

4. Discussão

Thevissen, K. e colaboradores (2003) propuseram um modelo de interação entre defensinas de planta e fungos em que estas interagem com esfingolipídios complexos em domínios específicos da membrana (“rafts”) e em seguida são internalizadas implicando na sua interação com possíveis alvos intracelulares. No entanto, não foram identificadas ou caracterizadas proteínas intracelulares como alvos interativos das defensinas antifúngicas de planta e os dados na literatura são restritos a interações entre defensina de plantas e esfingolipídios complexos na membrana de fungos. Para comprovar a hipótese de interação das defensinas com componentes intracelulares, faz-se necessário identificar proteínas de fungos capazes de interagir fisicamente com as defensinas. O modelo de Shai-Matsuzaki-Huang ou “modelo do tapete” sugere haver dois mecanismos desacoplados de ação das defensinas: a difusão das defensinas para o citoplasma e interação com componentes internos ou a ruptura violenta da membrana plasmática, ambos mecanismos associados à interação entre as defensinas e componentes da membrana (Zaslloff, M., 2002b). Por outro lado, uma pergunta das mais controversas é se esta interação entre defensina de planta e esfingolipídio da membrana pode estar sinalizando uma cascata de eventos intracelulares sem nenhuma interação direta da defensina com proteínas intracelulares do fungo. Portanto, primeiramente investigou-se se o mecanismo de ação antifúngica de defensinas de planta após internalização no citoplasma do fungo envolve interação física direta com o proteoma do fungo.

Neste estudo, o sistema de rastreamento de interações proteína-proteína por Duplo-Híbrido foi utilizado para identificar proteínas da *N. crassa* capaz de interagirem diretamente e fisicamente com a defensina de planta Psd1 da ervilha de jardim. Nove candidatos selecionados pelo método em estudo apresentaram homologias de seqüência com proteínas nucleares (Tabela 2). Dentre estas proteínas nucleares, houve uma, detectada com maior frequência, com domínios F-box e WD-repeat, relacionada ao controle do ciclo celular nas fases S/G2/M. A ligação da Psd1 com esta proteína de *N. crassa* foi confirmada *in vitro* pelo ensaio

de “GST-pull down” (Figura 16). Esta interação física e direta pode ser uma nova ferramenta para se estudar o papel da ciclina F no ciclo celular.

A ciclina F humana foi primeiramente identificada por complementação de mutantes *cdc4* da levedura *S. cerevisiae* sensíveis à temperatura com uma biblioteca de cDNA humano. A proteína Cdc4 é requerida para a entrada da célula da levedura na fase S do ciclo celular (Bai, C., Richman, R., e Elledge, S.J., 1994; Arooz, T. et al., 2000). A ciclina F humana e a proteína Cdc4 da levedura apresentaram um domínio comum, denominado “F-box”, encontrado mais tarde em outras proteínas conservadas durante a evolução da levedura ao organismo humano (Bai, C. et al., 1996). A expressão da ciclina F durante o ciclo celular inicia-se na fase S, alcança um pico máximo na fase G2 e desaparece quando as células entram em mitose. Esta é fosforilada justamente antes da célula entrar em mitose (Bai, C., Richman, R., e Elledge, S.J., 1994). Embriões de ratos cujo genoma falta a ciclina F (genótipo *CycF^{-/-}*) morreram após 10.5 dias, em média, devido a defeitos grosseiros no desenvolvimento placentário. Fibroblastos de embriões de rato com genótipo faltando a ciclina F (*CycF^{-/-}*) exibiram inúmeros defeitos relacionados a progressão do ciclo celular. Logo, a ciclina F é essencial para o desenvolvimento embrionário e participa de eventos do ciclo celular (Tetzlaff, M.T. et al., 2004).

As quinases dependentes de ciclinas (Cdks) são um grupo de proteínas chave no controle do ciclo celular. O complexo Cdk-ciclina possui uma subunidade catalítica, a quinase que fosforila proteínas específicas nos resíduos de serina e treonina, ligada a uma subunidade reguladora, a ciclina. Em particular, não foi ainda descrito na literatura um parceiro Cdk para a ciclina F apesar desta ser fosforilada. A ciclina B1, como por exemplo, se liga a Cdk1 (ou Cdc2) e a ciclina A se liga a Cdk2, enquanto, a ciclina F é chamada de ciclina “órfã”. Cada tipo de complexo ciclina-Cdk, ou em particular a ciclina “órfã” F, garante a alternância temporal dos diferentes tipos de ciclinas no ciclo celular, ativando em determinado tempo um mecanismo para a sua própria destruição. O ciclo sequencial desses complexos é garantido pela proteólise dos componentes necessários a fase anterior (DePamphilis, M.L., 2003).

