

IGOR LUCHINI BAPTISTA

**PAPEL DE E3 LIGASES NA PLASTICIDADE
MUSCULAR ESQUELÉTICA**

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

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientador: Prof. Dr. Anselmo Sigari Moriscot

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2012

RESUMO

BAPTISTA, I. L. **Papel de E3 ligases na plasticidade muscular esquelética.** 2012. 102 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

O tecido muscular esquelético é altamente adaptável podendo modular sua massa e sua composição de miofibras, além de possuir uma grande capacidade regenerativa. Nesta tese analisamos o envolvimento de enzimas ligadoras de ubiquitina (E3 ligases) sob três aspectos da plasticidade muscular esquelética: a perda de massa decorrente do desuso, a manutenção de populações de miofibras específicas e a regeneração do tecido muscular. Nosso primeiro objetivo foi determinar se leucina, um aminoácido essencial com início de seu metabolismo no músculo esquelético, era capaz de atenuar a perda de massa provocada pelo modelo de imobilização parcial de membro. Nossos resultados mostraram que este aminoácido evitou a perda do conteúdo proteico e, conseqüentemente a perda de massa, principalmente através da inibição da expressão de E3 ligases (Mafbx/Atrogin-1 e MuRF1). O segundo objetivo foi determinar se a ausência de duas E3 ligases, MuRF1 e MuRF2, poderia alterar a proporção de miofibras tipo I (oxidativas) e tipo II (glicolíticas). Através do uso de animais geneticamente modificados, detectamos que na ausência destas E3 ligases, a identidade de fibras tipo II era perdida mesmo em condições fisiológicas, além de estas fibras apresentarem uma proteção contra atrofia na ausência de MuRF1. Nossos dados também mostraram que na ausência destas E3 ligases a expressão de miozeninas, componentes essenciais para a via da calcineurina, era reduzida, indicando um possível mecanismo pelo qual E3 ligases podem controlar o fenótipo de miofibras. Por fim, analisamos o papel de MuRF1 e MuRF2 no tecido muscular em regeneração, utilizando-se de animais nocautes para essas proteínas. Os resultados mostraram que estas E3 ligases em conjunto são cruciais para a regeneração satisfatória do tecido. Além disso, nossos dados apontam que as células-satélites necessitam de MuRF1 e MuRF2 para sua ativação (redução na expressão de MyoD/ β -catenina), proliferação (redução nos níveis de Ki67) e diferenciação (redução nos níveis de MHCn e NCAM). De maneira geral nossos dados mostram que determinadas E3 ligases exercem um papel crucial para a plasticidade muscular sob diferentes demandas, além de mostrar que a expressão destas enzimas pode ser regulada por aminoácidos.

Palavras-chave: Tecido muscular. Atrofia muscular. Regeneração. Fibras tipo II.

ABSTRACT

BAPTISTA, I. L. **Role of E3 ligases on skeletal muscle plasticity**. 2012. 102 f. Ph.D. Thesis (Cell and Tissue Biology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Skeletal muscle is a highly adaptable tissue, which can modulate its mass and composition of myofibers and can trigger an efficient regenerative response. In the present thesis we analyzed the involvement of ubiquitin ligases (or E3 ligases) under three aspects of skeletal muscle plasticity: mass loss resulting from disuse, maintenance of specific myofibers populations and regeneration of muscle tissue. Our first aim was to determine whether leucine, an essential amino acid that starting your metabolism in skeletal muscle, was able to attenuate the mass loss caused by partial immobilization model. Our results showed that this amino acid prevented the loss of protein content and thus the mass loss, mainly by inhibiting the expression of E3 ligases (Mafbx/Atrogin-1 and MuRF1). The second aim was to determine whether the absence of two E3 ligases, MuRF1 and MuRF2, could alter the proportion of type I (oxidative) and type II (glycolytic) myofibers. Through the use of genetically modified animals, we found that in the absence of these E3 ligases, the identity of type II fibers was lost even under physiological conditions, and these fibers were protected against atrophy in the absence of MuRF1. Our data also showed that in the absence of these E3 ligases expression miozenins was reduced, indicating a possible mechanism by which E3 ligases can control the phenotype of myofibers, since miozenins are an essential components for the calcineurin pathway. Lastly, we analyze the role of MuRF1 and MuRF2 in muscle tissue regeneration, using knockout animals for these proteins. The results showed that these E3 ligases together are crucial to an adequate tissue regeneration. Moreover, our data indicate that satellite cells require MuRF1 and MuRF2 for its activation (reduction in the expression of MyoD / β -catenin), proliferation (reduction in levels of Ki67) and differentiation (reduction in levels of MHCn and NCAM). Overall, our data show that certain E3 ligases can play a crucial role in muscle plasticity under different demands and demonstrated that the expression of these enzymes can be regulated by amino acids.

