

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Fosfolipase C e sua interação com a fonte de carbono, cálcio, PKC e o ciclo de divisão celular em *Aspergillus nidulans*

Janice Aparecida Rafael Arakawa

Ribeirão Preto

2009

RESUMO

RAFAEL, J.A. **Fosfolipase C e sua interação com a fonte de carbono, cálcio, PKC e o ciclo de divisão celular em *Aspergillus nidulans***. 2009. 68 f., Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

Os conhecimentos sobre os mecanismos regulatórios responsáveis pelo crescimento dos fungos filamentosos apresentam lacunas e sua compreensão é necessária para o desenvolvimento de uma terapêutica antifúngica mais adequada, assim como para incrementar a síntese de produtos de interesse comercial. Assim sendo, estudar o envolvimento do Ca^{2+} na resposta de um fungo modelo como *A. nidulans* sob fontes de carbono diferentes constitui um meio de gerar conhecimentos sobre as características de crescimento dos fungos filamentosos, de sua resposta a adaptação ambiental e dos mecanismos que controlam essa resposta. Analisou-se na linhagem A26 e na AP27, esta última com ruptura do gene da *plcA*, o gradiente de Ca^{2+} citosólico, a morfologia das hifas, a germinação e o ciclo de divisão nuclear quando as linhagens tinham calcineurina ou calmodulina inibidas e quando os canais de Ca^{2+} estavam bloqueados ou abertos. Os níveis de Ca^{2+} citosólico na linhagem A26, crescendo em presença de glicose, foram maiores que os detectados em meio suplementado com pectina. O ciclo de germinação e divisão celular no AP27, independentemente da fonte de carbono, mostrou-se mais lento se comparado com a linhagem A26, provavelmente devido ao fato de seus estoques intracelulares de Ca^{2+} , tanto em nível vesicular quanto citosólico, serem menores. A linhagem AP27 apresentou ramificações dicotômicas nas pontas das hifas e nas hifas laterais em ambas as fontes de carbono nas quais foi cultivada, o que não se observou na linhagem A26. Quando calcineurina foi inibida por ciclosporina A, as hifas das duas linhagens, em ambas condições de cultivo, alongaram-se menos e apresentaram-se mais ramificadas, no entanto este efeito foi mais pronunciado em presença de glicose, e entre as duas linhagens pode-se dizer que foi mais intenso na linhagem AP27, demonstrando a importância dos níveis de cálcio na atividade desta enzima e conseqüentemente no desenvolvimento normal das hifas. A abertura dos canais de Ca^{2+} , por ionóforo, produziu hiperramificação em ambas as linhagens, mas principalmente quando cresciam em pectina e ao contrário do efeito observado em presença de verapamil, que bloqueia os canais de Ca^{2+} , não promoveram hifas laterais e nem pontas dicotômicas. No entanto o outro bloqueador dos canais de Ca^{2+} testado, ácido caurenóico, apresentou efeito morfológico diferente, pois as hifas tornaram-se curvas o que indica perda de polaridade. O inibidor da calmodulina (TFP) retardou a germinação, principalmente no mutante AP27, quando crescendo em presença de glicose. Lembrando que o complexo $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ ativa a calcineurina e que o mutante apresenta menores níveis de cálcio, esse resultado é justificável. A ruptura do gene *plcA* não impediu o crescimento e desenvolvimento do mutante, provavelmente porque a função desta enzima poder ser provida por outras partes do genoma, mas comprometeu os níveis intracelulares de cálcio e conseqüentemente a sua morfologia. Este estudo mostra a importância da fosfolipase C, para manutenção dos níveis intracelulares de Ca^{2+} , no desenvolvimento normal das hifas de *A. nidulans* e, pela primeira vez, demonstra que esses níveis são diferentes quando o fungo cresce em

presença de uma fonte de carbono, prontamente metabolizável ou não. Esses resultados conferem ao cálcio um papel modulador nessas condições de cultivo.
Palavras-chave: *Aspergillus nidulans*, Fosfolipase C, íons Ca^{2+}

