

**CHRISTIANE BEZERRA DE ARAUJO**

**NOVO PEPTÍDEO INTRACELULAR DERIVADO DA CICLINA D2 INDUZ MORTE  
CELULAR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientador: Prof. Dr. Emer Suavinho Ferro

Versão original

São Paulo  
2014

## RESUMO

ARAUJO, C. B. **Novo peptídeo intracelular derivado da ciclina D2 induz morte celular.** 2014. 79 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Peptídeos intracelulares são gerados a partir da degradação de proteínas no meio intracelular, e esse evento é realizado por um megacomplexo catalítico denominado proteassomo. Depois de serem clivados, esses fragmentos proteicos podem ser apresentados como antígenos via MHC I, podem ainda ser degradados em suas unidades funcionais, os aminoácidos, ou ainda, como nosso grupo tem demonstrado esses fragmentos de proteínas, contendo de 4 a 25 resíduos de aminoácidos, podem permanecer no meio intracelular e participar da regulação de eventos relacionados à sinalização celular. Neste trabalho, foi identificado um novo peptídeo intracelular denominado “peptídeo 5” (pep5). O pep5 foi identificado junto com outros 18 peptídeos por espectrometria de massas semi-quantitativa, tendo sido escolhido para análises funcionais posteriores por estar aumentado durante a fase S do ciclo celular, quando comparado às outras fases e ao grupo de células assíncronas. A liberação do pep5, a partir de sua proteína precursora ciclina D2, pode ocorrer por clivagem em sítios compatíveis com a ação do proteassomo. Para a realização de estudos funcionais, o pep5 foi sintetizado na forma natural (pep5) bem como acoplado covalentemente ao peptídeo penetrador de células (cpp; pep5-cpp), esse último para permitir sua internalização em modelos celulares e teciduais. Resumidamente, o pep5 (50 e 100 $\mu$ M), sem o cpp, não apresenta qualquer efeito biológico. Por outro lado, o pep5-cpp (50 e 100 $\mu$ M) demonstrou a capacidade de aumentar a porcentagem de morte em células HeLa e também em outras linhagens tumorais, dentre elas, linhagens de melanoma (SK MEL-28 e MEL 85), câncer de mama (SKRB), tumor de tireoide (TPC-1 e KTC-2) além de glioma de rato (células C6). O acoplamento do cpp ao N- ou C-terminal do pep5 muda sua potência (cpp-N-terminal < cpp-C-terminal), enquanto a remoção de apenas um resíduo de aminoácido do N-terminal abole completamente sua ação indutora de morte celular, sugerindo sua especificidade estrutural. Além disso, quando o N-terminal do pep5-cpp é acetilado, há uma redução da eficácia deste fragmento de ciclina em promover a morte de linhagens celulares em cultura, enquanto que substituições de Leu por Ala abolem totalmente a atividade do pep5-cpp. *In vivo*, o pep5-cpp reduziu aproximadamente 50% o volume do glioblastoma C6 em cérebros de ratos Wistar. O pep5-cpp aumentou a atividade das caspases 9, 3/7, mas não da caspase 8, e regulou a fosforilação de MAPKs e alguns de seus substratos específicos como Akt2. A morte celular induzida pelo pep5-cpp foi caracterizada ocorrendo tanto por apoptose quanto por necrose. Corroborando esses resultados, inibidores seletivos diminuíram a indução de morte celular mediada pelo pep5-cpp. Portanto, demonstramos nesse trabalho que os níveis relativos de peptídeos intracelulares variam durante fases específicas do ciclo celular. Um desses peptídeos, o pep5-cpp, foi caracterizado aqui como indutor de morte celular, tanto em modelos *in vitro* como *in vivo*.

