

## DISCUSSÃO

No presente trabalho o papel funcional da PLD2 em diferentes processos celulares foi estudado utilizando as células da linhagem de mastócitos RBL-2H3, estavelmente transfectadas para a super expressão de PLD2 catalítica ativa (células CA) ou catalítica inativa (células CI). As células CI apresentam alterações morfológicas que envolvem o aparelho de Golgi e a distribuição de microtúbulos. Nestas células o aparelho de Golgi se encontra espalhado ocupando uma área maior do citoplasma. Estas células, quando estimuladas, apresentam microtúbulos desorganizados. Nossos dados mostram que a PLD2 está envolvida na manutenção do aparelho de Golgi e da estrutura celular.

Os resultados deste estudo mostram que a PLD2 está localizada no citoplasma, sendo abundante na região justanuclear, principalmente das células CI, o que indica uma co-localização com o aparelho de Golgi. A imunomarcação destas células realizada em nosso laboratório com um outro anticorpo anti-PLD2 (cedido pelo Dr. Dennis Shields, Departments of Developmental and Molecular Biology and Anatomy and Structural Biology, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, New York) mostra uma localização desta proteína estritamente no aparelho de Golgi. Isto sugere que este anticorpo tem maior afinidade para a PLD2 associada ao aparelho de Golgi. As publicações do laboratório do Dr. Dennis Shields mostram que a PLD2 foi localizada em associação com cisternas e vesículas do aparelho de Golgi em células endócrinas (Freyberg *et al.*, 2002).

Nossas observações mostram que nas células CI o aparelho de Golgi está disperso pelo citoplasma. A incubação com o 1-Butanol, que bloqueia a produção de PA pela PLD, também resulta na desorganização estrutural do aparelho de Golgi nas linhagens CA, VET e RBL-2H3, que passam a apresentar o fenótipo das células CI. Estes resultados sugerem que a produção de PA pela PLD2 pode ser importante para a manutenção estrutural do aparelho de Golgi. O PA possui um papel importante na manutenção estrutural do aparelho de Golgi em

células endócrinas. A presença desse lipídeo, o PA, poderia estimular a síntese de PI4,5P2 que seria necessário para a manutenção estrutural e funcionamento do aparelho de Golgi. A super expressão de um mutante para a PI4-quinase (*PtdIns4-kinase*) resultou na desorganização do aparelho de Golgi de modo semelhante ao observado com a incubação com 1-Butanol. Assim, Siddhanta e colaboradores (2000) sugerem que a diminuição da síntese de PI4,5P2 interrompe ligações entre proteínas do citoesqueleto e da membrana levando a uma fragmentação do aparelho de Golgi (Siddhanta *et al.*, 2000).

O PA também possui um papel importante durante a exocitose, atuando na via exocítica de adipócitos (Huang *et al.*, 2005), células pancreáticas  $\beta$  (Hughes *et al.*, 2004, Waselle *et al.*, 2005), células neuroendócrinas (Vitale *et al.*, 2001, Humeau *et al.*, 2001) e mastócitos (Peng and Beaven, 2005, Choi *et al.*, 2002). Bi e colaboradores (1997) demonstraram que o bloqueio da formação do PA pela PLD com álcoois primários inibiu o transporte de duas glicoproteínas virais do retículo endoplasmático para o aparelho de Golgi em células CHO. Os autores sugerem que a PLD pode regular o transporte de membranas a partir do compartimento intermediário entre o retículo endoplasmático e o aparelho de Golgi. Estudos mais recentes têm demonstrado que o PA produzido pela PLD está envolvido na formação de vesículas recobertas por COPII, sendo importante para a manutenção do aparelho de Golgi em células NKR (Pathre *et al.*, 2003). Vesículas recobertas por COPI transportam moléculas entre as cisternas do aparelho de Golgi e o transporte retrógrado do Golgi para o retículo endoplasmático (Lee *et al.*, 2004, Rabouille and Klumperman, 2005). O uso de lipídios de membranas provenientes do aparelho de Golgi levou à identificação de fatores essenciais para a formação de vesículas, incluindo ARF-GAP1 (*ADP ribosylation factor – GTPase-activating protein 1*) (Yang *et al.*, 2002, Lee *et al.*, 2005), BARS (*Brefeldin-A ADP-ribosylated substrate*) (Yang *et al.*, 2005, Yang *et al.*, 2006) e ácido fosfatídico sintetizado diretamente pela PLD2 (Yang *et al.*, 2008). ARF-GAP1 além de ser um regulador negativo

