



FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA

TRABALHO FINAL DO 6º ANO MÉDICO COM VISTA À ATRIBUIÇÃO DO GRAU DE MESTRE NO ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

SOFIA FARINHA PEREIRA

O PAPEL DA UBIQUITINAÇÃO NA DEGRADAÇÃO DA  
CONEXINA EM HIPERGLICEMIA

ARTIGO CIENTÍFICO

ÁREA CIENTÍFICA DE BIOLOGIA CELULAR

TRABALHO REALIZADO SOB A ORIENTAÇÃO DE:

HENRIQUE GIRÃO

CARLA MARQUES

Setembro de 2012

# O papel da ubiquitinação na degradação da conexina em hiperglicemia

Sofia Pereira<sup>1</sup>, Henrique Girão<sup>2</sup>, Carla Marques<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal; Endereço de correio eletrónico: sofia295@msn.com

<sup>2</sup> Centro de Oftalmologia e Ciências da Visão, IBILI - Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal; Endereço de correio eletrónico: hmgirao@fmed.uc.pt

<sup>3</sup> Centro de Oftalmologia e Ciências da Visão, IBILI - Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal; Endereço de correio eletrónico: carla@ibili.uc.pt

## **Resumo**

A comunicação entre células adjacentes ocorre através de *gap junctions* (GJ), sendo estas constituídas por canais de proteínas denominadas conexinas (Cx). Uma das formas de regular a comunicação intercelular é através da degradação das Cx. A ubiquitinação de Cx43 é um sinal bem conhecido para a internalização e degradação das GJ. Apesar de estar bem descrito que em condições de hiperglicemia (HG) ocorre um aumento da degradação da Cx43, o mecanismo endocítico associado é ainda desconhecido. Assim, o principal objetivo deste trabalho é identificar os mecanismos e vias de sinalização envolvidos na degradação da Cx43 em células expostas a altas concentrações de glucose (HG). Os resultados obtidos neste estudo mostraram que em HG ocorre um aumento da ubiquitinação da Cx43, mediada pela proteína ligase de ubiquitina Nedd4, levando a uma diminuição nos seus níveis na membrana plasmática (MP) e a um concomitante aumento na sua degradação.

## **Palavras-chave**

Conexina; Ubiquitina; Nedd4; Degradação; Hiperglicemia.

## **Abstract**

Communication between adjacent cells occurs through gap junctions (GJ) and these are formed of channels composed of proteins called connexins (Cx). One way to regulate the intercellular communication is through the Cx degradation. Cx43 ubiquitination is a well-known signal of internalization and degradation of GJ. Although it is well known that in conditions of high glucose (HG), there is an increase of Cx43 degradation, the endocytic mechanism involved is yet unknown. Therefore, the main objective of this work is to identify the mechanisms and signaling pathways involved in Cx43 degradation in cells exposed to high glucose mediums (HG). The obtained results showed that in HG occurs an increase in Cx43 ubiquitination, mediated by the ubiquitin protein ligase Nedd4, resulting in a decrease in its levels on the plasma membrane, with the concomitant increase in its degradation.

