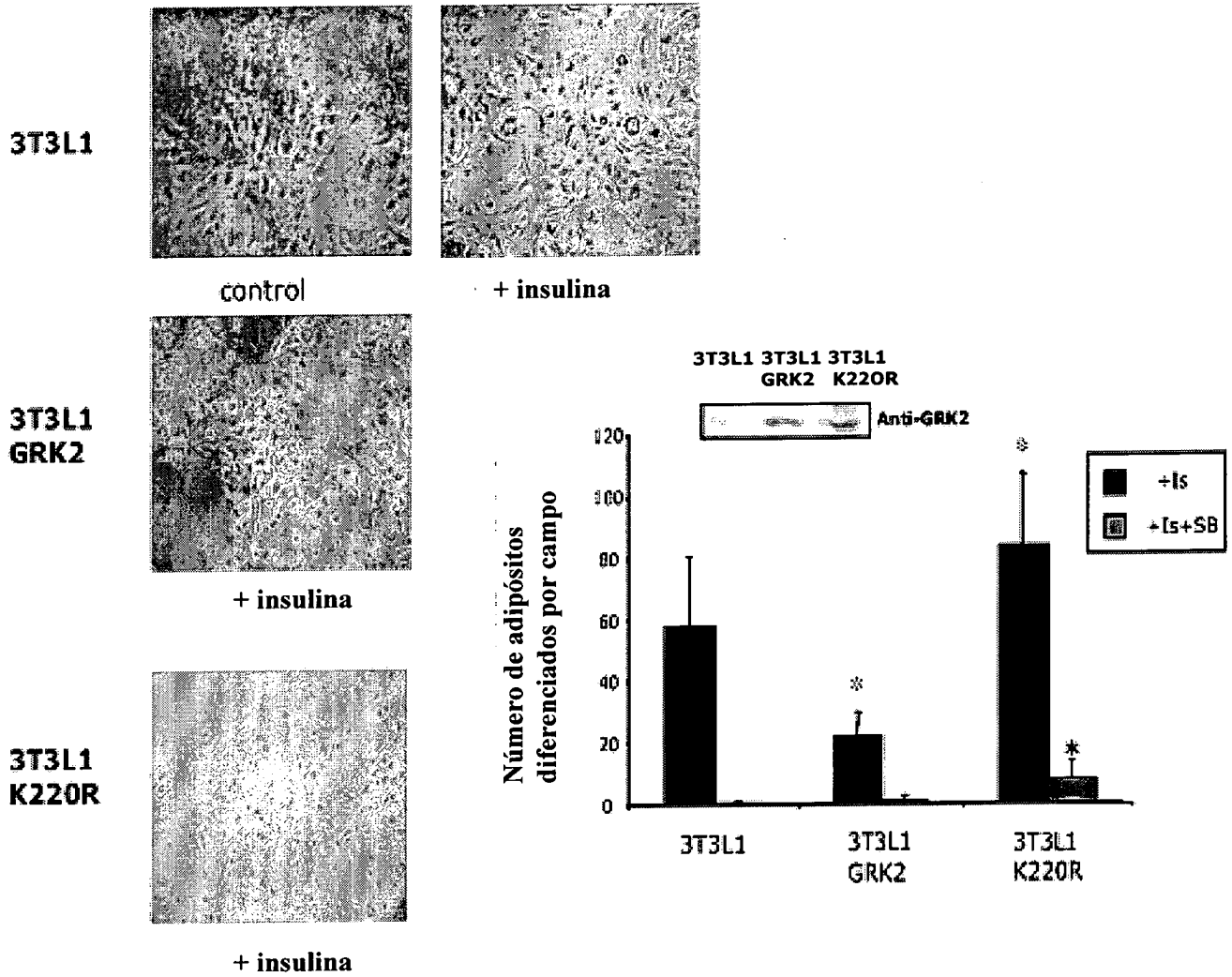
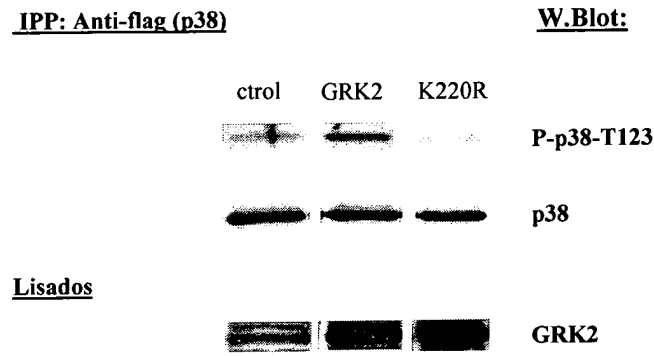
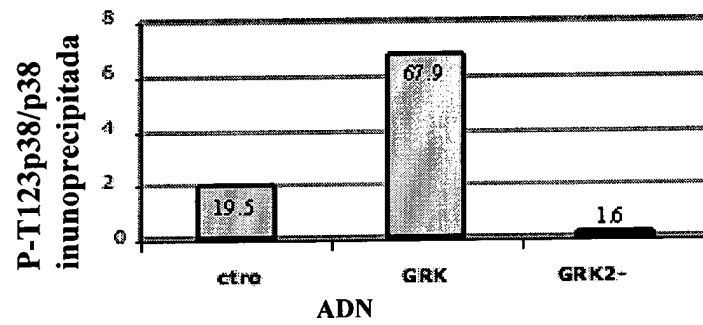


