

16º Congresso Nacional de Iniciação Científica

TÍTULO: O PAPEL DO O-GLCNAC NA ATIVIDADE DA TIROSINA HIDROXILASE E NA SÍNTESE DE DOPAMINA EM CÉLULAS PC12

CATEGORIA: EM ANDAMENTO

ÁREA: CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SAÚDE

SUBÁREA: CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUIÇÃO: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

AUTOR(ES): BRUNO DA COSTA RODRIGUES

ORIENTADOR(ES): ADRIANE REGINA TODESCHINI, ANNA CAROLINA REGO COSTA, FERNANDO GARCIA DE MELLO, MIGUEL CLODOMIRO DOS SANTOS LUCENA, RICARDO AUGUSTO DE MELO REIS, WAGNER BARBOSA DIAS

COLABORADOR(ES): DANIELLE BECKMAN, SERGIO TEIXEIRA FERREIRA

Realização:

Apoio:

Resumo

A via biossintética das hexosaminas possui a glutamina frutose-6-fosfato aminotransferase (GFAT) como enzima limitante, que converte frutose-6-fosfato em glicosamina-6-fosfato; e possui o UDP-GlcNAc como produto final. Este pode ser utilizado como substrato para uma modificação pós-traducional (O-GlcNAc) resultante da adição covalente de uma N-acetilglicosamina (GlcNAc) à grupamentos hidroxila em resíduos de serinas e/ou treoninas de proteínas. A tirosina hidroxilase (TH) é uma enzima responsável por catalisar a reação de hidroxilação da L-tirosina na posição meta, gerando di-hidroxfenilalanina (L-DOPA). Este trabalho tem como objetivo demonstrar que o O-GlcNAc atua no controle dos níveis de fosforilação na serina 40 da TH, modulando sua atividade e a síntese de dopamina.

Introdução

A via biossintética das hexosaminas utiliza cerca de 2% a 5% da glicose que entra nas células, possuindo a glutamina frutose-6-fosfato aminotransferase (GFAT) como enzima limitante, que converte frutose-6-fosfato em glicosamina-6-fosfato. Esta via terá como produto final o UDP-GlcNAc, que além das glicosilações clássicas, é utilizado como substrato para o O-GlcNAc intracelular; uma modificação pós-traducional (MPT) resultante da adição covalente de uma N-acetilglicosamina (GlcNAc) à grupamentos hidroxila em resíduos de serinas e/ou treoninas de proteínas, tanto nucleares quanto citoplasmáticas e mitocondriais. Esta reação é catalisada pela O-GlcNAc transferase (OGT), sendo a reação de remoção deste monossacarídeo feita pela O-GlcNAcase (OGA). O balanço da atividade de tais enzimas irá regular os níveis de O-GlcNAc em proteínas, sendo a O-GlcNAcilação, semelhante à fosforilação, altamente induzível, dinâmica e atuante em diversos processos celulares, tais como a progressão do ciclo celular, transcrição, resposta à stress celular, alzheimer, parkinson, entre outros. A tirosina hidroxilase (TH) é uma enzima responsável por catalisar a etapa limitante na síntese de catecolaminas, hidroxilando a L-tirosina na posição meta para obtenção de di-hidroxfenilalanina (L-DOPA). Existe apenas uma evidência na literatura de que a TH é O-GlcNAcilada, e que a diminuição dos níveis desta modificação pós-traducional estimula a secreção de dopamina em células PC12 (feocromocitoma de rato); porém, o mecanismo de como tal fato ocorre, permanece desconhecido. A partir disto, nosso grupo mostrou que a O-GlcNAcilação atua no

controle dos níveis de fosforilação na serina 40 da TH, modulando sua atividade e consequentemente os níveis de dopamina.

Objetivos

Este trabalho tem por objetivos determinar a existência de uma correlação entre o O-GlcNAc e a fosforilação na serina 40 da tirosina hidroxilase, avaliando posteriormente as implicações fisiológicas de tal correlação, dando ênfase nos efeitos na via de biossíntese de catecolaminas através da medição dos níveis de dopamina.