**Palavras-chave:** Peptídeos intracelulares. Ciclo celular. Apoptose. Necrose. Morte celular.

## ABSTRACT

ARAUJO, C. B. **A novel intracellular peptide derived from cyclin D2 induces cell death.** 2014. 79 p. Ph. D. thesis (Science) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Intracellular peptides are generated by degradation of intracellular proteins and this event is realized by a catalytic megacomplex called proteasome. After being cleaved, protein fragments can be presented via MHC I as antigens, can be further degraded into their functional units, the amino acids, or as our group has showed, these protein fragments containing from 4 to 25 residues may remain in the intracellular environment and participate in the regulation of events related to the cell signaling. In this work, a new intracellular peptide called "peptide 5" (pep5) was identified. The pep5 was identified with other 18 peptides by mass spectrometry, and it was chosen for further functional analysis to be increased during the S phase of the cell cycle, when compared to the other phases and the asynchronous cells. The release of pep5 from its precursor the cyclin D2 protein can occur by cleavage in compatible sites with the action of the proteasome. To perform functional studies, pep5 was synthesized in the natural form (pep5) or covalently bound to the cell penetrating peptide (pep5-cpp), to allow its internalization in cell and tissue models. Briefly, the pep5 (50 and 100  $\mu$ M), without cpp, showed no biological effect. On the other hand, pep5-cpp (50 and 100 $\mu$ M) demonstrated the ability to increase the percentage of cell death in HeLa cells and also in other tumor cell lines, as melanoma (MEL-28 and SK MEL 85), breast cancer (SKRB), tumor thyroid (TPC-1 and KTC-2) as well as rat glioma (C6 cells). The coupling of the cpp in N- or C-terminal of the pep5 changes its power (cpp- N-terminal < cpp C- terminal), while removing only one amino acid of the N-terminus completely abolishes its action in the cell death, suggesting a structure-related action. Also, when the N-terminal of the pep5-cpp is acetylated there is a reduction in the percentage of cell death in HeLa cells, whereas substitutions Leu-Ala completely abolish the activity of pep5-cpp. *In vivo*, the pep5-cpp reduced approximately 50% the volume of rat C6 glioblastoma. The pep5-cpp increased the activity of caspases 9, 3/7, but not caspase 8, and regulated the phosphorylation of MAPKs or their specific substrates as Akt2. Pep5-cpp induced cell death was either by apoptosis and necrosis. Corroborating these results, selective inhibitors for both processes decreased the cell death. Therefore, we have shown here that intracellular peptides may act as pharmacological cell death inducers.

**Keywords:** Intracellular Peptides. Cell cycle. Apoptosis. Necrosis. Cell death.

## 1 INTRODUÇÃO

A especificidade e a robustez do módulo de controle do ciclo celular são garantidas por um equilíbrio fino entre múltiplas reações sinérgicas e antagônicas, cuja organização ainda é obscura (BJORKLUND et al., 2006). No plano bioquímico, três mecanismos de regulação serão sempre importantes e recorrentes: a) rápida indução da transcrição de genes codificadores de proteínas altamente instáveis; b) ativação/desativação funcional de proteínas muito estáveis, através de efeitos alostéricos e modificações covalentes; c) degradação específica de proteínas através da proteólise mediada pelo sistema ubiquitina-proteassomo (UPS) (DOMIAN; QUON; SHAPIRO, 1997).

Considerando a degradação de proteínas, após serem sintetizadas essas sofrem alterações estruturais que podem incorrer em alterações de suas funções naturais, e em células vivas precisam ser continuamente renovadas por serem responsáveis por processos decisivos como regulação da divisão celular, expressão gênica, entre outros (DOMIAN; QUON; SHAPIRO, 1997; LEWIS et al., 2000). Aquelas presentes no citoplasma e núcleo são degradadas por uma série de mecanismos diferentes (SOUGHAYER et al., 2004), entre esses aquele que seleciona para a degradação marcando covalentemente com poli-ubiquitinas (BAI et al., 1996; GOLDBERG, 2003; KOPELMAN, 2000; PARENTEAU et al., 2005). Uma proteína poli-ubiquitinada é degradada em peptídeos curtos (2-20 aminoácidos) em um processo dependente de ATP e catalisado por um complexo protéico de 2,4 Mega Daltons (MDa), contendo múltiplas subunidades, denominado proteassomo 26S (GOLDBERG, 2003; ORLOWSKI, 1990; SOUGHAYER et al., 2004). Acredita-se que estes peptídeos gerados pelo proteassoma sejam rapidamente hidrolisados em aminoácidos que são utilizados no processo de síntese de novas proteínas. Mas já se sabe que em células de mamíferos alguns peptídeos intracelulares escapam da degradação completa para exercerem a função de antígenos no sistema imune associados ao complexo de histocompatibilidade (MHC) classe I (KIM et al., 2003; SARIC et al., 2001).

De fato, além da conhecida ação mediada por receptores localizados na membrana plasmática, e funções antigênicas, alguns peptídeos também estão envolvidos em processos intracelulares. Sabe-se que peptídeos derivados de proteínas citosólicas, nucleares e mitocondriais existem em número bastante

significante em tecidos e células animais (BERTI et al., 2009; CASTRO et al., 2010; FRICKER et al., 2012). Esses peptídeos foram caracterizados como os substratos e produtos naturais da thimet-oligopeptidase (EC 3.4.24.15; EP24.15) (BERTI et al., 2009) e capazes de alterar a transdução de sinal iniciada por agonistas de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) como a angiotensina II ou isoproterenol (CUNHA et al., 2008). No conjunto, esses e outros resultados sugerem a presença de um novo grupo de moléculas bioativas endógenas (BERTI et al., 2009; CUNHA et al., 2008; GOMES et al., 2009; HEIMANN et al., 2007), que nosso grupo denominou “peptídeos intracelulares” (FERRO; HYSLOP; CAMARGO, 2004).

