

TAVANE DAVID CAMBIAGHI

**ESTUDO DO CONTROLE TRADUCIONAL DE PPAR β
DURANTE O PROCESSO DE DIFERENCIAÇÃO DE MACRÓFAGOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Fisiologia Humana.

São Paulo

2009

TAVANE DAVID CAMBIAGHI

**ESTUDO DO CONTROLE TRADUCIONAL DE PPAR β
DURANTE O PROCESSO DE DIFERENCIAÇÃO DE MACRÓFAGOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Fisiologia Humana.

Área de Concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. Rui Curi

São Paulo

2009

RESUMO

Cambiaghi TD. Estudo do controle traducional de PPAR β durante o processo de diferenciação de macrófagos [Tese]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

O receptor ativado por proliferadores de peroxissoma beta (PPAR β) é um receptor nuclear que atua como fator de transcrição e está envolvido em diferentes processos celulares tais como: apoptose, proliferação e diferenciação. A diferenciação das células THP-1 em macrófagos, induzida por PMA, é associada ao aumento da expressão de PPAR β . A UTR 5' de PPAR β regula negativamente sua síntese, porém, o mecanismo molecular envolvido não foi esclarecido. No presente estudo, o estado traducional das células THP-1 diferenciadas por PMA foi investigado em associação à superprodução de PPAR β . A presença de uORFs no transcrito de PPAR β , contendo códons de iniciação compatíveis com seqüências de Kosak, poderia ser a causa do efeito inibitório da UTR 5'. Porém, a superprodução de PPAR β nas células THP-1 diferenciadas por PMA aparentemente não está relacionada ao controle traducional convencional mediado pela fosforilação de eIF2 α . A incorporação reduzida de L-[U-14C]leucina revelou que a superprodução de PPAR β ocorre durante inibição global da tradução, confirmada pela redução dos polissomos. Além disso, desfosforilação rápida e consistente de 4E-BP1 foi observada após tratamento com PMA. 4E-BP1 desfosforilado causa inibição da iniciação da tradução e favorece a tradução de mRNAs que contém IRES. De fato, a estrutura da UTR 5' de PPAR β apresenta características de transcritos que formam IRES. Assim, a produção de PPAR β pode ser regulada por IRES e a superprodução de PPAR β ocorre concomitantemente com a inibição da tradução dependente de *cap*.

Palavras-chave: PPAR β ; Diferenciação celular; Células THP-1; Controle traducional; IRES; uORFs; 5'-UTR; 4E-BP.

ABSTRACT

Cambiaghi TD. Translation control of PPAR β during macrophage differentiation [Thesis]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

The peroxisome proliferator-activated receptor β (PPAR β) is a nuclear receptor that acts as a transcription factor involved in a wide range of cellular processes such as apoptosis, proliferation and differentiation. The differentiation of THP-1 cells in macrophages, induced by PMA, is associated with overexpression of PPAR β . Previous studies have shown that the 5'-UTR of the PPAR β negatively regulates its expression, however, the molecular mechanism involved remains unclear. In this study, the translational status of PMA-differentiated THP-1 cells was investigated in association with overexpression of PPAR β . Putative positive Kosak initiation codons are present in PPAR β uORFs and could be the cause of the inhibitory effect of its 5'-UTR. However, the overproduction of PPAR β in PMA-differentiated THP-1 cells is, apparently, not related to non conventional translation induced by eIF2 α phosphorylation. Polysome profile analysis revealed that the over production of PPAR β coincides with a decrease in the global content of polysomes. The impairment in protein synthesis was confirmed by the decrease in incorporation of L-[U-14C]leucine in to proteins. We detected a fast and consistent dephosphorylation of 4E-BP by PMA treatment. The increase in dephosphorylated 4E-BP levels is associated with inhibition of eIF4E cap-dependent translation initiation and favors the translation of mRNAs that contain IRES. In fact, the PPAR β 5'-UTR structure has some characteristics that resemble described IRES. Therefore, PPAR β is preferentially translated when global protein synthesis is inhibited and its production may be controlled by IRES.

Key words: PPAR β ; cell differentiation; THP-1 cells; translational control; IRES; uORFs; 5'-UTR; 4E-BP.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs)

Os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma, PPARs, são fatores de transcrição que fazem parte de uma superfamília de receptores nucleares, caracterizados por seu padrão de distribuição nos tecidos e pela regulação do metabolismo. Os PPARs foram originalmente identificados em 1990 e foram assim designados em virtude de serem receptores ativados por compostos que induzem proliferação de peroxissomas [Issemann and Green, 1990].