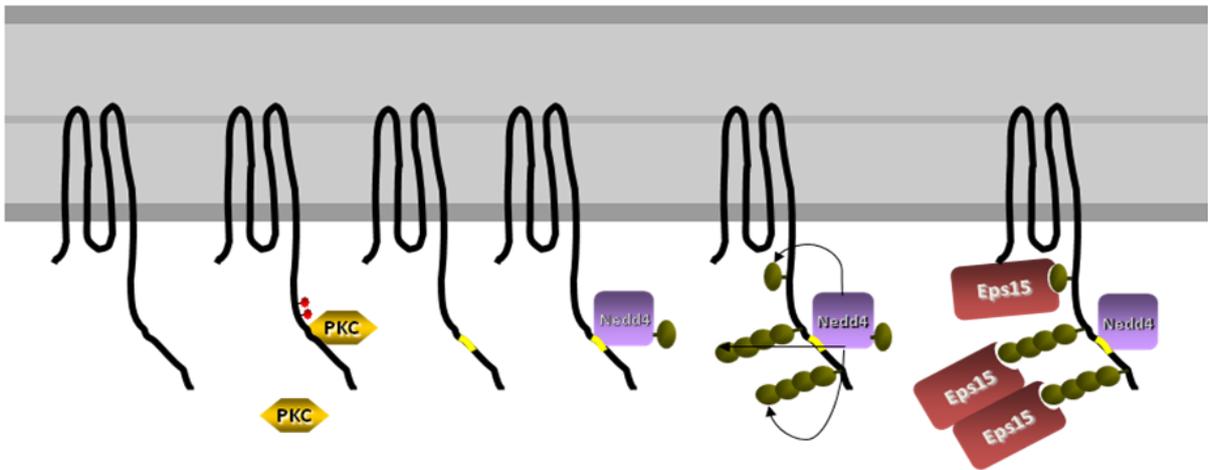
## **Key-words:**

Connexin; Ubiquitin; Nedd4; Degradation; High glucose.

## Introdução

As *gap junctions* (GJ) são estruturas intercelulares presentes na membrana plasmática (MP), que permitem a comunicação direta entre células eucariotas. Estas estruturas permitem a passagem de substâncias de baixo peso molecular ( $< 1$  kDa)<sup>1</sup>, tais como metabolitos, iões e segundos mensageiros, através de células adjacentes, favorecendo o acoplamento metabólico e elétrico das células<sup>2</sup>, fundamental para a regulação de funções como a diferenciação, desenvolvimento, polaridade, crescimento e morfogénese. Cada GJ é formado por dois hemicanais, denominados conexões, sendo cada um destes composto por seis conexinas (Cx). As GJ existem na MP das células em placas, formadas por milhares de canais individuais<sup>3</sup>, e encontram-se em diferentes células e tecidos, nomeadamente no músculo cardíaco, nos neurónios, nas células endoteliais ou nas células do epitélio pigmentado da retina (RPE). A comunicação intercelular através das GJ (GJIC) pode ser regulada a diferentes níveis, nomeadamente através da abertura e fecho dos canais, ou pelo número de canais presentes na MP. Um dos mecanismos mais importantes que contribui para a regulação da quantidade de canais presentes na MP é a internalização, e consequente degradação<sup>4</sup>. A importância da comunicação intercelular nas células do RPE foi já demonstrada<sup>5</sup>, tendo sido sugerido que alterações que comprometam este mecanismo poderão estar envolvidas no desenvolvimento de doenças oculares, tais como a retinopatia diabética e a degenerescência macular relacionada com a idade. Apesar de ter sido já demonstrado que, quando uma célula é exposta a altas concentrações de glucose, ocorre uma diminuição dos níveis de Cx43<sup>6</sup>, os mecanismos moleculares envolvidos são ainda desconhecidos. Segundo a hipótese deste estudo, que podemos visualizar na figura 1, a hiperglicémia (HG) conduz a uma ativação da proteína cinase C (PKC), que leva à fosforilação da Cx43. Esta, por sua vez, constitui um sinal para ubiquitinação, mediada pela proteína ligase de ubiquitina E<sub>3</sub> Nedd4, permitindo o recrutamento de um adaptador da via endocítica já conhecido, Eps15<sup>7</sup>, que reconhece

proteínas ubiquitinadas. Uma vez internalizadas, as vesículas endocíticas contendo *annular* GJ são degradadas no lisossoma. Assim, o principal objetivo deste projeto consiste em avaliar se a ubiquitinação da Cx43 constitui o sinal para internalização e degradação das GJ, em condições de HG. Para além disso, com este trabalho pretende-se identificar as vias de sinalização e proteínas envolvidas neste mecanismo de degradação.



**Figura 1 – Modelo proposto para a sinalização da internalização da Cx43.** A activação da PKC em condições de HG é responsável pela hiperfosforilação da Cx43 presente na MP. A fosforilação da Cx43 constitui um sinal para ubiquitinação da Cx43, mediada pela Nedd4. Uma vez ubiquitinada, a Cx43 será reconhecida pelo adaptador da via endocítica, Eps15, que reconhece o sinal da ubiquitina ligada à Cx43 e promove a internalização das GJ.

