

Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais

Laboratório Nacional de Biociências

Investigação dos mecanismos de sinalização que medeiam a
comunicação neurônio e micróglia em condições de estresse de DNA
mitocondrial

Pesquisador responsável: Ângela Saito

Campinas, abril de 2021

Introdução

Disfunção mitocondrial e neuroinflamação em doenças neurodegenerativas

Alterações de função mitocondrial e neuroinflamação são eventos frequentes em doenças neurodegenerativas e no envelhecimento. As mitocôndrias, como organelas que orquestram diferentes papéis no metabolismo, homeostase e morte celular, também podem contribuir para a sinalização inflamatória (Picca et al., 2020; Riley and Tait, 2020). Apresentam um genoma independente do nuclear chamado de DNA mitocondrial (mtDNA) e são a principal fonte de espécies reativas de oxigênio (EROS) oriundas da atividade de fosforilação oxidativa (OXPHOS). As mitocôndrias e o mtDNA são alvos de EROS e disfunção mitocondrial associada a estresse oxidativo colabora com a neurodegeneração. Em adição, a etiologia dessa doença pode ser genética, decorrente de mutações no mtDNA e no genoma nuclear, já que a maior parte das proteínas mitocondriais é codificada pelo genoma nuclear. Mutações nas subunidades de OXPHOS e proteínas mitocôndrias afetam a estrutura e função mitocondrial (Taylor and Turnbull, 2005; Su et al., 2010).

Padrões moleculares associados a dano, DAMPS (do inglês, *danger-associated molecular patterns*), derivados de componentes intracelulares produzidos e/ou liberados durante estresse celular e dano, podem levar a ativação de resposta imune inata. Em particular, estimulação de vias pró-inflamatórias podem ser provocadas pela liberação de DAMPS derivados da mitocôndria (mtDAMPs), incluindo peptídeos N-formilados e mtDNA. Este último, quando liberado para o citoplasma, indiretamente induz uma sinalização para o núcleo e reprogramação da expressão de genes nucleares para atender a ativação da resposta imune inata (English et al., 2020). Os DAMPs são reconhecidos por receptores de reconhecimento de padrão, PRRs (do inglês, *pattern recognition receptors*), os quais podem promover uma inflamação estéril, que é importante para reparo do tecido e regeneração, mas também podem levar a doenças inflamatórias (Gong et al., 2019). Os PRRs podem ser classificados em quatro grupos, *NOD-like receptors* (NLRs), *Toll-like receptors* (TLRs), *retinoic acid-inducible gene-1 (RIG-I)-like receptors* (RLRs) e *C-type lectin receptors* (CLRs). A ativação desses receptores pode iniciar vias de sinalização diferentes que culminam na ativação de interferons tipo I, quimiocinas pró-inflamatórias e citocinas. Em particular, quando o mtDNA é ejetado da mitocôndria para o citoplasma, em condições específicas, vias de imunidade inata como sinalização por cGAS-STING, inflamassoma e receptores Toll-like TLR9 podem ser ativadas (Figura 1) (Riley and Tait, 2020).

Dentre as células da imunidade inata, as micróglias são os elementos principais da inflamação no sistema nervoso central (SNC). Além de seu papel primário na indução e manutenção das respostas inflamatórias em condições patológicas, as micróglias também exercem funções importantes para a homeostase do SNC. Em condições fisiológicas, essa célula da glia possui morfologia ramificada, faz contato com estruturas da rede neuronal como axônios e sinapses, e é mantida principalmente em estado quiescente ou inativado, enquanto também desempenha funções de vigilância imune e suporte trófico para o SNC. Dessa forma, esse tipo celular contribui para a maturação dos circuitos neuronais durante o desenvolvimento, manutenção da homeostase sináptica e do remodelamento de neurônios no cérebro adulto (Gong et al., 2019; Leng e Edison, 2021).

