Caracterização biofísica dos mutantes acetil-miméticos de PPARγ, no contexto da obesidade e resistência a insulina.

Pesquisador Responsável: Dra. Ana Carolina Migliorini Figueira

Local de atuação: LNBio

1. Introdução:

A manutenção da homeostase metabólica é essencial para o correto funcionamento das funções vitais do organismo. Ao nível celular, os receptores nucleares (RN) exercem papel fundamental na regulação da homeostase metabólica pois atuam como fatores de transcrição na modulação de expressão de genes alvo. A disfunção desses receptores leva ao desenvolvimento de quadros clínicos como a síndromes metabólica (SM), que gera o aumento da probabilidade de doenças cardíacas, acidente vascular cerebral, obesidade e resistência à insulina (Elabbassi., 2018).

Nesse cenário, o RN PPARγ (*receptor ativado através de proliferadores de peroxissomos gamma*) atua como fator de transcrição na regulação de genes relacionado ao metabolismo de lipídeos, carboidratos, e proteínas tendo papel fundamental no desenvolvimento e diferenciação celular. (Tavares *et al*., 2007). Por estar envolvido em diferentes funções metabólicas, é alvo dos fármacos da classe das tiazolidinedionas, usados amplamente no tratamento de pacientes com diabetes do tipo II e enfermidades relacionadas. Nos últimos anos, a administração desse fármaco tem ganhado debate entre os pesquisadores por levar a efeitos maléficos, além daqueles propostos inicialmente no tratamento. Por isso, o estudos que visam novos mecanismos de regulação desse receptor, são de extrema importância para o melhor tratamento dos pacientes (Soccio et al., 2014 e Cariou et al., 2012).

Estudos recentes mostram que as modificações pós-traducionais ocorridas no PPARγ regulam seu funcionamento (Qiang *et al*., 2012). Essas modificações tem despertado interesse da comunidade científica dado os seus efeitos benéficos ao organismo destacando-se, a sensibilização à insulina e ao *Browning* do tecido adiposo branco. Esses efeitos são causados pela ação da desacetilase SIRT1 (sirtuina 1), responsável pela desacetilação dos resíduos K268 e K293 do PPARγ. Os efeitos dessas modificações levam ao recrutamento diferencial de correguladores que atuam em conjunto com PPARγ, modulando assim, a expressão de genes alvo desse receptor.

Os resíduos K268 e K293 se encontram estruturalmente próximos e encontram-se no domínio de ligação ao ligante do PPARγ. Esse domínio é conhecido por ser regulado por moléculas produzidas pela célula ou pela administração de ligantes como os fármacos tiazolidinedionas. Apesar do fato desses resíduos serem alvo da desacetilase, as interfaces de interação responsáveis pela atividade de SIRT1 no PPARγ, bem como os resíduos de interação entre elas ainda é desconhecido (Figura 1). Por isso, esse trabalho tem como objetivo a produção e caracterização de mutantes acetil-miméticos de PPARγ humano para estudos de afinidade e estruturais em conjunto com SIRT1.

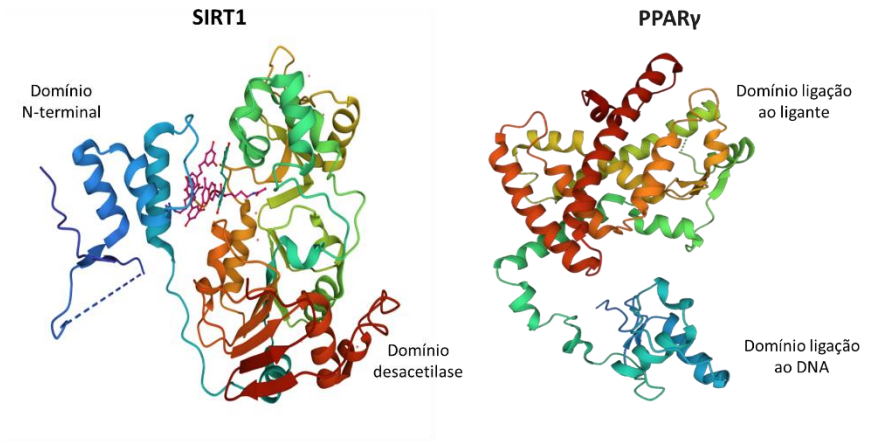

Figura 1. Estrutura cristalográfica de SIRT1 e PPARγ. SIRT1 contém um domínio de desacetilação conservado e um região N-terminal. PPARγ contém um domínio de ligação ao ligante e ao DNA unidos por uma região flexível.