## Resultados

### **Incubação de células do RPE em condições de hiperglicémia resulta na diminuição dos níveis de Cx43**

Foi já demonstrado, em vários estudos, que a regulação da GJIC nas células do RPE é importante para a manutenção da função da retina<sup>5</sup>. Por outro lado, resultados obtidos em diferentes tipos de células de mamíferos, mostraram que concentrações elevadas de glucose conduzem á degradação de Cx43<sup>6</sup>. Assim, numa primeira fase deste estudo, procedeu-se à avaliação dos níveis da Cx43 numa linha celular do epitélio pigmentado da retina, ARPE-19, incubada na presença ou ausência de elevadas concentrações de glucose. Uma vez que a população de Cx43 presente em placas de GJ, na MP, é resistente à solubilização por *Triton X-100* 1%<sup>8</sup>, avaliou-se o efeito da HG nos níveis de Cx43 presente na fração solúvel e na fração insolúvel. Para isso, as células foram incubadas com concentrações de 5 mM (LG) e 25 mM de glucose (HG), após o que as amostras foram lisadas, na presença de 1% de *Triton X-100*. As proteínas presentes nos extractos solúveis e insolúveis, obtidos após centrifugação, foram separadas por SDS-PAGE, e os níveis de Cx43 determinados por Western blot (WB), usando um anticorpo policlonal produzido em coelho, contra uma sequência do terminal carboxílico da proteína.

Os resultados presentes na figura 2 mostram que a incubação das células ARPE-19 com 25 mM de glucose resulta numa diminuição dos níveis de Cx43, tanto na fração solúvel, como na fração insolúvel, em comparação com as células incubadas com 5 mM de glucose. A diminuição de Cx43 na fração insolúvel em *Triton X-100* sugere que a HG conduz a uma degradação das Cx43 localizada na MP, muito provavelmente inserida em placas de GJ.

### **Em condições de hiperglicemia há diminuição da Cx43 localizada na MP**

Uma vez demonstrado que há uma diminuição dos níveis totais de Cx43 presente em células incubadas em HG (Figura 2), procedeu-se, em seguida, à avaliação do efeito da HG na distribuição subcelular da Cx43, por Microscopia Confocal. Para determinar a presença de Cx43 na MP, utilizou-se, como marcador de MP, a proteína ZO-1, que interage com a Cx43 na MP<sup>9</sup>. Os resultados obtidos e presentes na figura 3 mostram que, em condições controle (LG), uma significativa população de Cx43 co-localiza com a ZO-1, indicando que está presente na MP. No entanto, em condições de HG verifica-se uma diminuição da marcação da Cx43 na MP, sugerindo fortemente que a HG resulta num aumento da internalização e, possivelmente, na degradação da Cx43.

### **A HG resulta num aumento da ubiquitinação da Cx43**

Resultados obtidos no nosso laboratório demonstraram que a ubiquitinação constitui um sinal para a internalização e degradação da Cx43<sup>8</sup>. Assim, numa fase posterior deste estudo, avaliámos o efeito da HG nos níveis de ubiquitinação da Cx43. Para isso, células ARPE-19 foram incubadas com meios contendo concentrações de 5 mM (LG) ou 25 mM de glucose (HG). Os níveis de ubiquitinação da Cx43 foram determinados por WB, utilizando um anticorpo contra a ubiquitina, após imunoprecipitação da Cx43. Amostras incubadas na ausência do anticorpo contra a Cx43 foram usadas como controlo de imunoprecipitação. De acordo com o descrito anteriormente, os resultados presentes na figura 4, em baixo, mostram que em HG há uma diminuição dos níveis de Cx43. Na mesma figura, em cima, podemos ver que a quantidade de ubiquitina ligada à Cx43 aumenta em células incubadas com HG. Estes resultados sugerem, fortemente, que a ubiquitinação da Cx43 constitui um sinal para degradação em condições de HG.

## **A degradação da Cx43 em condições de hiperglicemia depende da presença da ligase de ubiquitina Nedd4**

Estudos desenvolvidos no nosso laboratório demonstraram que a Nedd4 é a ligase da ubiquitina responsável pela ubiquitinação da Cx43<sup>7</sup>. Assim, de forma a testar a hipótese de que o mecanismo de degradação da Cx43 em condições de HG depende da ubiquitinação da Cx43, fomos avaliar o efeito da depleção da Nedd4 nos níveis de Cx43. O silenciamento da Nedd4 foi obtido através da incubação com siRNA dirigido contra a Nedd4. Deste modo, as células foram incubadas com concentrações de 5 mM (LG) e 25mM de glucose (HG), na presença ou ausência do siRNA contra a Nedd4. Os níveis totais de Cx43 e Nedd4 foram avaliados por WB. Os resultados apresentados na figura 5 mostram que, na ausência de Nedd4, os níveis de Cx43 em incubadas com HG é semelhante ao controlo (comparar linha 1 e linha 4), ou seja, a Nedd4 é necessária para que haja degradação da Cx43 induzida por HG. Estes resultados sugerem que a Nedd4 é responsável pela ubiquitinação da Cx43, e que esta constitui um sinal para degradação da Cx43 em condições de HG.