para ARF GTPase *cycle*, é um efetor de ARF1, e também é um componente importante do complexo COPI. Por outro lado, a BARS atua no estágio de fissão das vesículas recobertas por COPI. Yang e colaboradores (2008) sugerem que o ácido fosfatídico pode atuar de dois modos na formação de vesículas: (i) atuando diretamente na formação de vesículas permitindo que BARS realizem a curvatura da membrana durante a fissão de vesículas recobertas por COPI; (ii) servindo como uma fonte de DAG e, desse modo, atua indiretamente na fissão de vesículas recobertas por COPI. O DAG participa da fissão de vesículas recobertas por COPI por meio do recrutamento de ARF-GAP1 para o aparelho do Golgi (Fernandez-Ulibarri *et al.*, 2007). O mecanismo da fissão de membranas mediado pela PLD2 pode explicar o fenótipo do aparelho de Golgi das células CI, onde a ausência da fissão de vesículas estaria alterando a morfologia do aparelho de Golgi resultando em cisternas dilatadas e desorganizadas. Esta hipótese foi confirmada após a incubação das células CI com PA, por 24 horas. Nestas células a morfologia do aparelho de Golgi foi recuperada e se tornou semelhante a das células RBL-2H3.

As enzimas que constituem o aparelho de Golgi estão dispostas de modo organizado e compartimentalizado nas cisternas. Essa disposição permite o funcionamento fisiológico desta organela através do processamento biossintético das proteínas que passam pelo Golgi. Um papel importante da PLD2, descoberto no presente trabalho, foi a manutenção estrutural do aparelho de Golgi, uma organela extremamente dinâmica e complexa. A sua estrutura é mantida através de interações com microtúbulos, porém pouco se sabe como ocorre a interação entre microtúbulos, cisternas e vesículas do Golgi (Marsh and Howell, 2002). Existem evidências de que os microtúbulos possuem um papel ativo na manutenção estrutural do aparelho de Golgi. Estudos utilizando drogas como a vimblastina e o nocodazol, que inibem a formação dos microtúbulos, permitiram observar a fragmentação do aparelho de Golgi, que resultou na formação de cisternas dilatadas e espalhadas pelo citoplasma (Robbins

and Gonatas, 1964; Thyberg and Moskalewski, 1985). Interessantemente, descobriu-se que o aparelho de Golgi não precisa estar intacto ou justanuclear para desenvolver a maior parte de suas funções (Rogalski *et al.*, 1984; Cole *et al.*, 1996). Assim, os microtúbulos não são necessários para o transporte vesicular constitutivo do Golgi para a membrana plasmática, porém o transporte de lisossomos e grânulos secretores pode ser prejudicados com a despolimerização dos microtúbulos (Scheel *et al.*, 1990). Na maioria das células o Golgi está associado com o centro organizador de microtúbulos (MTOC) (Burkhardt, 1998). Nossos resultados indicam que a organização dos microtúbulos pode estar comprometida nas células CI, pois é difícil de visualizar um MTOC e os microtúbulos estão desorganizados nestas células. Nosso trabalho demonstra, pela primeira vez, uma relação entre PLD, estrutura do aparelho de Golgi e distribuição dos microtúbulos.

Os dados da literatura concordam que as isoformas de PLD são expressas na maioria dos tecidos de mamíferos, com a exceção de PLD1 que não foi detectada em tecidos renais (Zhao *et al.*, 2000). Em células HL-60 e células pancreáticas- $\beta$  somente a PLD1 é expressa, enquanto que em células PC12K (*rat pheochromocytoma*) só a PLD2 é expressa. Por outro lado, as células EL4 (*murine lymphoma*) não expressam PLD1 ou PLD2 (Meier *et al.*, 1999), enquanto em outros tipos celulares ambas as isoformas são expressas. Os níveis de expressão das duas isoformas variam bastante entre os tecidos da mesma espécie, sugerindo assim diferentes papéis funcionais entre estas isoformas. O mRNA da enzima PLD2 é expresso em diversos tecidos, sendo mais abundante na placenta, timo, próstata, ovário, útero, tireóide, medula espinhal e traquéia, e em menores níveis no fígado, músculo esquelético, testículo e cérebro (Saqib and Wakelam, 1997). Estudos sobre a distribuição subcelular da enzima PLD têm sido inconsistentes. Medidas bioquímicas da atividade de PLD, após o fracionamento celular, revelou que a enzima pode estar associada com muitas membranas celulares incluindo o RE, aparelho de Golgi, vesículas secretoras e transportadoras, membrana plasmática