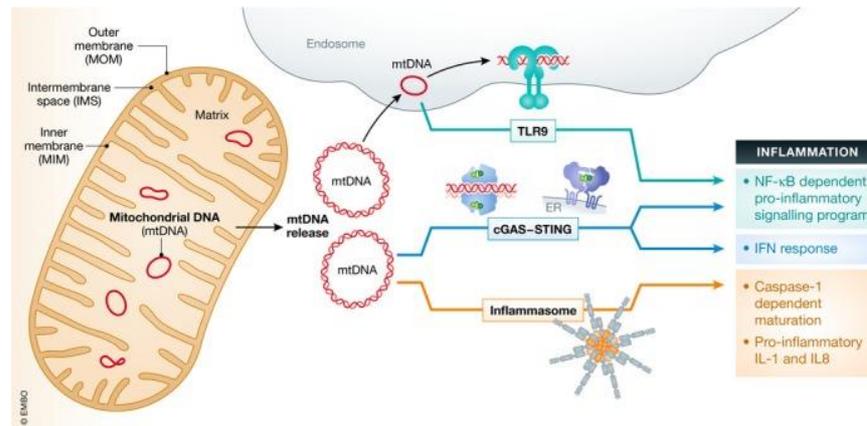


Figura 1: Vias de sinalização pró-inflamatória ativadas por mtDNA citoplasmático. mtDNA pode provocar as vias de sinalização mediadas por 1) TLR9 no endossomo que envolve a ligação dessa proteína ao mtDNA no endossomo e leva a ativação do programa de sinalização pró-inflamatória dependente de NF-κB; 2) cGAS-STING citoplasmático em que cGAS reconhece mtDNA no citosol e ativa a proteína do retículo endoplasmático STING provocando uma resposta mediada por interferon; 3) inflamassoma (AIM2 e NLRP3), na qual há ativação de caspase 1 ou liberação de citocinas pró-inflamatórias IL-1 e IL-8 (Riley and Tait, 2020).

A comunicação recíproca entre neurônios e micróglia ocorre por mecanismos dependentes de contato mediados por receptores de membrana e moléculas de superfície, bem como através de fatores solúveis e vesículas extracelulares (EVs) liberados para o espaço extracelular. Nesse contexto, os neurônios informam as micróglia sobre seu status e assim são capazes de controlar a ativação microglial e motilidade, enquanto as micróglia também modulam as atividades neuronais (Szepesi et al., 2018; Picca et al., 2020).

As funções microgliais são amplamente dependentes do tipo de estímulo de ativação, do tempo após a estimulação e fatores locais durante as condições patológicas. As respostas podem ter efeitos neurotóxicos, mas também neuroprotetores no sentido de rapidamente eliminar o insulto para retornar a homeostase tecidual. Nesse contexto, a ativação microglial em estágios iniciais da patogênese da Doença de Alzheimer, por exemplo, tem sido considerada neuroprotetora. Entretanto, em estágios tardios da doença ou em condições de resposta aguda aumentada ou prolongada em que a ativação microglial persistente leva ao aumento da liberação de citocinas e quimiocinas inflamatórias, além de recrutamento de células periféricas para o cérebro, o resultado pode levar à disfunção sináptica, morte celular e inibição da neurogênese. É evidente, portanto, que as células microgliais estão envolvidas em diversas doenças do cérebro como Doença de Alzheimer, Parkinson, traumas e isquemia cerebral, e doenças psiquiátricas como esquizofrenia (Leng e Edison, 2021).

O estado quiescente das micróglia é mantido, ao menos em parte, sob controle das vias de sinalização de fatores neuronais, CD200 e fractalkina CX3CL1, os quais se mantêm ligados aos receptores microgliais, CD200R e CX3CR1, respectivamente. A expressão de CD200, CD200R e CX3CR1 é reduzida no cérebro de indivíduos com Doença de Alzheimer, sugerindo que a perda das restrições fisiológicas no comportamento das micróglia pode contribuir para a patologia. Dada a importância das mudanças fenotípicas microgliais, combater a comunicação celular desregulada é uma abordagem plausível para intervenção terapêutica da neuroinflamação (Leng e Edison, 2021).