Metodologia e Desenvolvimento

Para analisar a influência que uma MPT exerce sobre a outra, Células PC12 foram tratadas com nerve growth factor (NGF), um indutor de neuritogênese e de síntese de dopamina, por 48 horas e 72 horas; e com o inibidor farmacológico da OGA, Thiamet G (TMG) por 4 horas. Em seguida, as células foram lisadas, centrifugadas a 14.000 rpm por 20 minutos 4°C, e o sobrenadante foi coletado e submetido a dosagem de proteína utilizando o método de Bradford. Para cada amostra, 25 µg de proteína foram usados para SDS-PAGE, transferidos para membranas de nitrocelulose e marcados com anti-O-GlcNAc, anti-TH, anti- fosfo- TH ser40, anti-GFAT, anti-OGA e anti-GAP43 para análise de seus níveis nas diferentes condições. Anti-actina e anti-tubulina foram utilizados como controle de carregamento. Os níveis de dopamina foram quantificados por HPLC acoplado com detecção eletroquímica, seguindo um protocolo adaptado de Arita e colaboradores. Ácido perclórico foi adicionado com concentração final de 0.1M em células PC12 e sobrenadante em condições não tratadas e tratadas com TMG por 4 horas. Células foram sonicadas (2 pulsos de 5s, 50 Hz) e centrifugadas (1000 x g por 10 minutos), e o sobrenadante foi utilizado para a quantificação. Separação isocrática foi obtida usando coluna de fase reversa LC-18 (4.6x250 nm). Uma reação in vitro envolvendo a TH recombinante, OGT e UDP-GlcNAc foi realizada com o objetivo de visualizar a O-GlcNAcilação da enzima por Western blot, e esta amostra contendo uma alta fração da enzima com a modificação pós-traducional foi levada a análise por espectrometria de massas, com o objetivo de mapeamento de sítios de O-GlcNAcilação.

Resultados preliminares

O tratamento com NGF aumenta os níveis de fosforilação na serina 40 da TH ao aumentar seu tempo de exposição, enquanto os níveis de O-GlcNAc diminuem na banda do peso molecular da enzima (60 kDa). Em contra-partida, o aumento dos níveis intracelulares de O-GlcNAc exercido pelo uso do TMG diminui os níveis de fosforilação na serina 40 da TH; sugerindo uma competição entre o O-GlcNAc e o fosfato pelo sítio na enzima e; pela fosforilação na serina 40 ser bem estabelecida no aumento da atividade enzimática, os dados indicam que a regulação por O-GlcNAc também participa na modulação de tal atividade. Com o intuito de investigar as implicações de tal modulação na via de biossíntese de catecolaminas, foi realizada a dosagem de dopamina por HPLC nas condições não tratada e tratada com TMG por 4 horas e, como resultado, os níveis de dopamina total diminuem significativamente com o tratamento com TMG; corroborando com o fato de o aumento nos níveis de O-GlcNAc diminuir os níveis de fosforilação na serina 40, e conseqüentemente diminuir a atividade enzimática da enzima limitante desta via. Por fim, a análise dos níveis de O-GlcNAc na reação in vitro por western blot mostra que o sistema que continha UDP-GlcNAc apresenta níveis de O-GlcNAcilação maiores do que o sistema de controle negativo; dando mais uma evidência de que a enzima possui sítio para esta modificação pós-traducional. Análises por espectrometria de massas estão sendo realizadas para confirmação de tal(is) sítio(s) de O-GlcNAc na enzima.

Fontes Consultadas

Bobrovskaya L, Gilligan C, Bolster EK, Flaherty JJ, Dickson PW, Dunkley PR. Sustained phosphorylation of tyrosine hydroxylase at serine 40: a novel mechanism for maintenance of catecholamine synthesis. *J Neurochem.* 2007;100: 479-89.

Bork K, Kannicht C, Nöhling S, et al. N-propanoylmannosamine interferes with O-GlcNAc modification of the tyrosine 3-monooxygenase and stimulates dopamine secretion. *J Neurosci Res.* 2008;86: 647-52.

Dunkley PR, Bobrovskaya L, Graham ME, Von nagy-felsobuki EI, Dickson PW. Tyrosine hydroxylase phosphorylation: regulation and consequences. *J Neurochem.* 2004;91: 1025-43.