Key words: Skeletal muscle tissue. Muscle atrophy. Regeneration. Myofibers type II.

INTRODUÇÃO GERAL

A estrutura dessa tese foi organizada em capítulos focando em estudos distintos, porém relacionados. Esse modelo é um dos sugeridos pelo Instituto de Ciências Biomédicas da USP e segundo nosso entendimento facilita a descrição desses 3 trabalhos que são interligados, no entanto possuem trajetória própria.

Enzimas ligadoras de ubiquitina (E3 ligases) tem ganhado importância em diversos quadros clínicos e diferentes tipos celulares (CHHANGANI; JANA; MISHRA, 2012; YAGISHITA et al., 2012). No músculo esquelético a super expressão destas enzimas foram, ao longo da última década, relacionadas a quadros atroficos (BODINE et al., 2001; CLARKE et al., 2007). Apesar da grande quantidade de estudos envolvendo E3 ligases e quadros atroficos, pouco tem sido estudado a respeito da importância destas enzimas em outras situações fisiológicas ou patológicas.

Os trabalhos aqui apresentados (ver Apêndices A, B e C), compartilham a característica de analisar o papel de E3 ligases sobre diferentes aspectos da plasticidade muscular: no primeiro analisamos o efeito da suplementação de leucina sobre a resposta do tecido muscular diante de um quadro atrofico, focando principalmente na expressão gênica de E3 ligases (Capítulo 1); no segundo demonstramos que algumas destas enzimas ligadoras de ubiquitina estão envolvidas também na modulação de vias que influenciam a identidade da fibra muscular (Capítulo 2); no terceiro avaliamos como a ausência de duas destas E3 ligases acarreta um grande prejuízo para a capacidade regenerativa do tecido muscular (Capítulo 3). Os dois primeiros capítulos referem-se a artigos publicados, enquanto o terceiro apresenta dados de um artigo em preparação.

Após o terceiro capítulo, encontram-se as considerações finais, onde são discutidos os achados destes trabalhos como um todo, além da inserção de cada um dos trabalhos publicados na literatura recente. Na seção “considerações finais” também apresentamos outros dados relevantes (ainda não publicados), os quais foram iniciados com base nesta tese e não foram formalmente incorporados na forma de capítulos.

Introdução do Capítulo 1 – Leucina exerce efeito anti-atrófico via atenuação do aumento de atrogenes no músculo esquelético

O músculo esquelético é um tecido altamente especializado na geração de tensão, o que está diretamente relacionado com muitas funções em nosso organismo, tais como fixação e mobilidade do esqueleto, retorno venoso, movimentação do globo ocular, termogênese e respiração (LIEBER, 1992). A massa e a composição do músculo esquelético são críticas para sua função e podem ser reguladas por diferentes demandas tais como alterações no estresse mecânico, lesão e sobrecarga hormonal. Podemos citar como exemplo, a grande perda de massa muscular (atrofia) causada por desuso e microgravidade (AOKI et al., 2004; BODINE et al., 2001; RILEY et al., 1996)

O processo de atrofia é altamente ordenado e regulado, sendo caracterizado por uma redução da área de secção transversal das fibras musculares e conteúdo proteico, redução da força, aumento da fadigabilidade e aumento da resistência à insulina (ZHANG; CHEN; FAN, 2007). Sabemos que a redução da área de secção transversal induzida por desuso é o produto da diminuição de síntese e aumento de degradação proteica, sendo que quantitativamente a proteólise desempenha um papel preponderante em várias situações atroficas tais como, desuso, sepsis e insuficiência renal (FAREED et al., 2006).