1. INTRODUÇÃO

1.1. Sinalização celular

Organismos multicelulares podem ser considerados sociedades celulares extremamente complexas, nas quais cada indivíduo (célula) possui funções específicas e dinâmicas, objetivando o bem do organismo e não o de cada célula (HARDMAN; LIMBRID, 2005). Sua sobrevivência depende de uma elaborada rede de comunicação intercelular que coordena o crescimento, a diferenciação e o metabolismo de diferentes tecidos e órgãos. Células em pequenos grupos, na maioria das vezes, comunicam-se pelo contato direto. Através de comunicações especializadas nas membranas citoplasmáticas de células adjacentes, ocorrem trocas de pequenas moléculas e coordenação de respostas metabólicas. A resposta celular para uma determinada molécula sinalizadora extracelular depende de sua ligação com um receptor de proteína específico, localizado na superfície de uma célula-alvo ou em seu núcleo ou no citosol. O acoplamento de ligantes a muitos receptores celulares de superfície leva ao aumento ou ao decréscimo na concentração de moléculas sinalizadoras intracelulares de vida curta, referidas como mensageiros secundários. Essas moléculas sinalizadoras de baixo peso molecular incluem: 3',5'-AMP cíclico (AMPc); 3',5'-GMP cíclico (GMPc); 1,2-diacilglicerol (DAG); inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃); vários fosfolípidos de inositol (fosfoinosítídeos); e Ca²⁺ (LODISH et al., 2000). Uma superfamília numerosa de receptores, responsáveis por muitos alvos farmacológicos, interage com proteínas heterotriméricas reguladoras da ligação do GTP (guanosina trifosfato), conhecidas como proteínas G, as quais são transdutores de sinais, propagando a informação do receptor para uma ou mais proteínas efetoras. Os efetores regulados pela proteína G são enzimas como a adenilciclase, fosfolipase C, fosfodiesterases e canais iônicos da membrana plasmática seletivos ao Ca²⁺ e ao K⁺ (HARDMAN; LIMBRID, 2005).

A ativação da proteína G específica, ativa a fosfolipase C (PLC), uma enzima ligada à membrana, que hidrolisa um fosfolípido da membrana (fosfatidilinositol-4,5-bifosfato) PIP₂ para gerar dois mensageiros secundários; inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) e o lipídeo diacilglicerol (DAG). Ambos são mensageiros secundários de suprema importância no controle de muitas funções celulares. A descoberta do papel dos mensageiros secundários IP₃ e DAG trouxe o conhecimento da sinalização pelos fosfoinosítídeos (COCCO et al., 2006). Enquanto DAG ativa uma família de fosfolípidos dependente de proteína quinase. O IP₃ liga-se aos receptores dos canais de

liberação de Ca^{2+} sensíveis ao IP_3 presente no retículo endoplasmático, promovendo a liberação do Ca^{2+} e aumentando rapidamente sua concentração interna (Figura 1, pág. 3). O Ca^{2+} , por sua vez, pode ligar-se e regular diretamente os canais iônicos, ou pode ligar-se à calmodulina, formando o complexo Ca^{2+} /calmodulina o qual ativa a família dos fosfolipídeos dependentes de proteína quinase (HARDMAN; LIMBRID, 2005). DAG-PKC ou IP_3 - Ca^{2+} tornaram-se um dos elementos transdutores de sinais mais importantes por estarem envolvidos com múltiplas respostas celulares (JIN-CHUAN; et al., 2003). As fosfolipases C são consideradas importantes reguladores nos processos celulares (KUNZE et al., 2005). Cinco genes de PLCs fosfoinositídeo – específica foram identificados em três espécies de fungos filamentosos: uma seqüência de *Botryotinia fuckeliana*, uma de *Aspergillus nidulans*, e três de *Neurospora crassa* (JUNG et al., 1997). Em eucariotos superiores, fosfolipases C (PI-PLCs) fosfatidilinositol-específicas são importantes na patogênese do câncer, na regulação da ação de inúmeros fatores do crescimento e oncogênese envolvida na proliferação de células. Seis isotipos de PI-PLC (β , γ , δ , ζ , ϵ e η) e no mínimo 13 isoformas foram descritas.