O envolvimento de TFAM na sinalização de estresse mitocondrial

O Fator de Transcrição Mitocondrial A (TFAM) é codificado pelo genoma nuclear e exerce funções essenciais na transcrição e replicação mitocondrial. Assim como outras proteínas HMG box, TFAM também é capaz de se ligar e compactar o mtDNA em nucleoides. Cada nucleioide é composto por uma cópia de mtDNA e algumas proteínas, dentre as quais a mais abundante é TFAM (1000 moléculas de TFAM por moléculas de mtDNA) (Kukat et al., 2011). Experimentos *in vivo* em modelo de camundongo mostraram que o nocaute do gene de TFAM leva a letalidade embrionária, redução de mtDNA, desorganização de cristas mitocondriais e disfunção da OXPHOS (Larsson et al., 1998). A superexpressão de TFAM apresentou efeitos protetores em modelos de doenças metabólicas, cardiovascular e neuropatológicas (Kang et al., 2018), bem como o tratamento de camundongos envelhecidos com a proteína recombinante humana TFAM melhorou a memória dos animais juntamente com recuperação da respiração mitocondrial, expressão da polimerase mitocondrial POLG e transcrição de mtDNA (Thomas et al., 2012).

Dessa forma, é evidente que a redução do número de cópias de mtDNA, bem como de TFAM, está associada com doenças neurodegenerativas. TFAM tem sido considerado como elemento central nas respostas inflamatórias mediadas por estresse de mtDNA (Kang et al., 2018). West e colaboradores (2015) demonstraram que a deficiência em TFAM resulta em estresse de mtDNA moderado, liberação de mtDNA para o citosol, ativação da sinalização antiviral citosólica cGAS-STING-TBK1, que culmina no aumento de expressão de genes estimulados por interferon (ISGs) e confere resistência à infecção viral (West et al., 2015). Wu et al 2019 propôs ainda que o dano e subsequente liberação de mtDNA para o citoplasma elicitava uma resposta de sinalização protetora que promove o aumento do reparo de DNA nuclear em células e tecidos, sugerindo que o mtDNA possa atuar como sentinela do estresse genotóxico.

White et al., 2014 e Rongvaux et al., 2014 exploraram a liberação de mtDNA no contexto da morte celular. Eles mostraram que na ausência da ativação de caspase apoptótica, mtDNA ativa cGAS de forma promíscua, que leva a aumento dos níveis sanguíneos de IFN- β e induz a expressão de ISGs. Esses resultados sugerem que a cascata de caspases é crucial para diminuir a resposta por interferon tipo I em células em processo de morte/apoptose, isto é, mantendo a natureza da apoptose mitocondrial imunologicamente silenciosa.

Dessa forma, dada a importância de TFAM em doenças metabólicas e neurodegenerativas, a melhor compreensão dos mecanismos pelos quais o estresse de mtDNA (induzido pela deficiência em TFAM) contribui para a ativação de respostas inflamatórias, pode trazer novas estratégias terapêuticas para essas doenças. Nesse contexto, o entendimento mais profundo da comunicação neurônio e micróglia, esta como importante componente do SNC com papéis neuroprotetores ou neurotóxicos, nos permite interferir no avanço da doença em três formas, através da supressão das propriedades pró-inflamatórias da micróglia para limitar o efeito deletério da ativação microglial; através da modulação das mudanças fenotípicas para favorecer suas propriedades anti-inflamatórias; ou por influenciar no processo de preparação microglial (*priming*) durante os estágios iniciais da doença (Leng e Edison, 2021).

Objetivos

Os objetivos do projeto são produzir um modelo de estresse mitocondrial em células neuronais através da depleção do fator de transcrição mitocondrial TFAM e investigar os padrões moleculares associados a dano que sinalizam para ativação microglial e que poderão atuar como índice prognóstico precoce para doenças neuroinflamatórias.