(Provost *et al.*, 1996, Whatmore *et al.*, 1996) e envelope nuclear (Liscovitch *et al.*, 1999). Análises imunocitoquímicas revelam que a PLD2 parece estar associada a membrana plasmática, ao citosol e vesículas submembranosas (Colley *et al.*, 1997; Honda *et al.*, 1999; Du *et al.*, 2004). Essas controvérsias ocorrem pela diversidade de tipos celulares estudados e pelos diferentes métodos usados para localizar esta enzima. A PLD endógena é uma proteína de baixa expressão e, ainda hoje, é difícil a obtenção de um anticorpo específico para sua localização. Em alguns casos, o uso de proteína fluorescente, como a GFP, pode modificar a localização de origem da proteína em estudo, não refletindo localização da proteína endógena (Rappoport and Simon, 2008).

Os resultados do presente neste trabalho demonstraram que nas linhagens celulares CA, CI, VET e RBL-2H3 não estimuladas não existe co-localização entre anti-PLD2 e a membrana plasmática. Entretanto, a PLD2 quando super expressa foi imunolocalizada, principalmente, na membrana plasmática de fibroblastos REF-52. Após estimulação dessas células com soro a enzima transloca-se para regiões restritas da borda da célula e também se redistribui da membrana plasmática para vesículas membranosas (Colley *et al.*, 1997). A PLD2, quando super expressa em células HeLa em repouso imunolocaliza-se no citosol e na membrana celular. Após um estímulo com EGF a PLD2 transloca-se para as ondulações de membrana dessas células. Como o estímulo é transiente a PLD2 retorna ao local de origem após o estímulo (Honda *et al.*, 1999). A PLD2-GFP se co-localiza com  $\beta$ -actina na membrana celular de células COS-7 e essa ligação parece inibir a atividade de PLD (Lee *et al.*, 2001). Em células RBL-2H3 que super expressam PLD2-GFP a enzima se localiza na membrana plasmática de células em repouso. Quando estas células são estimuladas a PLD2-GFP se transloca para as ondulações da membrana (O’Luanaigh *et al.*, 2002). Também, nas células RBL-2H3 transfectadas transitoriamente para super expressão da PLD2-GFP ou HA, a PLD2 foi localizada na membrana plasmática (Chahdi *et al.*, 2003). Sarri e colaboradores (2003)

também obtiveram a mesma localização da super expressão de PLD2-GFP em células RBL-2H3 na membrana plasmática. Assim, os resultados da literatura demonstram que a PLD2-GFP esta localizada na membrana plasmática e permanece nesta, provavelmente devido a fusão com a proteína fluorescente, que possui um grande peso molecular e pode estar direcionando a PLD2 para a membrana plasmática. Diferentemente dos relatos da literatura nossos resultados demonstraram que a PLD2 nas linhagens de mastócitos RBL-2H3 não co-localiza com a membrana plasmática e que o FLAG, (uma molécula fusão com apenas 8 aminoácidos ligada a PLD2), provavelmente não exerce influência na localização da PLD2 nestas células.

A PLD é ativada em mastócitos estimulados e sua participação na liberação dos grânulos secretores foi comprovada por meio da adição de etanol que inibe a exocitose mediada via FcεRI (Cissel *et al.*, 1998, Lin *et al.*, 1991). Sabe-se que a produção de DAG é necessária para a desgranulação e ocorre através da hidrólise de PIP<sub>2</sub>, uma reação catalisada pela PLC. A manutenção da produção de DAG provém da catálise de PC sintetizada pela PLD (Nakashima *et al.*, 1991, Lin *et al.*, 1992). No presente estudo a importância da produção de PA pela PLD2 na regulação da desgranulação dos mastócitos via FcεRI foi demonstrada por meio da quantificação da atividade de β-hexosaminidase liberada. Os resultados mostram que células estimuladas por 15 minutos e incubadas com 1-Butanol a liberação de β-hexosaminidase não é significativa. Ainda, quando as células CA são estimuladas por 15 minutos e incubadas com PA ocorre um aumento significativo na liberação de β-hexosaminidase em comparação com as outras linhagens.

Os nossos achados mostram que a produção de PA pela PLD2 é importante na organização de microtúbulos e na manutenção da estrutura do aparelho de Golgi. As alterações celulares relacionadas com os microtúbulos e o aparelho de Golgi afetam o processo secretor em mastócitos e, provavelmente, em outros tipos de células secretoras.

Estes achados poderão levar a novas estratégias terapêuticas para controlar a liberação de mediadores durante processos alérgicos e inflamatórios.