## **A HG conduz a uma diminuição da comunicação intercelular**

A diminuição da comunicação intercelular está associadas a alterações patogénicas que ocorrem tanto na *Diabetes mellitus* tipo 1, como na tipo 2<sup>10</sup>. Por outro lado, a implicação funcional mais óbvia para a degradação da Cx43 consiste na diminuição da comunicação celular. Uma vez demonstrado que a HG resulta na diminuição dos níveis de Cx43, avaliou-se, em seguida, a consequência dessa alteração em termos da eficiência da comunicação intercelular. Para isso, usou-se um ensaio, denominado *scrape-loading*, que, através da distância percorrida por uma sonda (*Lucifer yellow*), permite avaliar a GJIC. Assim, células ARPE-19 expostas a concentrações de 5 mM (LG) e 25mM de glucose (HG) foram incubadas

com 0,5% *Lucifer yellow*, que passa através das GJ, durante 8 minutos. Em seguida, as amostras foram fixadas e foi determinada a distância percorrida pela sonda, ao longo da monocamada, através do microscópio de fluorescência. Os resultados apresentados na figura 6 mostram que, em comparação com as células incubadas com LG, em condições de HG há uma significativa diminuição da difusão da sonda, desde as células na zona do rasgo. Uma vez que a distância percorrida pela sonda é proporcional ao nível de comunicação intercelular, este resultado demonstra que a HG conduz a uma diminuição da Cx43 e, conseqüentemente, a uma inibição da comunicação intercelular.

## Discussão

Os resultados apresentados neste estudo mostram claramente que, em condições de HG, ocorre uma diminuição dos níveis de Cx43, nomeadamente na MP, bem como aumento da sua forma conjugada com a ubiquitina, e que a degradação da Cx43 ocorre na dependência da Nedd4. Estes resultados sugerem que, em condições de HG, a célula responde a este estímulo através do aumento da sinalização para internalização e subsequente degradação da Cx43. Por outro lado, a importância destas alterações reflete um compromisso ao nível da comunicação entre células adjacentes. Seria pertinente, de modo a aprofundar o conhecimento deste mecanismo, realizar experiências que permitissem avaliar a semi-vida da Cx43 em HG, avaliar os níveis de ubiquitinação na presença ou na ausência de Nedd4, através do silenciamento da mesma, e também utilizar outras técnicas para avaliar as alterações dos níveis de Cx43 na MP, como a biotinylation.

Estudos anteriores mostraram que em hiperglicemia (*Diabetes mellitus*) as células da retina aumentam a degradação da Cx43 através da via proteossómica<sup>6</sup>. Estas alterações, por sua vez, levam a uma aceleração da apoptose das células vasculares da retina, alterando o transporte de moléculas sinalizadoras essenciais à sobrevivência da célula, aspeto fundamental que caracteriza as alterações verificadas na doença microvascular da *Diabetes mellitus*<sup>10</sup>. Os resultados obtidos neste projecto sugerem que o aumento na degradação da Cx43 pode implicar um mau funcionamento na comunicação entre as células vizinhas afetadas, e, no caso particular do RPE, estar associado às alterações vasculares precoces verificadas na Retinopatia Diabética, nomeadamente alterações na fagocitose de discos membranáceos dos fotorreceptores quando estes se encontram disfuncionais.

## **Material e Métodos**

### **Cultura de células e transfeções**

As células ARPE-19 foram cultivadas em *Dulbecco's Medium Modified Eagle's* (DMEM) suplementado com 10% fetal soro bovino e penicilina/estreptomicina. As células foram incubadas na presença de 5 mM (LG) ou 25mM de glucose (HG) durante 5 dias diferentes. As transfeções transitórias das células foram realizadas com Lipofectamine 2000 (Invitrogen), de acordo com as recomendações do fabricante. O silenciamento da Nedd4 foi obtido através da transfecção das células ARPE-19 com siRNA dirigido contra a proteína.

