

Impacto da O-Glicosilação de proteínas sobre a reprogramação transcricional e biogênese mitocondrial na hipertrofia cardíaca

Heberty T. Facundo¹, Robert E. Brainard², Lewis J. Watson², Gladys A. Nghoh², Tariq Hamid², Sumanth D. Prabhu² e Steven P. Jones²

¹Universidade Federal do Cariri - Curso de Medicina, Laboratório de Doenças Cardiovasculares e Metabólicas – Barbalha – CE - Brazil ²University of Louisville – Department of Medicine, Institute of Molecular Cardiology – Louisville - KY - USA

A hipertrofia cardíaca é iniciada por estresse mecânico e modula múltiplos eventos celulares tais como a síntese proteica, o metabolismo e a expressão de alguns genes. Mais especificamente, a hipertrofia cardíaca compromete a regulação do metabolismo cardíaco bem como a biogênese mitocondrial e a expressão de genes fetais como, por exemplo, a expressão do fator natriurético atrial (ANF). Embora a hipertrofia cardíaca seja um resposta benéfica temporária frequentemente leva a cardiomiopatia e insuficiência cardíaca congestiva. A rota biossintética da formação de N-acetilglicosamina a partir de glucose tem como produto final a formação de N-acetilglucosamine uridina difosfato (UDP-GlcNAc). O UDP-GlcNAc funciona como um substrato que através da ação da enzima N-acetilglicosamina transferase (OGT) é adicionado a resíduos de serina ou treonina de proteínas. Esta modificação proteica permanece em proteínas até que seja removida pela enzima N-Acetilglicosaminidase (O-glcNAcase). A O-Glicosilação modula a ação e função de muitas proteínas. Esta modificação proteica é implicada na fisiopatologia de várias doenças tais como diabetes mellitus, isquemia e reperfusão, doença de alzheimer entre outras. A relação entre a hipertrofia cardíaca, a modificação proteica por O-GlcNAc e a biogênese mitocondrial é ainda desconhecida. Aqui nós hipotetizamos que a reprogramação transcricional iniciada durante a hipertrofia bem como a mudança nos padrões de expressão de genes importantes para a biogênese mitocondrial são controlados pelo menos em parte pela O-glicosilação de proteínas. Mais especificamente, a indução de hipertrofia, por constrição da aorta em camundongos (TAC), por tratamento de cardiomiócitos de ratos neonatos (NRCMs) com fenilefrina ou submetendo células H9C2 ao estiramento mecânico induziram a O-glicosilação de proteínas. Esta indução foi revertida pela inibição da O-glicosilação de proteínas (usando a droga 6-diazo-5-Norleucina – DON) durante a hipertrofia ou por superexpressão da enzima O-GlcNAcase por infecção de cardiomiócitos de ratos neonatos com adenovírus contendo este gene. A hipertrofia estimulou a supressão nos níveis do Co-ativador-1 alfa do receptor ativado por proliferador do peroxissomo (PGC-1alfa - um regulador mestre da biogênese mitocondrial) e de vários dos seus genes alvo. Entre estes estão incluídos os genes envolvidos na oxidação de ácidos graxos e da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial. Esta supressão foi parcialmente revertida pela inibição da O-glicosilação com a droga DON durante a hipertrofia ou por superexpressão da O-GlcNAcase com adenovírus. A fim de confirmar a contribuição dessa modificação pós tradução para as mudanças metabólicas e energéticas que acompanham a hipertrofia cardíaca nós induzimos altos níveis de O-GlcNAc em cardiomiócitos por tratamento de NRCMs com N-Acetilglicosamina. Este tratamento de fato elevou os níveis intracelulares de O-GlcNAc em proteínas e foi acompanhado pela supressão da expressão de PGC-1alfa bem como de vários de seus genes alvo. Como prova do princípio de que a O-glicosilação pode de fato interferir com a expressão dos genes responsáveis pela biogênese mitocondrial bem como com a expressão de seus genes alvos nós mostramos que camundongos que continham o gene da OGT flanqueados por dois LOXP e que continham o gene

da CRE recombinase expresso somente no coração (dirigido pelo promotor de miosina de cadeia pesada alfa) quando induzidos por tratamento com tamoxifeno tinham aumento na expressão de PGC-alfa e PGC-1beta (uma outra isoforma) com uma concomitante diminuição da O-glicosilação de proteínas. Este resultado demonstra que a O-glicosilação por si só pode levar a supressão da biogênese mitocondrial. Usando PCR em tempo real nós mostramos que a inibição da O-glicosilação (por tratamento com DON ou superexpressão de O-GlcNAcase) evitou a reativação do programa genético fetal cardíaco em cardiomiócitos de ratos neonatos ou células H9C2 através da quantificação da expressão relativa do fator natriurético atrial. Observando a fluorescência do fator de transcrição fator nuclear de células T ativadas (NFAT) ligado a GFP (NFAT-GFP) nós demonstramos por microscopia confocal que a hipertrofia cardíaca também foi acompanhada pela ativação de NFAT com consequente migração desta proteína para o núcleo celular. Notavelmente, somente a superexpressão de OGT em cardiomiócitos de ratos neonatos usando adenovírus ativou a translocação do NFAT-GFP para o núcleo celular mostrando que a O-glicosilação é suficiente para iniciar este evento. Isto também é verdade quando aumentamos a quantidade de cálcio que ativa a proteína NFAT a translocar para o núcleo evento este que foi inibido por diminuição dos níveis de O-glicosilação em NRCMs. A fim de demonstrar que esta translocação tem finalidade funcional nós revelamos (por dosagem da atividade de luciferase ligada a 4 regiões promotoras reconhecidas por NFAT no núcleo) que a atividade desta proteína necessita da O-glicosilação gerada durante a hipertrofia cardíaca. A atividade de luciferase foi aumentada por incrementos de O-glicosilação através da superexpressão da proteína OGT usando infecção por adenovírus carreando este gene em NRCMs. Juntos estes resultados demonstram um papel importante da O-glicosilação de proteínas na iniciação bem como na progressão da hipertrofia cardíaca. Adicionalmente, estes resultados avançam nosso conhecimento sobre a ativação do fator de transcrição NFAT e sua translocação para o núcleo durante a hipertrofia cardíaca. Por fim, esperamos que a compreensão deste novo e potencialmente significativo mecanismo contribua para a melhora no tratamento de patologias cardíacas tais como hipertrofia e insuficiência cardíaca.

Apoio Financeiro: National Institutes of Health, American Heart Association.