## 1.1 Objetivos

O objetivo deste trabalho foi investigar peptídeos intracelulares em processos celulares vitais como a proliferação e morte celular, a saber:

### 1.1.1 *Objetivos específicos*

- ✓ Determinar a composição peptídica (peptidoma) de células HeLa em diferentes estágios do ciclo celular, utilizando técnicas semi-quantitativas de marcação isotópica e espectrometria de massas, como anteriormente descrito (BEREZNIUK et al., 2010; BERTI et al., 2009);
- ✓ Analisar o efeito de peptídeos intracelulares específicos no ciclo celular, bem como nos processos de proliferação e morte celular.

## 2 CONCLUSÃO

- Dois peptídeos intracelulares estão aumentados em fases específicas do ciclo celular, quando células HeLa foram sincronizadas com timidina.
- Somente um destes peptídeos, o pep5 (na forma pep5-cpp), apresentou bioatividade induzindo morte celular em diversas linhagens tumorais.
- O pep5-cpp causou alterações na fosforilação de MAPKs específicas ou de seus substratos, além de aumentar a atividade de caspases 3/7 e 9.
- Este fragmento de ciclina D2 causou morte celular tanto por necrose quanto por apoptose.
- O N-terminal do pep5 é extremamente importante para sua função, mostrando uma relação entre estrutura e atividade.
- *In vivo*, o pep5-cpp diminuiu o volume de glioblastoma C6 em cérebros de ratos Wistar.

## REFERÊNCIAS\*

BAI, C. et al. Skp1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the f-box. **Cell.**, v. 86, n. 2, p. 263-274, 1996.

BEREZNIUK, I. et al. Ccp1/nna1 functions in protein turnover in mouse brain: implications for cell death in purkinje cell degeneration mice. **FASEB J.**, v. 24, n. 6, p. 1813-1823, 2010.

BERTI, D. A. et al. Analysis of intracellular substrates and products of thimet oligopeptidase in human embryonic kidney 293 cells. **J. Biol. Chem.**, v. 284, n. 21, p. 14105-14116, 2009.

BJORKLUND, M. et al. Identification of pathways regulating cell size and cell-cycle progression by rna. **Nature**, v. 439, n. 7079, p. 1009-13, 2006.

CUNHA, F. M. et al. Intracellular peptides as natural regulators of cell signaling. **J. Biol. Chem.**, v. 283, n. 36, p. 24448-24459, 2008.

DOMIAN, I. J.; QUON, K. C.; SHAPIRO, L. Cell type-specific phosphorylation and proteolysis of a transcriptional regulator controls the g1-to-s transition in a bacterial cell cycle. **Cell.**, v. 90, n. 3, p. 415-424, 1997.

FERRO, E. S.; HYSLOP, S.; CAMARGO, A. C. Intracellular peptides as putative natural regulators of protein interactions. **J. Neurochem.**, v. 91, n. 4, p. 769-777, 2004.

FRICKER, L. D. et al. Peptidomic analysis of hek293t cells: effect of the proteasome inhibitor epoxomicin on intracellular peptides. **J. Proteome Res.**, v. 11, n. 3, p. 1981-1990, 2012.

GOLDBERG, A. L. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. **Nature**, v. 426, n. 6968, p. 895-899, 2003.

GOMES, I. et al. Novel endogenous peptide agonists of cannabinoid receptors. **FASEB J.**, v. 23, n. 9, p. 3020-3029, 2009.

HEIMANN, A. S. et al. Hemopressin is an inverse agonist of cb1 cannabinoid receptors. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 104, n. 51, p. 20588-20593, 2007.

KIM, S. I. et al. Regulation of cell-surface major histocompatibility complex class i expression by the endopeptidase ec3.4.24.15 (thimet oligopeptidase). **Biochem J.**, v. 375, n. Pt 1, p. 111-120, 2003.

KOPELMAN, P. G. Obesity as a medical problem. **Nature**, v. 404, n. 6778, p. 635-643, 2000.

\*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

LEWIS, T. S. et al. Identification of novel map kinase pathway signaling targets by functional proteomics and mass spectrometry. **Mol. Cell.**, v. 6, n. 6, p. 1343-1354, 2000.

ORLOWSKI, M. The multicatalytic proteinase complex, a major extralysosomal proteolytic system. **Biochemistry**, v. 29, n. 45, p. 10289-10297, 1990.

PARENTEAU, J. et al. Free uptake of cell-penetrating peptides by fission yeast. **FEBS Lett.**, v. 579, n. 21, p. 4873-4878, 2005.

SARIC, T. et al. Major histocompatibility complex class i-presented antigenic peptides are degraded in cytosolic extracts primarily by thimet oligopeptidase. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 39, p. 36474-36481, 2001.

SOUGHAYER, J. S. et al. Characterization of tat-mediated transport of detachable kinase substrates. **Biochemistry**, v. 43, n. 26, p. 8528-8540, 2004.