### **Imunoprecipitação e WB**

As células foram lavadas com PBS a 4°C, ressuspensas em tampão de lise (190 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 6 mM EDTA, 1% Triton X-100, pH 8.3) suplementado com um cocktail inibidor de proteases (Roche), 2 mM PMSF, 10mM de iodacetamida (que alquila resíduos de cisteína nas enzimas desubiquitinas (DUBs) em locais activos, inibindo-as), e incubadas em gelo durante 10 minutos. As amostras foram então centrifugadas a 10.000g durante 10 minutos, e os sobrenadantes foram utilizados para imunoprecipitação. Resumidamente, a proteína A foi incubada com anticorpos policlonais contra Cx43 (Zymed), ou Nedd4, por 1 h, a 4°C ou em soro de coelho não imune, seguido de incubação com sobrenadantes, durante 3h a 4°C. As amostras foram então centrifugadas e os sedimentos da proteína A-sepharose foram lavados três vezes num tampão de lavagem adequado (500 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 6 mM EDTA, 1% Triton X-100, pH 8,3), ressuspensas em tampão de Laemmli e desnaturadas a 37 ° C, durante 30 min. Para a análise de WB das proteínas imunoprecipitadas, as amostras

foram separadas por SDS-PAGE, transferidas para uma membrana de nitrocelulose, e marcadas com anticorpos apropriados.

### **Imunofluorescência**

Células cultivadas em lamelas foram fixadas com paraformaldeído a 4% em tampão fosfato salino (PBS). As amostras foram então lavadas com PBS, permeabilizadas com 0,2% v/v Triton X-100 em PBS e bloqueados com soro de cabra durante 20 minutos antes da incubação com anticorpos primários. Fez-se a incubação com anticorpos primários contra Cx43 (Transdução Lab) durante 1 hora a temperatura ambiente. As amostras foram então lavadas três vezes com PBS antes da incubação com o anticorpo secundário durante 1 hora, à temperatura ambiente. As amostras foram lavadas em PBS e montadas com Glycergel (Dako). Todas as soluções foram elaboradas a partir de 0,2% w/v BSA (Sigma), contendo 0,02% de azida de sódio (Sigma) em PBS. Para os controlos, os anticorpos primários foram omitidos. As imagens de microscopia confocal foram obtidas usando um microscópio Zeiss LSM710.

### **Ensaio de comunicação intercelular**

A avaliação da comunicação intercelular entre células através das GJ foi efectuada através de ensaios de *scrape-loading*. Esta técnica baseia-se na permeabilidade passiva das GJ a substâncias com peso molecular inferior a 1000 Da, como é o caso da *Lucifer yellow*, que uma vez introduzida numa célula, passa, através das GJ, para células vizinhas. A distância percorrida pela sonda é proporcional à eficiência da comunicação intercelular.

As células ARPE-19 foram incubadas com concentrações de 5 mM (CT) e 25mM de glucose (HG). Posteriormente, fizeram-se 3 “rasgos” na monocamada de células aderentes a lamelas

de vidro, após o que foram incubas com 0,5% *Lucifer yellow*, durante 8 minutos. As amostras foram depois lavadas com PBS e fixadas com 4% PFA. De seguida, foi determinada a distância percorrida pela sonda, ao longo da monocamada, através do microscópio de fluorescência.

## **Agradecimentos**

Um agradecimento especial ao meu orientador, Professor Henrique Girão, pela disponibilidade, paciência e atenção, e sem o qual este trabalho não seria possível, e à minha co-orientadora, Professora Carla Marques.

Às várias pessoas com as quais trabalhei no laboratório e que me ajudaram durante estes três anos.

Aos meus pais, que me deram suporte emocional para nunca desistir.