Neste contexto, foi demonstrado que a via proteolítica dependente de ubiquitina-proteassoma é a principal responsável pela degradação proteica no músculo esquelético (BODINE et al., 2001; GOMES et al., 2001). Este sistema de degradação é conhecido como Sistema Ubiquitina Proteassoma (UPS), o qual é constituído por três componentes distintos: E1 – proteínas ativadoras da ubiquitina; E2 – proteínas carreadoras da ubiquitina ativada; E3 – conhecidas como ubiquitina-ligases (E3 ligases ou atrogenes), são as proteínas responsáveis por transferir o conjugado ubiquitina para resíduos de lisina na proteína alvo; ao fim da ubiquitinação, a proteína alvo é então degradada no complexo 26S do proteassoma (HERSHKO; CIECHANOVER, 1998). Porém, o processo de ubiquitinação não é irreversível. Proteínas conhecidas como desubiquitinases (DUBs) possuem a capacidade de retirar o conjugado ubiquitina da proteína alvo, evitando assim sua degradação (CROSAS et al., 2006; LEGGETT et al., 2002).

No músculo esquelético, as principais ubiquitina-ligases reguladas durante a proteólise muscular, são MAFbx/atrogen-1, Murf-1, e E3 α (BODINE et al., 2001; GOMES et al., 2001). O controle da expressão gênica de algumas E3 ligases, em resposta a diferentes quadros atrofícos, vem sendo amplamente estudado e demonstrado sob a influência de FOXO (“fork head family transcription factors”), o qual por sua vez é inibido por fosforilação via PI3K/Akt (ZHANG; CHEN; FAN, 2007), uma via extremamente importante no controle da síntese proteica através de seu principal efetor, mTOR (“mammalian target of rapamycin”). Interessantemente, além de vias metabólicas que controlam a atividade de mTOR em associação com outras proteínas (“mTORC1 – mTOR complex 1”) (LANG; FROST; VARY, 2007; VARY et al., 2007), existem evidências de que nutrientes, como o aminoácido leucina controle este complexo, regulando a síntese proteica (ANTHONY et al., 2001a; ANTHONY et al., 2001b).

A inativação do eixo Akt/mTORC1 somada ao aumento de translocação de FOXO para o núcleo, com resultante aumento da expressão gênica de MAFbx/atrogen-1 e Murf-1, são sugeridas como as principais responsáveis pela degradação proteica em modelos de atrofia muscular *in vivo* e *in vitro* (KANDARIAN; JACKMAN, 2006), e apesar das evidências apontarem para uma forte capacidade de ativação do complexo mTORC1 pela suplementação de leucina (ANTHONY et al., 2001a; ANTHONY et al., 2001b; KIMBALL; JEFFERSON, 2006a, b), os efeitos desta suplementação sobre a regulação de E3 ligases, e conseqüentemente sobre a atrofia muscular, são ainda desconhecidos.

Recentemente Sugawara e colaboradores (SUGAWARA et al., 2008) mostraram que a suplementação com leucina em um modelo de deprivação proteica minimizou o catabolismo proteico sem afetar a expressão de atrogenes. Estes autores sugerem que o efeito observado decorre da diminuição da atividade da via lisossomal, uma via proteolítica distinta, em detrimento do UPS. Apesar de a deprivação proteica ativar eficientemente vias de degradação da massa muscular, este modelo experimental não foi realizado para investigar efeitos locais do desuso na massa muscular.

Nessa etapa de nosso estudo, buscamos entender o efeito que a suplementação de leucina teria sobre a degradação proteica, sobre o sistema ubiquitina-proteassoma, no músculo esquelético de ratos durante a imobilização parcial do membro posterior. Nós hipotetizamos que a suplementação com leucina poderia atenuar o aumento de degradação proteica induzido pelo desuso.

