

Distribuição subcelular da proteína PABPC4 em células musculares C2C12 Knockout para NCoR1

Palavras-Chave: NCoR1, PABPC4, Biogênese mitocondrial, Metabolismo

Autores/as:

Patrick Hideki Fuzimoto Alvares [Universidade Estadual de Campinas]

Dr. André Gustavo de Oliveira (co-orientador) [Universidade Estadual de Campinas]

Prof. Dr. Leonardo R. Silveira (orientador/a) [Universidade Estadual de Campinas]

INTRODUÇÃO

A homeostase metabólica é regulada transcricionalmente através da interação entre fatores de transcrição, co-reguladores e proteínas do complexo transcricional basal. Co-reguladores nucleares podem funcionar tanto como repressores ou ativadores transcricionais e, portanto, são estritamente regulados para sincronizar vias metabólicas à estímulos ambientais. Estudos recentes e resultados preliminares do nosso laboratório têm indicado que o co-repressor NCoR1 possui papel importante na regulação do processo de biogênese mitocondrial e no metabolismo oxidativo em células musculares. Durante o processo de diferenciação de células musculares, a expressão do repressor NCoR1 é reduzida favorecendo a indução do processo de biogênese mitocondrial e, consequentemente, o aumento da função mitocondrial. Por outro lado, a superexpressão de NCoR1 afeta negativamente o fenótipo mitocondrial dessas células. Essas observações sugerem que o NCoR1 exerce papel central ligando o receptor nuclear ao programa transcricional de biogênese mitocondrial. Nosso grupo identificou através de ensaio de co-immunoprecipitação e espectrometria de massas, a proteína PABPC4 como um novo interactor de NCoR1. Este estudo, portanto, teve como objetivo central, investigar o papel da interface PABPC4-NCoR1 na resposta mitocondrial ao estresse metabólico em células musculares. PABPC4 é uma proteína que contém domínios de interação com RNAs, tendo como função a estabilização da cauda poliA de mRNAs. Nossos resultados indicam um novo papel para a proteína PABPC4, sugerindo que ela pode estar envolvida

na estabilização da molécula de NCoR1 em condições basais.

METODOLOGIA

Foram utilizadas células controles e “knockouts” para NCoR1 da linhagem C2C12. Realizou-se a clonagem do gRNA de NCoR1 para o locus 11.1 digerindo-se o plasmídeo lentiCRISPR-V2 com a enzima BsmBI e ligação dos oligos previamente anelados. Após a validação da clonagem, as células foram transduzidas com partículas virais contendo gRNA dirigindo a enzima Cas9 para o gene de NCoR1 ou com gRNA sem nenhum gene-alvo conhecido em camundongo. O Knockout foi validado por meio de western blotting.

Após o processo de diferenciação, células controles foram expostas a diferentes concentrações de glicose, incluindo 5 e 25 mM. Após 12h, as amostras foram coletadas e o conteúdo de NCoR1, PABPC4 e vinculina foram avaliados por western blotting. Adicionalmente, em células knockouts para NCoR1 e expostas à 25mM de glicose, foram também avaliados os conteúdos protéicos de NCoR1, PABPC4 e de tubulina, utilizando a técnica de western blotting e de imunofluorescência.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nossos resultados sugerem claramente que em condições de estresse metabólico induzido pela menor disponibilidade de glicose, diminuem o conteúdo intracelular de PABPC4, favorecendo a degradação de NCoR1. Estes resultados parciais indicam que PABPC4 é uma proteína importante

para estabilização do NCoR1 mediada pela interação física entre ambas proteínas. Observamos ainda que a deleção de NCoR1 (células *knockouts*) reduziu o conteúdo nuclear de PABPC4 aumentando sua localização citosólica. Sua localização menos ativa no núcleo pode indicar que sua função em estabilizar NCoR1 esteja sendo direcionada para uma função secundária de estabilização de RNA mensageiro.

CONCLUSÕES:

Em caso de confirmação dessa resposta, nosso estudo originalmente sugere que a interface proteica PABPC4-NCoR1 pode ser um importante alvo para o desenvolvimento de moléculas terapêuticas contra doenças metabólicas incluindo a obesidade e suas comorbidades.

REFERÊNCIAS:

1. Liu Z, Butow RA (2006) Mitochondrial retrograde signaling. *Annu. Rev. Genet.* 40:159–185.
2. Yu C, Markan K, Temple KA, et al (2005) The Nuclear Receptor Corepressors NCoR and SMRT decrease Peroxisome Proliferator activated Receptor Transcriptional Activity and Repress 3T3-L1 Adipogenesis. *JBC*, 280(14):13600-5.
3. Hood DA (2001) Invited Review: Contractile activity-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *90*:1137–1157.
4. Zhang F, Pracheil T, Thornton J, Liu Z (2013) Adenosine Triphosphate (ATP) Is a Candidate Signaling Molecule in the Mitochondria-to-Nucleus Retrograde Response Pathway. *Genes (Basel)* 4:86–100.
5. Scarpulla RC (2008) Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiol. Rev.* 88:611–638.