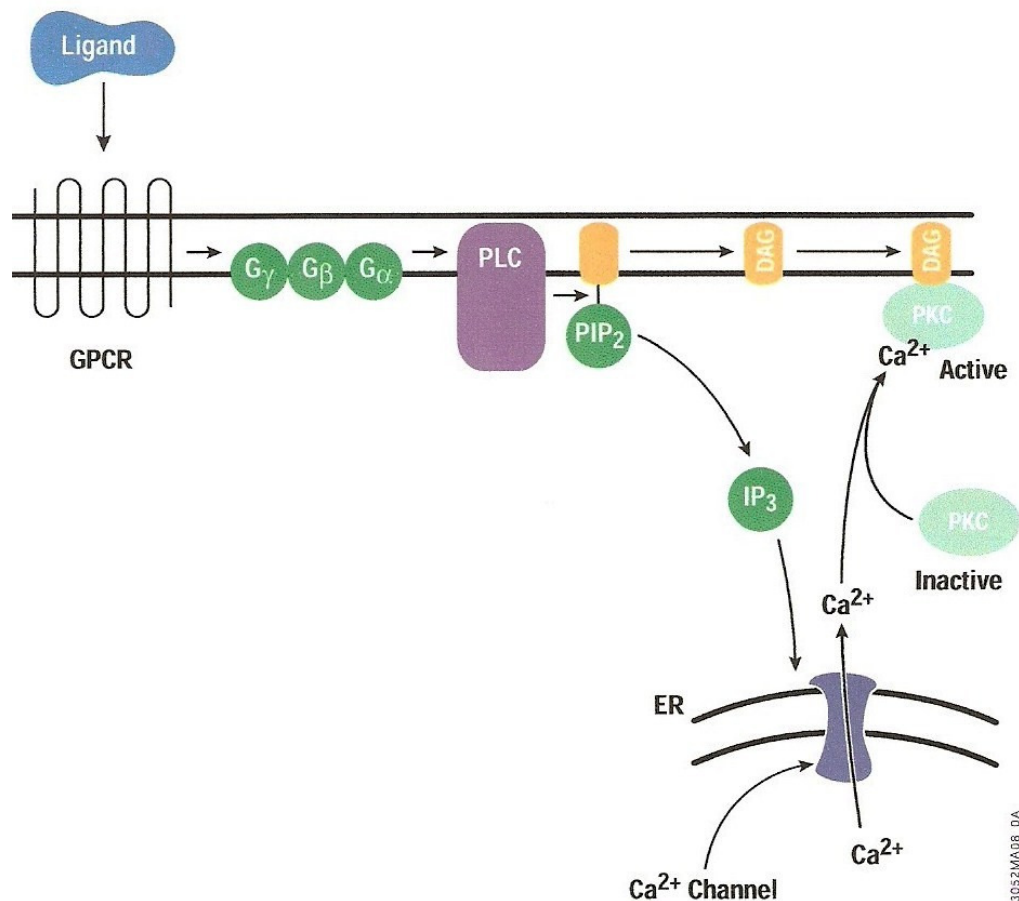


Figura 1. Representação esquemática da ativação da fosfolipase C. Estímulo externo ativa a proteína G acoplado a receptores (GPCR), que ativa uma proteína G estimulante. A proteína G ativa fosfolipase C (PLC), que cliva fosfoinositol 4,5 bifosfato (PIP₂) em 1,2,-diacilglicerol e inositol 1,4,5 trifosfato (IP₃). O IP₃ interage com canal de cálcio no retículo endoplasmático, liberando Ca²⁺ no citoplasma. O aumento dos níveis de Ca²⁺ ativa PKC, que transloca-se para a membrana ancorando-se ao DAG. (Fonte: Guide Signal Transduction Resource)