Conclusão do Capítulo 1

Nossos resultados mostraram que a suplementação com leucina atenuou a atrofia muscular induzida pela imobilização. O efeito protetor da suplementação com leucina foi, no mínimo parcialmente, mediado pela redução da expressão gênica de componentes do sistema ubiquitina-proteassoma, e não pelo estímulo sobre a síntese proteica.

Introdução do Capítulo 2 – Papel de murf1 e murf2 na determinação do fenótipo de fibras musculares esqueléticas

Como explanado no capítulo 1, o tecido muscular esquelético representa um tipo tecidual que pode ser remodelado de diversas formas. Por exemplo, aumentando a carga mecânica, o que ocorre durante o exercício físico, o músculo esquelético responde com um grande aumento no diâmetro das fibras musculares (hipertrofia); durante o desuso que ocorre, por exemplo, com pacientes acamados, os músculos respondem rapidamente reduzindo seu diâmetro (atrofia). O mecanismo para regular hipertrofia/atrofia inclui um aumento da sinalização de vias pró-síntese proteica como mTOR/p70S6K, e/ou vias relacionadas ao estresse intracelular, incluindo a via p38/ERK/MEK (POTTHOFF; OLSON; BASSEL-DUBY, 2007). As adaptações ao exercício físico não incluem apenas a regulação positiva do trofismo da fibra muscular, mas também inclui adaptações metabólicas, como um aumento no conteúdo mitocondrial (HOOD, 2009) e mudanças no tipo de fibra muscular (LEE-YOUNG et al., 2009).

Um exemplo dessa capacidade de alteração no tipo da fibra muscular ocorre durante o tratamento com hormônio tireoidiano (MIYABARA et al., 2005b), ou durante estimulação elétrica de baixa frequência (PUTMAN et al., 2004). Apesar da caracterização dos fatores que determinam o tipo de fibra continuarem a serem descobertos, calcineurina, MEF2, CaMK e pGC-1 (ref) foram identificados como fatores promotores de fibras do tipo I, contrariamente ao que promove o hormônio tireoidiano (MIYABARA et al., 2005b). Recentemente um fator chamado miozenina-1 (também conhecido como cal sarcina-2 ou FATZ) foi descrito como responsável pela manutenção de fibras rápidas. Funcionalmente, miozenina-1 pertence à família das cal sarcinas, cujos membros inibem a fosfatase calcineurina (FREY et al., 2008) a qual ativa o fator de transcrição NFAT por defosforilação. Estudos recentes em animais nocauteados para miozenina-1 demonstraram que a expressão desta proteína é essencial para a manutenção de fibras rápidas (FREY et al., 2008). Consistente com a maior presença de fibras do tipo I, animais nocautes para miozenina-1 apresentaram uma grande capacidade para correr longas distâncias (FREY et al., 2008).

A perda crônica de sarcômero, particularmente de fibras tipo II durante o envelhecimento (SNIJDERS; VERDIJK; VAN LOON, 2009) tem recebido muita atenção devido a sua importância clínica. Durante atrofia muscular crônica, a perda de sarcômeros é acompanhada por diversas alterações no conteúdo proteico, metabolismo e transcriptoma, incluindo redução do

metabolismo mitocondrial e de genes músculo-específicos. Análises genômicas de larga escala de músculos saudáveis e sob quadros atroficos identificaram grupos de genes que são regulados positivamente durante estes estímulos (LECKER et al., 2004; LECKER et al., 1999). Estas mudanças transcricionais incluem genes que estão diretamente ligados ao desenvolvimento da atrofia muscular, estes genes são conhecidos como atrogenes (BODINE et al., 2001; LECKER et al., 1999). Em particular, atrogin-1 (também conhecido como Mafbx) e MuRF1 ("muscle ring finger -1") possuem grande importância no remodelamento da massa muscular (BODINE et al., 2001). Em camundongos selvagens o músculo gastrocnemio pode perder até 50% da sua massa após 2 semanas de denervação, enquanto em animais nocautes sem a expressão de atrogin-1 ou MuRF1 ocorre a perda de apenas 20% em relação ao controle (BODINE et al., 2001). Estes estudos com animais nocautes sugerem que o aumento de Mafbx/atrogin-1 e MuRF1 em animais selvagens após a denervação é essencial para o desenvolvimento do quadro atrofico.