2. Estado da arte.

A família das sirtuínas são desacetilases encontradas em diferentes organismos e são conhecidas por atuarem em processos envolvidos na longevidade celular. Estudos recentes mostraram que a sirtuína 1 (SIRT1) humana esta diretamente envolvida no processo de *Browning* do tecido adiposo branco, sendo este, com potencial terapêutico para pacientes obesos e resistentes à insulina. Esse efeito é causado pela desacetilação das lisinas 268 e 293 do PPARγ. Ligantes agonistas de SIRT1 e PPARγ como resveratrol e rosiglitazona, são descritas na literatura por aumentarem a interação entre SIRT1 e PPARγ, porém o mecanismo e as interfaces dessa interação entre essas proteínas se encontram em questionamento. Uma vez essas interfaces descritas, novos ligantes que visam modular a interação entre elas e que não trazem os efeitos adversos já observados, poderão ser engenheirados e futuramente utilizados como tratamento alternativo em pacientes obesos e resistentes à insulina.

3. Objetivos

Objetivo geral: Elucidas estruturalmente as bases moleculares das modificações pós traducionais do PPARγ por SIRT1 no contexto da obesidade e resistência à insulina.

Objetivos específicos:
1. Clonagem dos mutantes miméticos da acetilação/desacetilação do PPARγ
2. Obtenção dos mutantes.
3. Caracterização biofísica da acetilação e desacetilação do PPARγ.
4. Participação no cálculo da afinidade por polarização de fluorescência e obtenção do complexo PPARγ:SIRT1 com parceiro Caique Malospírito (Figura 2).

4. Metodologia

Clonagem: A produção das proteínas mutantes serão geradas através da troca dos resíduos alvos por aqueles que mimetizam as características químicas da acetilação e desacetilação PPARγ humano. Serão gerados através da técnica de mutação sítio dirigida nos vetores de expressão de PPARγ presentes no laboratório.
Obtenção: Expressão e purificação dos mutantes miméticos utilizando cepas de expressão BL21 e por cromatografia líquida de exclusão molecular respectivamente, utilizando protocolos já padronizados no laboratório. Efetuando as devidas adaptações caso haja necessidade.
Caracterização Biofísica: Cálculo do raio hidrodinâmico por espalhamento de luz dinâmico, ultracentrifugação analítica e pelo multidetector OMNISEC e determinação da estrutura secundária dos mutantes por dicroísmo circular.
Determinação da afinidade: Cálculo da constante de dissociação (K_D) através de polarização por fluorescência. A proteína SIRT1 será marcada pelo fluoróforo FITC e adicionada a concentrações crescentes de PPARγ selvagem e mutantes acetil-miméticos. As leituras serão realizadas no leitor de microplaca CLARIOstar.

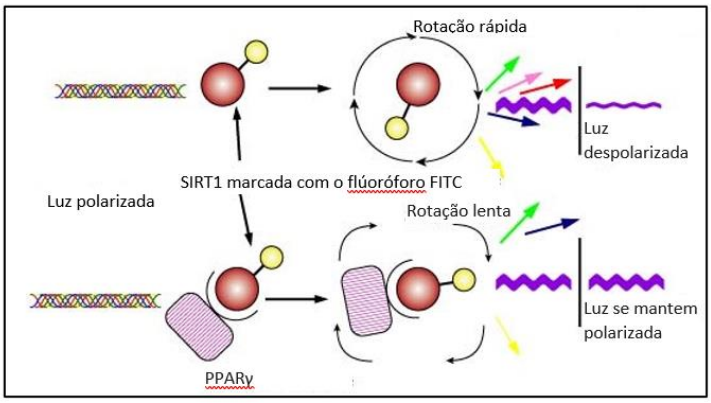

Figura 2. Ensaio de polarização por fluorescência utilizado na determinação do K_D do complexo SIRT1: PPARγ.

5. Referências

1. Elabbassi, W. N., & Haddad, H. A. (2018). The epidemic of the metabolic syndrome. Saudi Medical Journal, 26(3), 373–375.
2. Tavares, V., Hirata, M. H., & Hirata, R. D. C. (2007). Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PPARγ): Estudo molecular na homeostase da glicose, metabolismo de lipídeos e abordagem terapêutica. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia, 51(4), 526–533. https://doi.org/10.1590/s0004-27302007000400005
3. Soccio, R. E., Chen, E. R., & Lazar, M. A. (2014). Thiazolidinediones and the promise of insulin sensitization in type 2 diabetes. Cell Metabolism, 20(4), 573–591. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.08.005
4. Cariou, B., Charbonnel, B., & Staels, B. (2012). Thiazolidinediones and PPARγ agonists: Time for a reassessment. Trends in Endocrinology and Metabolism, 23(5), 205–215. https://doi.org/10.1016/j.tem.2012.03.001
5. Qiang, L., Wang, L., Kon, N., Zhao, W., Lee, S., Zhang, Y., … Accili, D. (2012). Brown remodeling of white adipose tissue by SirT1-dependent deacetylation of Pparγ. Cell, 150(3), 620–632. https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.027