É sabido que IP₃ induz a liberação de Ca²⁺ e por isso é sugerido que esteja envolvido no alongamento das hifas. Brunton e Gadd (1991) demonstraram que vários componentes do ciclo do IP₃ são importantes no dimorfismo da hifa em espécies de *Ophiostoma*. Em *Candida albicans*, há um aumento nos níveis de IP₃ durante a formação do tubo germinativo (SILVERMAN-GAVRILA; LEW, 2002). Não está totalmente claro se esses efeitos estão ligados diretamente a liberação de Ca²⁺ e ao crescimento apical. A liberação de Ca²⁺, das vesículas mediada por IP₃, é proporcional ao número de vesículas presentes nas pontas das hifas, assim, um pequeno número de vesículas nas pontas resulta em menor quantidade de Ca²⁺ liberada (VIRAG; GRIFFITHS, 2004). Portanto, a inibição da atividade de fosfolipase C prejudicará a rota

de transdução de sinal dependente de IP_3 , devido à depleção do inositol celular que resulta, por sua vez, em diminuição nos níveis de Ca^{2+} citosólico (CHUNG, 2003).

Estudos farmacológicos indicam que a sinalização de Ca^{2+} regula numerosos processos em fungos filamentosos. Entretanto a identificação do componente principal em fungos filamentosos ainda é desconhecida (GALAGAN et al., 2003). Confirmação de detalhes do envolvimento de Ca^{2+} na transdução de sinais em fungo não tem avançado tanto como em mamíferos, em parte devido a dificuldades em quantificar Ca^{2+} citosólico livre ($[Ca^{2+}]_c$) (GADD; FOSTER, 1997).

De leveduras a humanos, a proteína quinase C (PKC) é uma enzima de importância central no processo de transdução de sinal. Como a maioria das proteínas sinalizadoras, possui uma grande família com múltiplas isoformas exibindo características individuais e um distinto modelo de distribuição no tecido. O significado biológico desta heterogeneidade não está esclarecido, mas a função de cada isoforma de PKC para a regulação celular está sendo investigada (NISHIZUKA, 1995). A via da PKC, a qual é regulada por metabólitos da degradação de fosfolipídeos de membrana como PIP_2 , controla a expressão de genes relacionados ao metabolismo da parede celular e desempenha um dos papéis principais durante a formação do brotamento de leveduras e provavelmente, na extensão da hifa nos fungos filamentosos (BANUETT, 1998). A PKC é uma enzima conservada entre os eucariotos. As células de mamíferos possuem 10 isoformas divididas em três classes. A ativação de PKCs pode implicar em inúmeros processos de doenças como câncer, inflamação, disfunções cardiovasculares, complicações diabéticas, desordens no sistema nervoso central e infecções por HIV. Por isto agentes que inibem as PKCs podem ter um grande valor terapêutico (KULANTHAIVEL et al., 1993). Em contraste, as leveduras têm somente uma ou duas PKCs com estruturas características às três classes de PKCs de mamíferos. Membros desta família são geralmente quinases serina/treonina e são encontradas exclusivamente em células eucarióticas. Muitas, senão todas PKCs, são componentes centrais na transdução de sinal (SCHIMITZ; HEINISCH, 2003) e participam na manutenção da integridade e crescimento da parede celular de fungos (RONEN et al., 2007). Em *Saccharomyces cerevisiae*, PKC regula a progressão do ciclo celular na fase de transição em G_1 e G_2/M (PARISENTI et al., 1999). As PKCs foram isoladas em fungos, incluindo fungos dimórficos e filamentosos, tais como *Ashbya gossypii*, *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *C. albicans*, *Cochliobolus heterostrophus*,