Peroxisomas são organelas pequenas com formato oval ou espiral, circundadas por uma única membrana. Estão presentes em todas as células de mamíferos, com exceção dos eritrócitos. Os peroxissomas apresentam enzimas que oxidam D-aminoácidos, ácido úrico e vários 2-hidroxi-ácidos utilizando oxigênio molecular com a formação de peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio formado é convertido em água e oxigênio pela catalase, também presente nesta organela. Os peroxissomas também apresentam enzimas envolvidas no metabolismo de lipídeos, particularmente na β -oxidação de ácidos graxos (AG) de cadeia longa e na alongação de cadeias de ácidos graxos [Schoonjans et al., 1996b] [Schoonjans et al., 1996a].

A proliferação de peroxissomas é uma resposta celular a uma variedade de compostos químicos e a certas condições fisiopatológicas que envolvem mudanças drásticas na morfologia celular e atividade das enzimas dos peroxissomas [Lock et al., 1989]. Compostos de diversos grupos químicos podem desencadear proliferação de peroxissomas como: drogas hipolipemiantes (derivados do ácido fíbrico – clofibrato, fenofibrato e benzafibrato), Wy14643, herbicidas, antagonistas de leucotrienos e fármacos antiinflamatórios não esteroidais [Jump and Clarke, 1999].

A superfamília PPAR é composta de três isotipos: α , NR1C1 (Receptor nuclear da subfamília 1, grupo C, membro 1); β/δ , NR1C2 (Receptor nuclear da subfamília 1, grupo C, membro 2) e γ , NR1C3 (Receptor nuclear da subfamília 1, grupo C, membro 3) que desempenham função importante no reconhecimento e metabolismo de lipídeos biologicamente ativos. Estes isotipos são codificados por genes específicos e apresentam padrão distinto de expressão [Bishop-Bailey, 2000;

Desvergne and Wahli, 1999; Kersten et al., 2000; Schoonjans et al., 1996a; Schoonjans et al., 1996b).

1.2 Padrão de expressão e funções celulares dos PPARs

Quanto ao papel biológico, os membros da família PPAR desempenham função chave no metabolismo de lipídeos. Todavia, as isoformas apresentam funções específicas nos diferentes tipos celulares nos quais são encontrados.

Em humanos, o PPAR α é principalmente expresso no fígado, coração, rins (tecidos caracterizados por alta taxa de oxidação de ácidos graxos), além do intestino e pâncreas [Auboeuf et al., 1997; Sher et al., 1993]. O PPAR α é expresso também em células do sistema imunológico e vasculares [Keech et al., 2005; Plutzky, 2004]. Assim, sua ativação afeta a expressão de aproximadamente 80-100 genes, que regulam a oxidação de ácidos graxos, o metabolismo lipídico e o processo inflamatório [Duez et al., 2001; Kliewer et al., 2001; Lefebvre et al., 2006; Plutzky, 2003; Plutzky, 2004]. Além disso, agonistas deste receptor melhoram lesões arteroscleróticas e quadros de dislipidemia [Ahmed et al., 2007; Knight et al., 2003; Linton and Fazio, 2000].

PPAR γ é classicamente caracterizado por sua expressão e função no tecido adiposo, aonde foi primeiramente identificado. É também expresso no músculo esquelético, fígado, coração e intestino [Mukherjee et al., 1997]. Como PPAR α , também tem sido identificado em células dos sistemas vascular e imunológico [Marx et al., 1998a; Marx et al., 1998b; Ricote et al., 1998]. A isoforma γ deste receptor está envolvida em diversos processos, tais como: diferenciação de adipócitos, estoque de lipídeos e homeostasia da glicose [Evans et al., 2004]. Polimorfismos que diminuem a atividade de PPAR γ estão associados com resistência à insulina, diabetes tipo 2 e hipertensão, sugerindo um papel importante nestes processos [Barroso et al., 1999; Garg, 2004]. Além disso, apresenta efeitos antiinflamatórios e agonistas de PPAR γ apresentam efeitos anti-ateroscleróticos [Kota et al., 2005]. Por outro lado, as propriedades de diferenciação celular e apoptose apresentadas por PPAR γ são benéficas para o tratamento de diferentes tipos de cânceres (mama, cólon, próstata, pancreático, biliar, pituitário e gástrico) [Bull, 2003; Heaney, 2003; Koeffler, 2003; Leibowitz and Kantoff, 2003; Tsujie et al., 2003].