A análise dos domínios conservados nas seqüências de ciclina F de diferentes organismos pela bioinformática indica a possibilidade de reação cruzada entre o anticorpo monoclonal anti-ciclina F humana (disponível para a

compra pela BD Biosciences cat #: 556598) e a ciclina F de diferentes espécies. Deste modo, pode-se sugerir um experimento para melhor caracterizar o candidato Duplo-Híbrido ciclina F da *N. crassa* (Y1) através da adição do anticorpo anti-ciclina F humana no lisado do sistema de expressão de *E. coli* transformada com pGEX-Y1 da Figura 14. O alinhamento da seqüência da ciclina F 4nc448 040 da *N. crassa* com a ciclina F humana apresentou 53,99% de similaridade e 35,80% de identidade.

À medida que os diferentes componentes da maquinaria do ciclo celular foram sendo clonados e seqüenciados, ficou claro que famílias de proteínas participando em eventos do ciclo celular, tal como as ciclinas, eram conservadas e suas funções co-relacionadas entre as diferentes espécies. Devido a esta maquinaria do ciclo celular ser altamente conservada, muitas pesquisas sobre a regulação da proliferação celular a partir de um modelo simples de célula-única, como a levedura, foram re-direcionadas para modelos multicelulares, examinando a regulação do ciclo celular durante o desenvolvimento de um tecido ou organismo (Dyer, M.A. e Cepko, C.L. 2001).

Assim como em outros tecidos neurais, os eventos na retina em desenvolvimento ocorrem numa ordem precisa e pré-determinada. A retina está organizada em múltiplas camadas de corpos celulares e de prolongamentos sinápticos, onde as células podem ser identificadas por sua posição, morfologia, propriedades bioquímicas e funções (Adler, R., 1986).

Para estudar o papel da interação *Psd1*-ciclina F, a retina em desenvolvimento de ratos neonatos mostrou-se um modelo adequado, uma vez que o período dado pelas transições S/G2/M no ciclo celular corresponde exatamente ao período de expressão da ciclina F durante o ciclo. Neste modelo, para cada volta no ciclo celular, a síntese de DNA na fase S ocorre na parte interna central da NBL, enquanto as transições S/G2/M ocorrem à medida que os núcleos vão migrando para a parte externa da NBL, onde permanecem durante a fase M (Hayes, N.L. e Nowakowski, R.S., 2000). Desta forma as fases do ciclo celular, durante a passagem de S para G2 e de G2 para M correlacionam-se diretamente com as posições intercinéticas do núcleo durante a migração.

No sistema da retina em desenvolvimento, o peptídeo *Psd1* impediu a passagem do ciclo celular de S para G2 como medido pela migração nuclear intercinética (Figura 17). O resultado apresentado levanta a questão da *Psd1*

bloquear a migração nuclear via interação com a ciclina F justamente porque o bloqueio ocorreu durante o período do ciclo celular, compatível com a expressão da ciclina F. O efeito da *Psd1* sobre a migração nuclear intercinética é de inibição, impedindo a progressão do ciclo celular da fase S para a G2. O mecanismo pelo qual o peptídeo *Psd1* impede a migração dos núcleos e a passagem das células da fase S, em direção à fase G2, não está esclarecido.

Verifica-se durante a análise microscópica do sistema da retina de rato em desenvolvimento na presença de *Psd1* (Figura 17b), que algumas células proliferantes no final da fase S escapam do bloqueio induzido pela *Psd1*. Observa-se nesta figura, um padrão heterocromático de marcação para BrdU, caracterizado pela marcação pontilhada não-homogênea dos núcleos. Como descrito na literatura (Takahashi, T., Nowakowski, R.S. e Caviness, V.S., 1992; Rizzoli, R. et al., 1992; Mazzotti, G. et al., 1998. Hayes, N.L. e Nowakowski, R.S., 2000), este padrão heterocromático de marcação para BrdU representa incorporação de BrdU no final da fase S para G2. Desta maneira, as células que estão no final da fase S, entrando na fase G2, provavelmente já não possuem seus núcleos sensíveis ao bloqueio pelo peptídeo *Psd1*, permitindo, desta forma, a migração intercinética. A partir deste resultado, sugere-se a existência de uma janela de sensibilidade ao peptídeo *Psd1* na transição da fase S para G2 do ciclo celular.