Kluyveromyces lactis, *Magnaporthe grisea*, *N. crassa*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Sporothrix schenkii*, *Trichoderma reesei*, *Tuber borchii*, *T. magnatum*, *Sporothrix schenkii*, e possuem duas isozimas de PKC (ICHINOMIYA et al., 2007; SCHIMITZ; HEINISCH, 2003). Estudos recentes revelaram que o fungo *A. nidulans* possui dois supostos genes que codificam para PKC, designados *pkcA* e *pkcB*. Apenas a proteína de *pkcA* apresentou todas as características das PKCs fúngicas (HERRMANN; SPROTE; BRAKHAGE, 2006). As PKCs de *S. cerevisiae* e *S. pombe* estão envolvidas na regulação da construção da parede celular *via* inúmeros mecanismos. Em *S. cerevisiae*, o aumento da expressão da PKC_e resultou em bloqueio do ciclo celular em G1 em um processo dependente da fonte de carbono (PARISSENTI et al., 1999). Makioka et al. (2001) sugeriram a importância da ativação da PKC no processo de crescimento e encistação em *Entamoeba invadens*. PKCs clássicas requerem Ca²⁺ e fosfolípidos para sua ativação. A PKC parcialmente purificada de *Entamoeba histolítica* foi ativada para fosforilação de histona I em presença de cálcio, fosfolípido e diacilglicerol (DE MEESTER et al., 1990), sugerindo a necessidade de Ca²⁺ para sua ativação. Entretanto, a importância fisiológica das PKCs em fungos filamentosos ainda não foi totalmente elucidada (ICHINOMIYA, et al., 2007).

MAPKs (proteína quinase ativada por mitógeno) constituem um grupo de proteínas quinases específicas para serina/treonina que funcionam em cascata de proteína quinase. Estas regulam diversas funções celulares como a osmoregulação, biossíntese da parede celular, crescimento e diferenciação. Um gene de *A. nidulans* clonado e seqüenciado, codificou a síntese de uma proteína quinase com alta similaridade a proteína quinase ativada por mitógenos. Este gene demonstrou estar envolvido na construção da parede celular e morfogênese em espécies de leveduras e foi requerido para o crescimento polarizado normal em inúmeros estágios da formação da colônia (BUSSINK; OSMANI, 1999). MAPK integra sinais de múltiplos receptores incluindo dois sistemas de componentes de sinalização que consiste de histidina quinase e seu regulador responsável. Foram identificadas nove proteínas MAPK na seqüência de genoma de *Neurospora* que correspondem àquelas encontradas em *S. pombe* e *S. cerevisiae*, indicando que o maquinário básico de MAPK é conservado entre estas espécies (GALAGAN et al., 2003). Muitas proteínas quinase e fosfatases têm relativamente ampla especificidade ao substrato e podem ser usadas em combinações variadas para alcançar distintas respostas biológicas (PAWSON; SCOTT, 1997).

1.2. Os fungos filamentosos e *Aspergillus*

Os fungos constituem um amplo e diverso grupo de eucariotos caracterizados pela formação de esporos, eficiência na secreção de enzimas extracelulares e um absorvente modo de nutrição. A maioria dos fungos são filamentosos, aeróbicos e terrestres. Eles são os mais versáteis dos eucariotos, capazes de resistir a severas dessecações, a extremos pHs, e a outros estresses ambientais. Bioquimicamente versáteis, os fungos produzem uma variedade de ácidos e enzimas, bem como metabólitos secundários. São responsáveis pela decomposição de substâncias orgânicas, causam a maior parte das enfermidades em plantas e em animais, mas são também utilizados em larga escala de processos fermentativos industriais para a produção de ácidos orgânicos, vitaminas, antibióticos e são ainda empregados em processos de biorremediações (BENNETT, 1997).