A expressão ubíqua de PPAR β sugere seu envolvimento em funções celulares básicas, tais como: síntese e renovação de membrana lipídica. Porém, é encontrada em altas quantidades no tecido adiposo, músculo esquelético, cérebro e pele [Berger and Moller, 2002; Braissant et al., 1996; Muoio et al., 2002]. Também acredita-se que possui função importante na proliferação e diferenciação celulares [Barish et al., 2006; Escher et al., 2001; Wang et al., 2003]. Apesar de pouco se saber sobre a principal função do PPAR β , acredita-se que está envolvido na implantação e decidualização de embriões [Kersten et al., 2000], além do transporte reverso de colesterol [Oliver et al., 2001], maturação de oligodendrócitos [Peters et al., 2000; Saluja et al., 2001], metabolismo de lipídeos [Barak et al., 2002; Wang et al., 2003], desenvolvimento da placenta [Barak et al., 2002], proliferação de células hepáticas estreladas e pré-adipócitos [Hansen et al., 2001; Hellemans et al., 2003] e reabsorção óssea por osteoclastos [Mano et al., 2000]. O PPAR β regula processos inflamatórios, como a inflamação aterogênica [Lee et al., 2003], e cicatrização de feridas [Kuenzli and Saurat, 2003]. Também está envolvido em processos cancerígenos, como o câncer de cólon. Porém, permanece contraditória a ação de PPAR β como atenuador ou indutor na formação de tumores [Barak et al., 2002; Harman et al., 2004; He et al., 1999]. Além disso, efeitos benéficos de agonistas deste receptor têm sido encontrados na hiperlipidemia, obesidade, efluxo de colesterol e gasto de energia pelos músculos [Dressel et al., 2003; Tanaka et al., 2003].

1.3 Mecanismo de ativação transcricional por PPARs

Estruturalmente, os PPARs são receptores nucleares que apresentam uma única cadeia polipeptídica organizada em quatro domínios: A/B, C ou domínio de ligação ao DNA (DBD), D e E/F ou domínio de ligação ao ligante (LBD) (**Figura 1**). O domínio N-terminal ou A/B é pouco conservado entre as três isoformas dos PPARs e apresenta função de ativação 1 (AF-1) que é transcricionalmente ativa na ausência de ligantes [Blanquart et al., 2003; Schoonjans et al., 1996a; Schoonjans et al., 1996b]. O estado de fosforilação deste domínio contribui para a modulação da atividade dos PPARs [Adams et al., 1997; Camp and Tafuri, 1997; Shalev et al., 1996; Zhang et al., 1996]. A região central apresenta domínio altamente conservado

(domínio C), que representa o local de ligação ao DNA (DBD). Este domínio apresenta dois complexos “dedos de zinco” que são formados por arranjos protéicos constituídos de uma α -hélice e uma folha β -pregueada mantidas unidas por um íon Zn^{2+} . Além disso, possui função de ativação 2 (AF-2) que está contida no domínio LBD, que é transcricionalmente ativa na presença de ligantes [Blanquart et al., 2003]. O domínio D ou região da dobradiça permite alterações conformacionais na molécula. Esta estrutura confere ao receptor um padrão estável de dobramento para que este se ajuste na fenda maior da dupla hélice do DNA e forme, desta forma, associações estáveis com as regiões regulatórias para controlarem a transcrição [Schoonjans et al., 1996a; Schoonjans et al., 1996b].

As isoformas dos PPARs são farmacologicamente distintas, apresentando ativação diferencial, apesar do alto grau de conservação dos domínios ligantes [Keller et al., 1993; Yu et al., 1995]. Estes, por sua vez, podem ser naturais como os ácidos graxos e derivados, ou sintéticos, como fármacos antiinflamatórios, hipolipidemiantes e anti-diabéticos.

Entre o grupo dos ligantes sintéticos, os fibratos (Wy14643, clofibrato, fenofibrato e outros), que são fármacos hipolipidemiantes, ativam preferencialmente o PPAR α [Forman et al., 1997; Kliewer et al., 1994; Krey et al., 1997; Yu et al., 1995]. Compostos anti-diabéticos da classe das tiazolidinedionas (troglitazona, ciglitazona, rosiglitazona, pioglitazona), por sua vez, ativam preferencialmente o PPAR γ [Lehmann et al., 1995]. Um dos ligantes para PPAR β é o composto químico L165041 (derivado do ácido fenoxiacético) e GW501516, altamente seletivo para este receptor [Berger et al., 1999; Oliver et al., 2001].

A ativação dos PPARs por ácidos graxos foi primeiramente descrita em 1992, com a utilização de um receptor quimérico em ensaios de transativação. O receptor era composto pelo domínio de ligação ao ligante de PPAR e pelo domínio de ligação ao DNA do receptor de glicocorticóides. Esta descoberta foi o primeiro indício de que os ácidos graxos podem ser moléculas sinalizadoras que controlam a atividade de receptores nucleares e, conseqüentemente, a expressão gênica [Gottlicher et al., 1992].