Especificamente, os objetivos são:

- 1) Estabelecer linhagem de células neuronais com depleção para o fator de transcrição mitocondrial TFAM utilizando a ferramenta CRISPR/Cas9.
- 2) Confirmar a inativação do gene através de PCR e WB para TFAM, bem como através de ensaios de microscopia confocal e qRT-PCR para avaliar função mitocondrial e quantidade de DNA mitocondrial, respectivamente.
- 3) Realizar a marcação de DNA mitocondrial utilizando a sonda fluorescente PicoGreen e microscopia confocal para verificar se há liberação de mtDNA no citoplasma.
- 4) Investigar a ativação de vias de sinalização pró-inflamatórias induzidas por mtDNA citoplasmático através de análise da expressão de genes por qRT-PCR. Avaliar a expressão de genes estimulados por interferon (ISGs), inflamassoma, TLR9.
- 5) Estabelecer o protocolo de cultura primária de células microgliais a partir de córtex de camundongo CX3CR1-GFP/+. As micróglias expressarão a proteína verde fluorescente GFP.
- 6) Realizar a co-cultura de células neuronais selvagens (WT) e depletadas em TFAM com micróglias CX3CR1-GFP/+.
- 7) Investigar como o estresse de DNA mitocondrial em neurônios afeta a comunicação neurônio-micróglia através de medidas de metabolismo de micróglia (análise da morfologia celular por microscopia e do padrão de diferenciação de micróglia em M1 (pró-inflamatório) e M2 (anti-inflamatório) por qRT-PCR).
- 8) Realizar o metaboloma do sobrenadante e pellet da co-cultura de neurônios com micróglias a fim de identificar os fatores solúveis e não solúveis que podem estar associados aos mecanismos de comunicação entre neurônios e micróglias em condições basais e em condições de estresse de DNA mitocondrial.

Metodologia

Cultura de células

As células da linhagem de neuroblastoma humano SHSY5Y serão cultivadas em meio DMEM-F12 suplementado com 10 % de Soro fetal bovino (SFB) e 1 % de Penicilina /Estreptomicina e mantidas em incubadora de CO₂ a 37°C e 5% de umidade.

Produção de células nocautes

Para inativar o gene de interesse utilizando a ferramenta de CRISPR/Cas9, as sequências do RNA guia selecionadas após análise no software CRISPOR serão clonadas no vetor px459 o qual também possui o gene para expressão da endonuclease Cas9 e o gene de resistência a puomicina para seleção de clones de células modificadas.

Western blotting e genotipagem por PCR

As células serão coletadas e lisadas em tampão RIPA (Tris-HCl 50 mM (pH 8), NaCl 150 mM, detergente NP40 1%, deoxicolato de sódio 0,5%, SDS 0,1%) suplementado por coquetel de inibidores de protease, DNaseI 10 µg/mL e RNaseA 20 µg/mL. Os extratos proteicos serão quantificados utilizando o kit Pierce BCA Protein Assay, separados em gel de SDS-PAGE e submetidos ao Western blot, utilizando-se anticorpos específicos para as proteínas de interesse.

Para a identificação dos clones de células nocautes para o gene de interesse, as mesmas terão seu DNA genômico (gDNA) extraído e utilizado para ensaio de PCR a fim de amplificar as regiões de mutação utilizando a enzima Phusion e primers específicos. O fragmento amplificado será enviado para sequenciamento Sanger.

Microscopia confocal

As células serão plaqueadas em lâminas redondas de vidro colocadas em placas de 24 poços. Para marcação de DNA mitocondrial e mitocôndrias, as células serão incubadas com o corante de DNA dupla fita PicoGreen e MitoTracker DsRed. Para análise da morfologia de micróglia, a fluorescência da proteína EGFP expressa sob promotor de CX3CR1 será visualizada em microscópio confocal Leica.

PCR em tempo real quantitativo (qRT-PCR)

Para o qRT-PCR, o RNA total será extraído de células utilizando o reagente TRIzol, conforme recomendação do fabricante. As amostras de RNA serão transcritas em primeira fita de cDNA utilizando o kit First Strand cDNA Synthesis Kit. Os ensaios de qRT-PCR serão realizados em triplicata, com volume final de 10 µL contendo 1 µL cDNA, oligonucleotídeos para cada gene específico, SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) e água deionizada, em equipamento Applied Biosystems 7500 Systems (Applied Biosystems).