FIGURA 16

A



Valores obtidos por densitometría
de W. blot



B

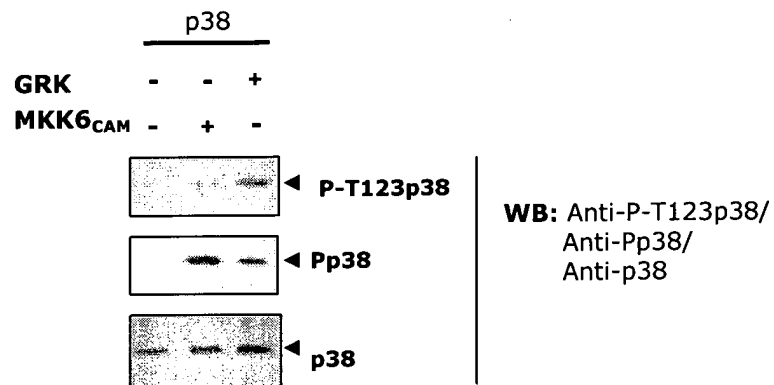


FIGURA 17

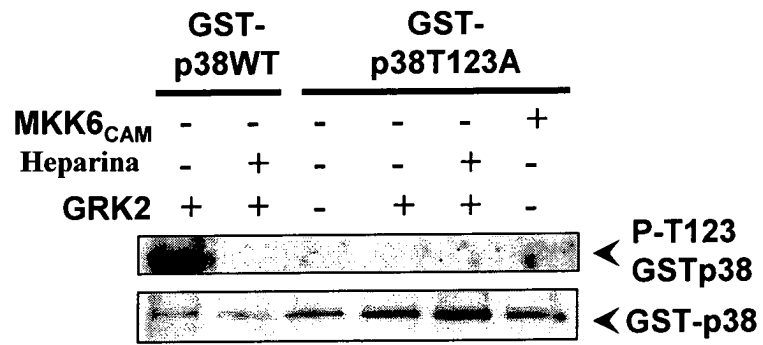
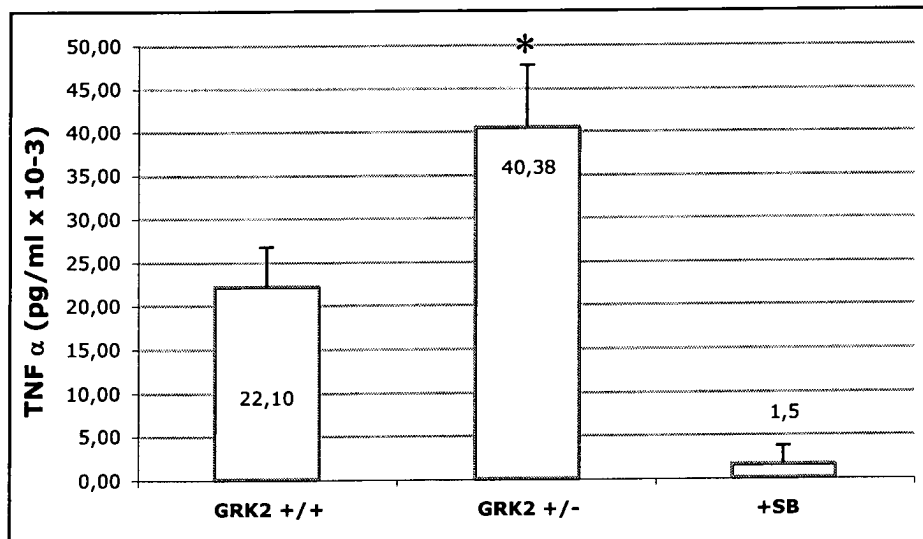


FIGURA 18



RESUMO

**"NOVO SÍTIO DE FOSFORILAÇÃO DE PROTEÍNAS CINASE
ATIVADAS POR MITÓGENO, PROTEÍNAS MODIFICADAS E APLICAÇÕES".**

5

Foi identificado um novo sítio de fosforilação de
proteínas cinase ativadas por mitógeno (MAPK). As MAPKs
fosforiladas no dito sítio de fosforilação podem ser
utilizadas como marcador diagnóstico de patologias mediadas

10 por MAPKs.