## Referências Bibliográficas

1. Gilula, N. B.; Reeves, O. R.; Steinbach, A. Metabolic Coupling, Ionic Coupling and Cell Contacts. *Nature* **235**, 262-265. (1972)
2. Unger, V. M.; Kumar, N. M.; Gilula, N. B.; Yeager, M. Three-Dimensional Structure of a Recombinant Gap Junction Membrane Channel. *Science* **283**, 1176-1180. (1999)
3. McNutt, N. S.; Weinstein, R. S. The ultrastructure of the nexus. *J. Cell Biol.* **47**, 666-688. (1970)
4. Berthoud, V. M.; Minogue, P. J.; Laing, J. G.; Beyer, E. C. Pathways for degradation of connexins and gap junctions. *Cardiovasc. Res.* **62**, 256–267. (2004)
5. Cook, J. E.; Becker, D. L. Gap junctions in the vertebrate retina. *Microsc. Res. Tech.* **31**, 408-419. (1995)
6. Fernandes, R.; Girão, H.; Pereira, P. High Glucose Down-regulates Intercellular Communication in Retinal Endothelial Cells by Enhancing Degradation of Connexin 43 by a Proteasome-dependent Mechanism. *J. Biol. Chem.* **279** (26), 27219–27224. (2004)
7. Girão, H.; Catarino, S.; Pereira, P. Eps15 interacts with ubiquitinated Cx43 and mediates its internalization. *Exp. Cell Res.* **315** (20), 3587-3597. (2009)
8. Catarino S.; Ramalho, J. S.; Marques, C.; Pereira. P.; Girão, H. Ubiquitin-mediated internalization of connexin43 is independent of the canonical endocytic tyrosine-sorting signal. *Biochem. J.* **437**; 255–267. (2011)
9. Girao, H.; Pereira, P. The Proteasome Regulates the Interaction Between Cx43 and ZO-1. *J. Cell. Biochem.* **102**; 719–728. (2007)
10. Wright, J. A.; Richards, T.; Becker, D. L. Connexins and Diabetes. *Cardiology Research and Practice* **2012**:496904. (2012)

## Legenda das Figuras

**Figura 2 – Efeito da HG na quantidade e solubilidade em *Triton X-100*.** Células ARPE-19 foram incubadas na presença de 5 mM (LG) e 25mM de glucose (HG) durante 5 dias. As amostras recolhidas foram lisadas utilizando um tampão contendo 1% de *Triton X-100* e a quantidade de Cx43 na fração solúvel (Triton soluble) e insolúvel (Triton insoluble) foi determinada por WB usando anticorpos contra a Cx43.

**Figura 3 – A HG induz uma redistribuição subcelular da Cx43.** Células ARPE-19 foram incubadas na presença de 5 mM (LG) e 25mM de glucose (HG) durante 5 dias, sendo posteriormente fixadas e incubadas com anticorpos contra Cx43 (monoclonal – vermelho) e ZO-1 (policlonal - verde). Foram visualizadas através de microscopia confocal.

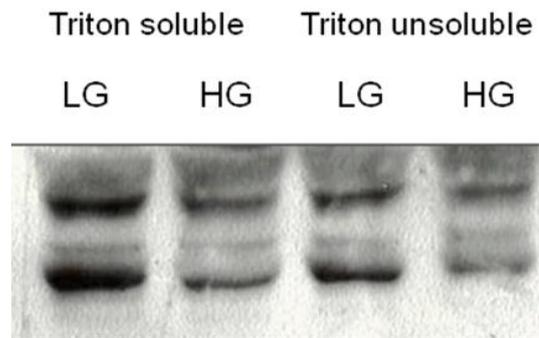
**Figura 4 – Os níveis de ubiquitinação da Cx43 aumentam em HG.** Células ARPE-19 foram incubadas na presença de 5 mM (LG) e 25mM de glucose (HG) durante 5 dias. Após imunoprecipitação da Cx43, usando anticorpos policlonais contra a Cx43, as amostras foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida, e os conjugados de ubiquitina detetados por WB usando anticorpos contra a ubiquitina.

**Figura 5 – A degradação da Cx43 em HG requer a presença de Nedd4.** Células ARPE-19 foram incubadas em meio contendo 5 mM (LG) ou 25mM de glucose (HG), durante 5 dias, na presença ou ausência de siRNA contra a Nedd4. Posteriormente, as amostras foram analisadas por WB, utilizando um anticorpo contra a Nedd4 e contra a Cx-43.