Uma outra questão a ser considerada é que a redução do número de núcleos que chegaram ao terço externo da NBL, após o tratamento com *Psd1*, poderia ser decorrente da morte celular induzida por *Psd1*. Como os números totais de núcleos marcados com BrdU do grupo controle e tratado com *Psd1* foram equivalentes, sugere-se que o peptídeo *Psd1* interfere na migração nuclear propriamente dita, sem induzir a morte das células proliferantes (Figura 18 – comparar A com B). Além disso, células mortas apresentam picnose nuclear, marcada pela presença de núcleos de aparência escura, retraída e com cromatinas condensadas (Rehen, S.K., 1996). Não foram detectados núcleos picnóticos, como pode ser constatado na Figura 18B, sugerindo que não houve indução de morte celular durante o tratamento com *Psd1* neste sistema. Desta forma, *Psd1* deve estar atuando sobre alvos intracelulares que controlam o ciclo celular e a migração nuclear intercinética.

A migração nuclear tem sido estudada em núcleos em movimento em direção às células filhas na levedura, em direção à região apical de hifas em

fungos filamentosos em crescimento, como também em direção ao córtex da drosófila em desenvolvimento e em migrações específicas no desenvolvimento de *C. elegans* (Morris, N.R., 2000). O alto grau de homologia entre a proteína NUDF responsável pela migração nuclear no fungo filamentosso *Aspergillus nidulans*, e a proteína humana LIS1, requerida na migração neuronal no cérebro em desenvolvimento, sugere funções e mecanismos conservados (Xiang, X., 1995).

Mutantes nos genes de tubulina alfa e beta do *A. nidulans* mostraram que microtubulos (MTs) são cruciais para a migração nuclear e a divisão celular no fungo filamentosso. No desenvolvimento filamentosso do fungo *Candida Albicans*, MTs são responsáveis em posicionar o núcleo na hifa e estão conectados na progressão do ciclo celular e no alongamento da hifa (Finley, K.R.e Berman, J. 2005). Entretanto, a intersecção entre as funções dos componentes envolvidos no ciclo celular, na migração nuclear, nas interações com microtúbulos e no alongamento das hifas de fungos filamentosos precisa ser desvendada.

Foi visto na literatura que o peptídeo antifúngico Auristatina PHE, derivado sintético do peptídeo marinho Dolostatina 10, causou a completa inibição da migração nuclear e da divisão celular do fungo *Cryptococcus neoformans*, rompendo microtúbulos (Woyke, T. et al., 2002). Como a relação de dependência entre a migração nuclear intercinética e o ciclo celular, ainda não está esclarecida na literatura, em nosso modelo de estudo, a retina de rato em desenvolvimento, questionou-se a possibilidade da *Psd1* estar rompendo microtúbulos do citoesqueleto, de forma a bloquear a migração dos núcleos. No entanto, os resultados mostrados na Figura 12 indicam que *Psd1* parece não causar a ruptura de microtúbulos. De fato, os núcleos do fungo *F. solani*, marcados com DAPI, apresentaram uma distribuição espacial homogênea e normal ao longo da hifa após tratamento tanto por 3 min como por 5 horas com o peptídeo *Psd1* (Figura 12 – coluna 2). Não foram detectados embotamentos de núcleos ou espaços vazios de estrutura nas extensões de hifas no campo de visão avaliado.

É possível que exista o envolvimento da ciclina F com MTs do citoesqueleto, já que foi reportado na literatura que a ciclina F transporta a ciclina B1 para o núcleo. A análise da seqüência de nucleotídeos da ciclina B1 mostra que nesta faltam domínios de localização nuclear, de modo que a interação entre ciclina F e a ciclina B1 direciona a ciclina B1 para o núcleo (Kong, M. et al., 2000).

A ciclina B1 se liga a Cdk1 (ou Cdc2) e tem um importante papel na transição da fase G2 para a fase M, fazendo parte do fator promotor da mitose e maturação (Norbury C. e Nurse P., 1992). A formação, ativação e desativação do complexo Cdk-ciclina controla a progressão do ciclo celular. Assim, deve-se investigar, no futuro próximo, se a ligação da *Psdl* com a ciclina F impede a interação entre as ciclinas F e B1. Neste caso, a ciclina B1 não seria transportada para o núcleo e isto poderia causar a descontinuidade do ciclo celular.

Como relatado na literatura, há super expressão de ciclina B1 em vários tumores malignos, principalmente nos sistemas digestivo e respiratório, associada ao comportamento biológico agressivo da doença (Yoshida, T. et al., 2004; Yasuda, M. et al., 2002; Takeno, S. Et al., 2002; Soria, J.C. et al., 2000). Deste modo, pode-se sugerir que o peptídeo *Psdl* poderia atuar como medicamento natural, interrompendo a progressão do ciclo celular na fase S para G2 e impedindo a proliferação do tumor. Faz-se necessário investigar se a interação entre *Psdl* e a ciclina F interfere na interação entre as ciclinas F e B1, resultando no acúmulo de ciclina B1 no citoplasma e não no núcleo de células tumorais.