Como o próprio nome sugere, os fungos filamentosos crescem como filamentos cujo ápice se estende continuamente e se ramificam nas regiões subapicais pelo estabelecimento de novos eixos de polaridade e crescimento (Figura 2, pág. 8). As hifas, como são denominados tais filamentos, são formadas a partir do tubo germinativo que é emitido pelos esporos logo após o processo de germinação (HARRIS, 1999). O tubo germinativo apresenta desenvolvimento apical, estabelecendo um eixo de crescimento polarizado na ponta do tubo germinativo, fazendo com que a hifa cresça nesta direção pela deposição de parede celular (FIDDY; TRINCI, 1976). Com as divisões mitóticas dos núcleos mais próximos do ápice ocorre a formação periódica de septos. Nas hifas septadas, os núcleos do compartimento apical permanecem mitoticamente ativos e realizam divisões nucleares sincronizadas, ao contrário dos núcleos presentes nos outros compartimentos, que são bloqueados na interfase (CLUTTERBUCK, 1970). A sincronização da divisão nuclear, entretanto, é perdida quando a velocidade de crescimento diminui em resposta à limitação de carbono e nitrogênio (ROSENBERGER; KESSEL, 1967).

À medida que vão se dividindo, os núcleos precisam ser continuamente transportados para o ápice, uma vez que as hifas se estendem continuamente. Como na maioria dos fungos filamentosos, a migração nuclear em *A. nidulans* ocorre principalmente em direção ao ápice da hifa, embora uma variedade de movimentos nucleares diferentes e até retrógrados tenham sido observados (SUELMAN; FISCHER, 2000). Um dos principais componentes do processo de secreção e crescimento apical é a parede celular. Embora não seja a parede celular quem determina a polaridade, sua

organização correta é um pré-requisito necessário para o crescimento polarizado normal no gênero *Aspergillus* (DEBONO; GORDEE, 1994; BORGIA et al., 1996). A parede celular fornece suporte estrutural e mantém a forma assimétrica da célula.

Os aspergilli compreendem um grupo de fungos filamentosos que acumulam mais de 200 milhões de anos de evolução. Dentre os mais de 185 *Aspergillus*, são inúmeros os que têm um impacto na saúde humana e na sociedade, incluindo 20 patógenos humanos, bem como espécies benéficas usadas para produzir enzimas de aplicação industrial, alimentos e outros produtos de interesse comercial. Em contraste com a maioria dos aspergilli, *A. nidulans* possui um ciclo sexual bem caracterizado e um sistema genético bem desenvolvido (GALAGAN et al., 2005). A maioria das espécies de *Aspergillus* duplica seus esporos tanto por processo sexual como assexual. Alguns, incluindo *A. nidulans*, são também capazes de reproduzirem-se via ciclo parassexual. O ciclo assexual (Figura 2, pág. 8) é a maneira primária para dispersão e proteção do genoma do fungo em condições desfavoráveis (WARD et al., 2006).

O primeiro passo para a germinação é a incorporação de água, que resulta na expansão do conídio e aumento da adesão em seu substrato. O início da germinação do conídio ocorre pelo reconhecimento da fonte de carbono (preferencialmente glicose) (OSHEROV; MAY, 2001). No período de aproximadamente quatro horas ocorre a primeira divisão mitótica, sendo o tempo necessário para a quebra completa da dormência. Após 8 horas, o conteúdo citoplasmático aumenta em 10 vezes e o conteúdo de DNA aumenta em 8 vezes, ou seja, três divisões nucleares se completam sincronicamente (FIDDY; TRINCI, 1976).

Uma ampla coleção de mutantes condicionais de *A. nidulans* tem sido gerada e usada para identificar loci envolvidos em vários processos do crescimento (KAMINSKYI; HAMER, 1998). *A. nidulans* tem sido utilizado com sucesso para identificar e isolar genes envolvidos com controle do ciclo celular (RASMUSSEN et al., 1990). Selecionamentos genéticos em *A. nidulans* e *N. crassa* têm identificado numerosos mutantes que alteram a frequência de ramificações e interferem em diversos processos celulares, incluindo tráfego de vesículas, organização de membranas e controle do ciclo celular. A maioria das hifas em fungos exibe um gradiente de cálcio apical, tendo uma evidência que a dissipação deste gradiente permite a formação de ramos na ponta das hifas. Além disto, mutações que perturbam a sinalização de cálcio em *N. crassa* e *A. fumigatus* tipicamente causam hiperramificação na ponta das hifas (SEMIGUINI; HARRIS, 2008).

Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