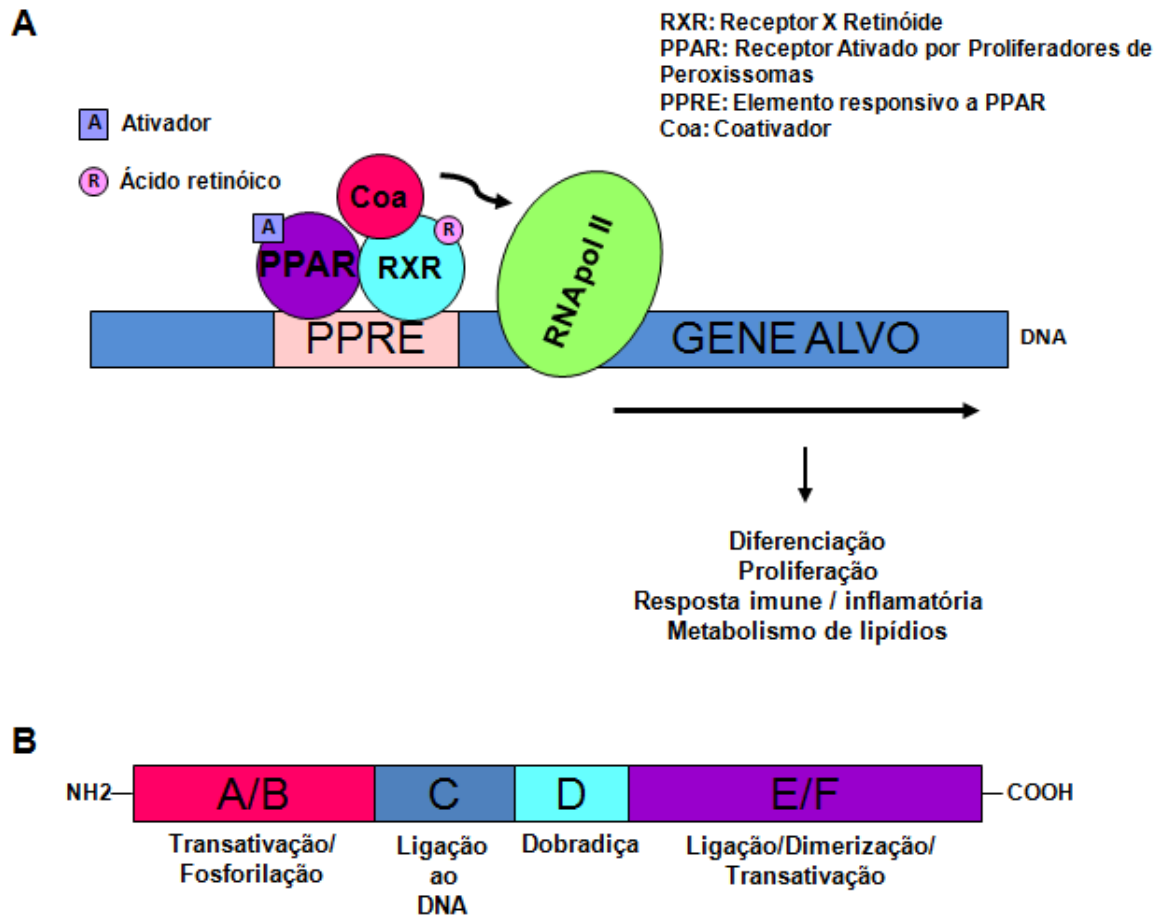


Figura 1. Mecanismo de ativação e organização dos domínios dos PPARs - (A) Os PPARs formam heterodímeros com os receptores X retinóides, são ativados por ligantes e modulam a transcrição por se ligarem em seqüências específicas (elementos responsivos aos receptores ativados por proliferadores de peroxissomas - PPREs) na região promotora de genes alvos. **(B)** O domínio N-terminal A/B contém a porção de ativação transcricional independente de ligante (AF-1). O domínio C contém dois motivos “dedos de zinco” que ligam o PPRE na região regulatória dos genes responsivos ao PPAR. O domínio D ou região da dobradiça permite mudanças conformacionais na molécula. O domínio E/F representa um domínio de ativação transcricional dependente de ligante (AF-2).

A via pela qual os PPARs regulam a transcrição gênica envolve sua ativação inicial pela ligação a um ligante, através da qual ocorre mudança conformacional, que facilita a formação de um outro complexo heterodimérico com o receptor nuclear ativado pelo ácido 9-*cis* retinóico (RXR). Esta mudança conformacional facilita a ligação de moléculas acessórias que são determinantes críticos para a ativação transcricional [Chen et al., 2006; DiRenzo et al., 1997]. Estas incluem proteínas co-repressoras, que são liberadas após a ativação de PPAR, e coativadoras, que são recrutadas para o PPAR ativado, desempenhando papel importante na atividade desses receptores. Como exemplos de moléculas co-repressoras destes receptores encontram-se as proteínas: co-repressora do receptor nuclear (NCoR) e mediadora

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:

