

INSTITUIÇÃO SEDE – *Laboratório Nacional de Biociências – LNBio/CNPq.*

PESQUISADOR RESPONSÁVEL – *Dra. Ana Carolina Migliorini Figueira*

PROJETO DE PESQUISA:

Expressão, purificação e caracterização de receptores nucleares.

Receptores nucleares (NRs) são proteínas reguladoras do desenvolvimento e diferenciação celular e da fisiologia orgânica, tendo como função regular a transcrição gênica. Eles são fatores de transcrição dependentes de ligante que atuam em sequências específicas de DNA, conhecidas como elementos responsivos a receptores nucleares (REs). Dentro desta família de proteínas, encontram-se os receptores nucleares órfãos, assim denominados porque foram identificados sem um conhecimento prévio de sua associação a um ligante.¹

Por estarem envolvidas com a transcrição gênica e a regulação de vários mecanismos de sinalização celular estas proteínas estão ligadas a vários processos fisiológicos como homeostase, proliferação celular, metabolismo e, portanto estão intimamente relacionadas a várias doenças, sendo considerados excelentes alvos para o desenvolvimento de fármacos.²

De um modo geral os NRs se encontram ligados a correpresores na ausência de ligantes. Estes correpresores transcricionais atuam recrutando complexos protéicos contendo deacetilases de histonas (*histone deacetylases*, HDAC) o que resulta na repressão gênica. Por outro lado, na presença de ligantes, os NRs sofrem mudanças conformacionais que levam ao desligamento dos correpresores e permitem o recrutamento de proteínas coativadoras. Os coativadores, por sua vez, atuam no recrutamento de complexos que acetilam histonas (*histone acetyl-transferases*, HAT) levando a descondensação da cromatina, permitindo que em seguida a maquinária de transcrição possa iniciar a transcrição dos genes alvos.¹

Neste projeto temos por objetivo caracterizar dois NRs em específico como o receptor de hormônio tireoideano (TR α) e o receptor homólogo sem cauda (*tailless homolog*, TLX).

O TR tem como ligante o hormônio tireoideano triiodotironina (T3) e está relacionado a diferentes patologias como inflamação, distúrbios causados pelos hormônios tireoidianos (hipotireoidismo e/ou hipertireoidismo), cardiopatias e, até mesmo, obesidade e variações nos níveis de colesterol. No nosso organismo encontram-se quatro isoformas bem caracterizadas do TR: TR α 1, TR α 2, TR β 1 e TR β 2 e outras isoformas menos estudadas, identificadas mais recentemente. Até o presente momento nenhuma diferença funcional entre as isoformas foi demonstrada, entretanto a manutenção dos genes alfa e beta durante a evolução dos vertebrados sugere a existência de diferenças funcionais entre elas. O TR α é expresso em muitos sistemas fisiológicos, como sistema endócrino, metabólico, gastrointestinal, reprodutivo e cardiopulmonar;

apresentando altos níveis de expressão no sistema nervoso central incluindo cerebelo e hipotálamo. Além de estar envolvido nas patologias de hiper e hipotireoidismo, o TR também está relacionado com problemas cardiovasculares, problemas inflamatórios e diversos tipos de câncer.^{3,4}

O TLX, diferentemente do TR é um receptor nuclear órfão, para o qual nenhum ligante foi identificado até o momento. Ele é expresso exclusivamente no cérebro e no corpo estriado, sendo um regulador chave da neurogênese. Este receptor foi menos estudado que o TR até o momento, mas sabe-se que está ligado a patologias que envolvem o sistema nervoso central e o cérebro, como por exemplo, foi visto que sua expressão evita distrofia de retina, pois está envolvido no desenvolvimento ocular e estudos mais recentes mostram que pode estar envolvido em Alzheimer também.^{5,6}

Assim como todos os NRs, o TR e o TLX apresentam uma estrutura organizada em domínios. O domínio N-terminal apresenta a função de ativação independente de ligante e não é bem estruturado; um domínio de ligação ao DNA conhecido como DBD (*DNA binding domain*) que é bem conservado, responsável pelo reconhecimento e ligação aos REs; um *hinge* móvel que liga o DBD ao domínio seguinte e atua na dimerização dos receptores e um domínio de ligação ao ligante (LBD, *ligand binding domain*) responsável pela ligação ao hormônio e também pela dimerização dos receptores.¹

Neste sentido, o objetivo deste projeto é caracterizar por métodos biofísicos o receptor TR α completo e sua interação com proteínas coativadoras, uma vez que nenhuma estrutura ou estudos na literatura com este receptor apresentam a proteína completa, apenas domínios separados. E, no caso do TLX propõe-se caracterizar os domínios separados e o receptor completo. Para tanto será feita a expressão das proteínas em bactéria; purificação das mesmas por afinidade e filtração em gel; e a caracterização biofísica das proteínas puras utilizando técnicas como dicroísmo circular (CD) para avaliar a estrutura secundária das proteínas produzidas, ensaios de *thermalshift* (TSA), fluorescência, espalhamento de luz dinâmico (DLS), gel nativo, além de testes de cristalização e experimentos de espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS). Ressaltando que estes estudos são extremamente importantes para entender o funcionamento destes receptores e buscar novas interfaces de interações que podem ser alvos promissores para o desenvolvimento de fármacos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

-
- ¹ Aranda, A.; Pascual, A. (2001) Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol. Rev.* 81, 1269–1304.
- ² Fattori, J. et al. Investigation of interactions between DNA and Nuclear Receptors: an overview of the most used methods. Artigo submetido to Nuclear Receptor Research 2014
- ³ Darling, D.S. et al. (1993) Different dimerization activities of alpha and beta thyroid hormone receptor isoforms. *J. Biol. Chem.* 268, 10221-10227.
- ⁴ Boelaert, K.; Franklyn, J.A. (2005) Thyroid hormone in health and disease. *J. Endocrinol.* 187, 1-15.
- ⁵ Zhang, C.-Z. et al. (2006) Nuclear receptor TLX prevents retinal dystrophy and recruits the corepressor atrophin1. *Genes Dev.* 20, 1308-1320.
- ⁶ Wang, Y. et al. (2013) Role of the nuclear receptor Tailless in adult neural stem cells. *Mech. Dev.* 130, 388-390.