**Figura 6 - A HG induz uma diminuição da comunicação intercelular mediada por GJ.**

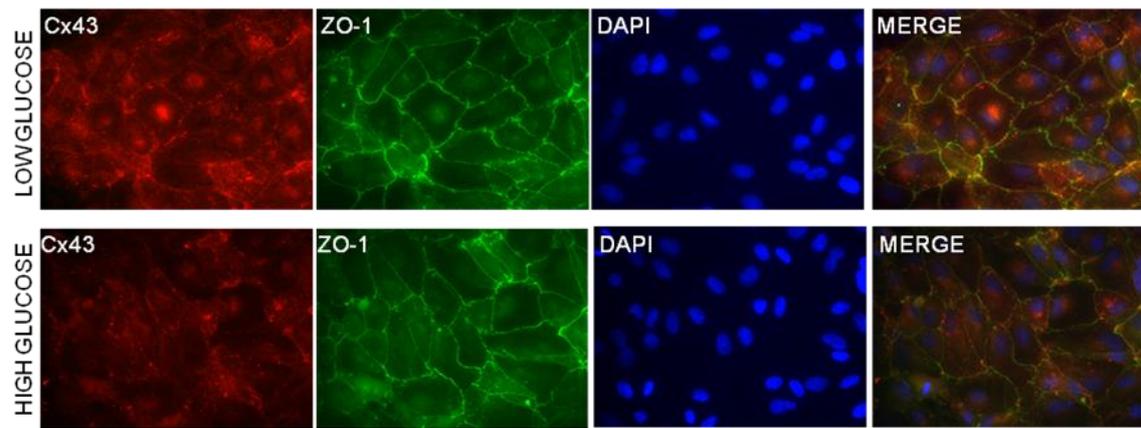
Células ARPE-19 foram incubadas com 5 mM (LG) ou 25mM de glucose (HG) durante 5 dias. A avaliação da comunicação intercelular foi feita através de ensaios de *scrape loading/dye transfer*. A distância percorrida pela sonda *Lucifer yellow* foi determinada por microscopia de fluorescência.

## Figuras

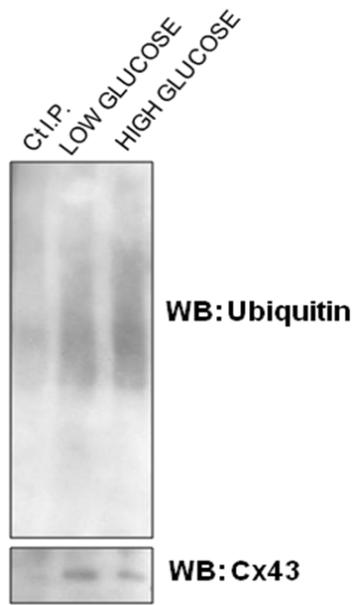


WB: Cx-43

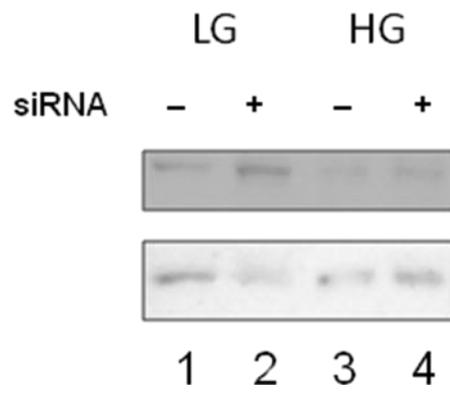
**Figura 2 – Efeito da HG na quantidade e solubilidade em Triton X-100**



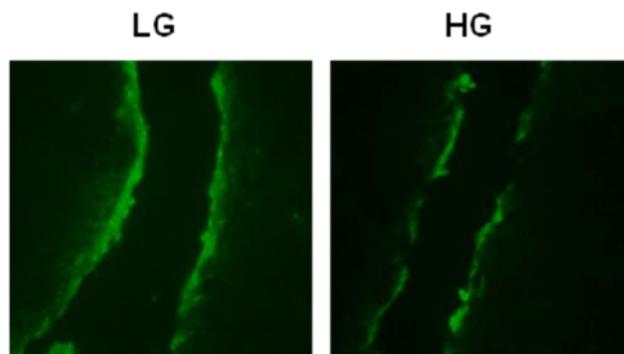
**Figura 3 – Efeito da HG na distribuição subcelular da Cx43.**



**Figura 4 – Efeito da HG na ubiquitinação da Cx43.**



**Figura 5 – Na ausência de Nedd4, os níveis de Cx-43 aumentam em HG.**



**Figura 6 - Efeito da HG na comunicação intercelular.**