Cultura primária de micróglia

Cortexes de camundongos P1 a P3 serão dissecados, dissociados em tripsina e plaqueados em meio de cultura DMEM-F12 com 10% SFB e 1% de antibióticos, e mantido em cultura por 12 a 20 DIV. A cultura microglial serão preparadas pelo método de tripsinização branda de forma a obter 98% de micróglia em cultura.

Metaboloma

O ensaio de metaboloma será realizado no laboratório de Ressonância Magnética Nuclear (RMN/CNPem) segundo protocolos previamente estabelecidos.

Referências

- English J, Son JM, Cardamone MD, Lee C, Perissi V (2020) Decoding the rosetta stone of mitonuclear communication. *Pharmacol Res* 161: 105161.
- Gong T, Liu L, Jiang W, Zhou R (2019) DAMP-sensing receptors in sterile inflammation and inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol* 20: 95 – 112.
- Kang I, Chu CT, Kaufman BA (2018) The mitochondrial transcription factor TFAM in neurodegeneration: emerging evidence and mechanisms. *FEBS Lett.* 592(5):793-811.
- Kukat C, Wurm CA, Spähr H, Falkenberg M, Larsson N-G, Jakobs S (2011) Super-resolution microscopy reveals that mammalian mitochondrial nucleoids have a uniform size and frequently contain a single copy of mtDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 13534–13539.
- Larsson NG, Wang J, Wilhelmsson H, Oldfors A, Rustin P, Lewandoski M, Barsh GS, Clayton DA (1998) Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice. *Nat Genet.* 18(3):231-6.
- Leng F, Edison P (2021) Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here? *Nat Rev Neurol.* 2021 17(3):157-172.
- Picca A, Calvani R, Coelho-Junior HJ, Landi F, Bernabei R, Marzetti E (2020) Mitochondrial Dysfunction, Oxidative Stress, and Neuroinflammation: Intertwined Roads to Neurodegeneration. *Antioxidants (Basel).* 9(8):647.
- Riley, J. S., & Tait, S. W. (2020) Mitochondrial DNA in inflammation and immunity. *EMBO reports*, 21(4), e49799.
- Rongvaux A, Jackson R, Harman CCD, Li T, West AP, de Zoete MR, Wu Y, Yordy B, Lakhani SA, Kuan C-Y et al (2014) Apoptotic caspases prevent the induction of type I interferons by mitochondrial DNA. *Cell* 159: 1563 – 1577.
- Su B, Wang X, Zheng L, Perry G, Smith MA, Zhu X (2010) Abnormal mitochondrial dynamics and neurodegenerative diseases. *Biochim Biophys Acta* 1802:135–42.
- Szepesi Z, Manouchehrian O, Bachiller S, Deierborg T (2018) Bidirectional Microglia-Neuron Communication in Health and Disease. *Front Cell Neurosci.* 27;12:323.
- Taylor, R., Turnbull, D (2005) Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat Rev Genet* 6, 389–402.
- Thomas RR, Khan SM, Smigrodzki RM, Onyango IG, Dennis J, Khan OM, Portelli FR, Bennett JP Jr (2012) RhTFAM treatment stimulates mitochondrial oxidative metabolism and improves memory in aged mice. *Aging* 4(9):620-35.
- West AP et al (2015) Mitochondrial DNA stress primes the antiviral innate immune response. *Nature* 520, 553–557.
- White MJ, McArthur K, Metcalf D, Lane RM, Cambier JC, Herold MJ, van Delft MF, Bedoui S, Lessene G, Ritchie ME et al (2014) Apoptotic caspases suppress mtDNA-induced STING-mediated type I IFN production. *Cell* 159: 1549 – 1562
- Wu Z, Oeck S, West AP, Mangalharra KC, Sainz AG, Newman LE, Zhang XO, Wu L, Yan Q, Bosenberg M, Liu Y, Sulkowski PL, Tripple V, Kaech SM, Glazer PM, Shadel GS (2019) Mitochondrial DNA Stress Signalling Protects the Nuclear Genome. *Nat Metab.* 1(12):1209-1218.