A atividade antimicrobiana associada à propriedade membranolítica direcionada a células de mamífero não seriam desejadas no caso destes peptídeos serem usados como medicamento. Para este fim, é importante ressaltar que o peptídeo *Psdl* não apresentou atividade lítica em membranas de várias células de mamífero, HEK-293, HSP-2, R8 e CHO, na presença de até 150 µg/mL de *Psdl*, como mensurado por meio de dois ensaios colorimétricos: através da liberação de LDH e da redução da inibição de MTT (Medeiros, L.N., 2004).

Os resultados deste trabalho estão consistentes com dados da literatura em que mostram a localização de alguns peptídeos antimicrobianos no núcleo. Curiosamente, Sadler, K. e colaboradores (2002) prepararam fragmentos sintéticos do peptídeo antimicrobiano Bactenecina 7, rico em aminoácidos prolina. Os fragmentos mais curtos mantiveram sua propriedade relacionada à permeabilidade da membrana, mas não continham a atividade antimicrobiana. Ao passo que os fragmentos longos Bac (1-24), contendo ambas as regiões catiônicas e hidrofóbicas, mantiveram ambas as propriedades. Experimentos utilizando a microscopia confocal localizaram ambos os fragmentos curtos e longos no citoplasma e no núcleo de células de monócito murínico. Recentemente, Bandholtz, L. e colaboradores (2006) demonstraram que o peptídeo catelicidina,

derivado de monócitos humano, pode ser internalizado e localizado no núcleo de células dendríticas imaturas.

A Figura 19, uma representação gráfica esquemática, sintetiza os resultados apresentados na literatura (Ver seção 1.5 da “Introdução”) e no presente trabalho. A interação da defensina de planta com a membrana plasmática, como previsto na literatura, leva a internalização da defensina na célula. Baseado nos resultados aqui apresentados, a defensina de planta, uma vez no citoplasma, é direcionada ao núcleo e impede o progresso do ciclo celular da fase S para a fase G2, possivelmente devido à sua interação com a ciclina F.

As propriedades de permeabilizar a membrana, se direcionar ao núcleo e inibir o ciclo celular, erguem a hipótese do peptídeo *Psd1* ser usado, ou até redesenhado, como vetor direcionado aos núcleos desregulados de células de tumores malignos, com o objetivo de impedir a proliferação destas células e possibilitar novas formas terapêuticas menos agressivas para o tratamento do câncer, principalmente relacionados aos sistemas digestivo e respiratório.

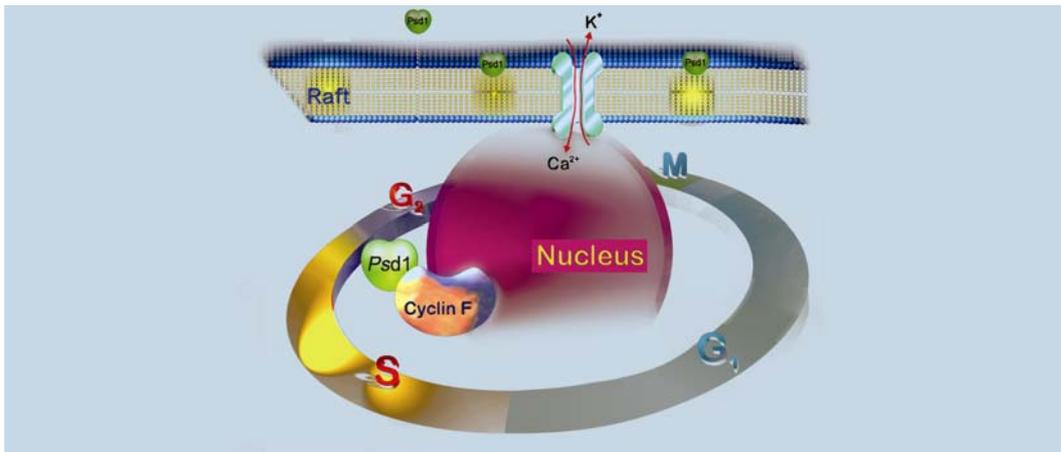


Figura 19 - Esquema representativo dos resultados referentes à literatura e a este estudo. A defensina de planta *Psd1* possivelmente interage com domínios (“rafts”) de esfingolipídios e atravessa a membrana citoplasmática. Uma vez no citoplasma, esta se direciona ao núcleo e possivelmente interage com a ciclina F, impedindo a transição da fase S para a fase G₂ do ciclo celular.