Atrogin-1 e MuRF1 são E3 ligases e como tal podem potencializar a multi-ubiquitinação de proteínas alvo, iniciando dessa forma a degradação dependente do sistema ubiquitina-proteassoma (UPS) (PICKART; EDDINS, 2004). Aqui, nós focamos em MuRF1 e MuRF2 ("muscle ring finger 2") que compartilham um domínio "RING finger" em sua porção N-terminal (que contém a atividade E3 ligase), seguido por domínios "B-box" e um central chamado "coiled-coil domain". Com relação à atividade E3 ligase, MuRF1 por exemplo foi demonstrada como responsável por multi-ubiquitinar troponina I *in vitro* (KEDAR et al., 2004), miosina (CLARKE et al., 2007) e actina (COHEN et al., 2009). Contudo, *in vivo*, os mecanismos que levam a ubiquitinar determinada proteína são mais complexos, já que Atrogin-1 e MuRF1 podem ter acesso a diferentes proteínas na fibra muscular. Para responder a essa questão, Cohen e colaboradores (COHEN et al., 2009) utilizaram um sistema cre-lox induzível no qual a indução deletou o domínio "RING finger", abolindo assim a atividade ubiquitina-ligase permitindo que MuRF1 exercesse sua possível função estrutural relacionada à banda M (MCELHINNY et al., 2002; MROSEK et al., 2007). Neste modelo, a miosina não foi protegida da multi-ubiquitinação e degradação após denervação, contrastando com os resultados *in vitro* que apontavam esta proteína como alvo de MuRF1 (CLARKE et al., 2007). Entretanto, dois outros componentes dos filamentos grossos, a cadeia leve da miosina 2 (MLC2) e a proteína C ligante de miosina foram protegidas da degradação, sugerindo que a ubiquitinação destas proteínas seria mediada por MuRF1 (COHEN et al., 2009). Desta forma, pesquisas recentes estão focadas na identificação de

alvos *in vivo* de atrogin-1 e MuRF1 usando por exemplo modelos de animais transgênicos e transferência gênica de E3 ligases através de adenovírus. Utilizando esta última metodologia Mearini e colaboradores sugeriram que atrogin-1 e MuRF1 provavelmente reconhecem proteínas diferentes (MEARINI et al., 2009). Hirner e colaboradores (HIRNER et al., 2008) utilizaram animais transgênicos para demonstrar que a expressão específica no tecido muscular esquelético não foi suficiente para causar atrofia muscular, ao invés disso, resultou em defeitos metabólicos, implicando desse modo MuRF1 em alterações metabólicas durante a atrofia muscular (HIRNER et al., 2008).

A discussão acima a respeito dos estudos sobre atrofia foi focada na proteção da massa muscular após longos períodos de estímulo atrofico (por exemplo, denervação acima de 10 dias) e não sob parâmetros fisiológicos como força ou composição de tipos de fibra muscular. Aqui, nós caracterizamos músculos MuRF1 deficientes após denervação com interesse na composição de tipos de fibra musculares, na tentativa de demonstrar que o músculo de animais nocautes para MuRF1 são fisiologicamente normais e que a remoção deste gene poderia ser uma estratégia de proteção da massa muscular. Surpreendentemente nós encontramos que MuRF1 não está expressa de maneira homogênea pelo músculo esquelético, e é preferencialmente expressa em fibras do tipo II. Além disso, MuRF1 é preferencialmente induzido em fibras do tipo II após denervação. Consistente com a função de MuRF1 em remodelar fibras tipo II, nós encontramos que em animais nocaute para MuRF1, fibras do tipo II foram consideravelmente mais protegidas da perda de massa do que fibras do tipo I. A interação física de MuRF1 com miozenina-1 pode explicar as bases do mecanismo pelo qual MuRF1 está envolvido na especificidade de fibras do tipo II, implicando MuRF1, dessa forma, em condições patofisiológicas que levam ao remodelamento da proporção de fibras que ocorre durante a denervação ou envelhecimento.

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:

