



Nr2f6: Uma chave promissora para a indução do processo de termogênese no músculo esquelético

Palavras-Chave: Doenças metabólicas; Músculo esquelético; Receptor nuclear NR2F6; Termogênese

Autores(as):

Klaus Samartine Prado-Universidade Estadual de Campinas- Unicamp

Heloina Mariano – Universidade Estadual de Campinas- Unicamp

Prof. Dr. Leonardo dos Reis Silveira- Universidade Estadual de Campinas-Unicamp

INTRODUÇÃO:

Fatores de Transcrição (TFs) são proteínas que se ligam a sequências específicas de DNA para direcionar quais genes devem ser ligados ou desligados em um tecido durante o processo de transcrição. No genoma humano, são codificados entre 2.000 e 3.000 fatores de transcrição, criando uma ampla rede de interações com diferentes sequências de ligação de DNA, que envolvem mais de 25.000 genes (1). É relatado que diferentes combinações de TFs estão ativas em diferentes tecidos; no entanto, devido à enorme quantidade de TFs e aos potenciais alvos, tem sido difícil identificar precisamente quais combinações são ou não funcionais. O grupo de Bing Ren da Universidade da Califórnia, em San Diego, EUA, foi capaz de determinar mais de 300.000 elementos cis-regulatórios no genoma de camundongos, incluindo um grande número de novos promotores, intensificadores e isolantes gênicos (2). Esses elementos regulatórios encontrados em muitos promotores e enhancers proporcionam às células a oportunidade de regular prontamente a expressão de genes específicos para afetar uma resposta celular específica. Interessantemente, os fatores de transcrição desempenham um papel fundamental na estrutura genômica, fornecendo novos insights sobre como alterações no controle da expressão gênica podem levar a doenças metabólicas. Assim, a atividade de transcrição tem vários participantes importantes que devem estar no lugar certo e no momento certo, incluindo a maquinaria de transcrição, fatores de transcrição, promotores e enhancers (2).

De particular interesse, a família de receptores nucleares compreende um grande grupo de fatores de transcrição ativados por ligantes que atuam como sensores transcripcionais, respondendo a

fatores ambientais (3). Como tal, os receptores nucleares servem como uma interface interessante entre o ambiente celular e o genoma (3, 4, 5). Assim, disfunções nesta sinalização mediada por receptores nucleares têm sido diretamente associadas a doenças metabólicas, incluindo câncer, obesidade e diabetes (3, 6). Curiosamente, uma lista de medicamentos já foi descrita como agonistas ou antagonistas de receptores nucleares, incluindo tamoxifeno, para receptores de estrogênio (câncer de mama) (7), tiazolidinedionas, para receptor ativado por proliferador de peroxissoma- γ (PPAR γ) (diabetes tipo 2) (8), dexametasona, para receptor de glicocorticoide ativador (doenças inflamatórias) (9). Vale ressaltar que a família de receptores nucleares é extensa, e é surpreendente que muitos deles ainda sejam classificados como receptores "órfãos", ou seja, nenhum ligante foi descoberto até agora, abrindo uma ampla janela para o tratamento de doenças metabólicas (3,6).

O músculo esquelético tem um papel central na regulação da homeostase metabólica sistêmica e, como tal, utiliza programas de transcrição bem regulados para adaptar as células a estímulos ambientais. Com base nesta alegação, nosso grupo de pesquisa analisou inicialmente os RNAseqs para mapear sistematicamente os efeitos do aumento do fenótipo mitocondrial na expressão de TFs gerados por meio de grandes conjuntos de dados em músculo esquelético e tecido adiposo marrom de camundongos, bem como em células C2C12 com fenótipo mitocondrial aumentado. Nossas descobertas indicaram alguma ligação entre o fator de transcrição (TF) Nr2f6 e o metabolismo mitocondrial tanto no músculo esquelético quanto no tecido adiposo marrom (10). Com base no exposto, no presente projeto propomos reduzir a expressão de Nr2f6 em células C2C12 para avaliação dos processos metabólicos, como diferenciação celular, contração muscular e transporte de Ca²⁺.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

- Avaliar o papel do Nr2f6 na transcrição de genes termogênicos.

METODOLOGIA:

Células C2C12: As células na densidade de $3,5 \times 10^5$ foram plaqueadas em placas de 10 cm ou seis poços, respectivamente, e cultivadas em meio de Eagle modificado por Dulbecco e suplementadas com penicilina/estreptomicina e soro fetal bovino (10%) incubadas a 37°C e 5% de CO₂.

Construções lentivirais em células C2C12: A fim de estudar os efeitos de Nr2f6 no processo de termogênese, a linhagem lentiviral estável de células musculares esqueléticas knockdown para Nr2f6 foi gerada através de shRNA (pLKO.1-Puromicina) incluindo o respectivo controle com shRNA para GFP (shGFP). Após a transdução, as células foram selecionadas com puromicina e obtido o clone para realização dos experimentos celulares. A linhagem de células contendo a sequência shNr2f6 foi descongelada e plaqueada em uma densidade de 1.000 células/poço em placas 96 wells. Após a

diferenciação, as amostras foram coletadas e o nível transcricional, bem como o conteúdo proteico de genes termogênicos incluindo Sln, serca 1 e serca 2 foram avaliados.

PCR real-time: A expressão relativa dos genes de interesse foi calculada utilizando o método do ciclo limiar comparativo ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), normalizando os valores de Ct (threshold cycle) dos genes de interesse com o gene de referência RPL32 (Ribosomal Protein L32). Foram analisados os genes Nr2f6 e ATPase 1 e 2.

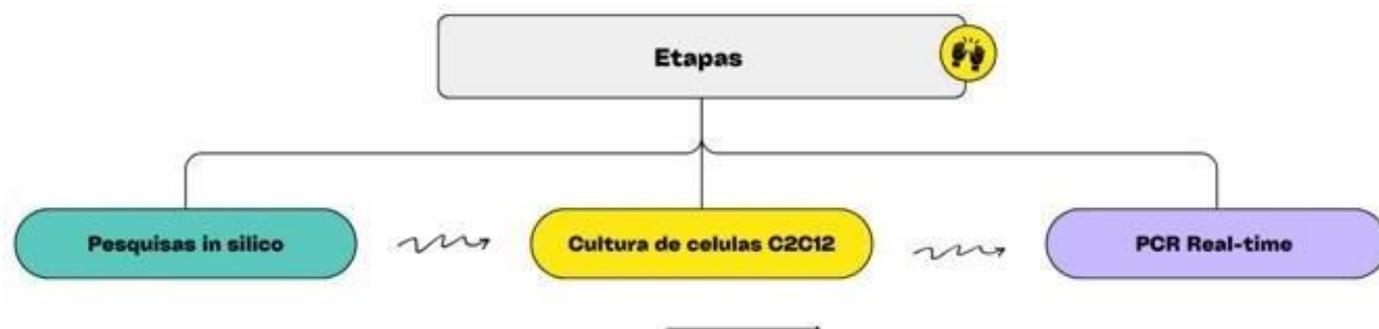


Figura 1: Mapa representativo da organização metodológica.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Foram avaliados por RT- qPCR genes associados ao processo termogênico no músculo esquelético incluindo isoformas de Serca (Ca^{2+} -ATPase) (Figura 1). Observa-se que os genes foram regulados significativamente, demonstrando claramente um efeito metabólico de Nr2f6 em células musculares esqueléticas. De particular interesse, o músculo esquelético aumenta a produção de calor pelo desacoplamento da hidrólise de ATP da Serca do transporte de Ca^{2+} (10, 11), sugerindo um papel de Nr2f6 no processo termogênico muscular. Consistente com a atividade termogênica no músculo esquelético, a supressão de Nr2f6 induziu significativamente a fosforilação de AMPK, um efeito que se refletiu em uma resposta aumentada à insulina. Além disso, genes associados ao processo termogênico no músculo esquelético, incluindo isoformas de Serca (Ca^{2+} -ATPase), também foram regulados positivamente em células C2C12 com silenciamento de Nr2f6. Encontramos também elementos responsivos a Nr2f6 em sequências regulatórias de DNA de genes de transporte de Ca^{2+} , incluindo Sarcoplina (Sln), ATP2a1 (Serca 1A), ATP2a2 (Serca 2A) e Receptor 1 de Rianodina (Ryr1), sugerindo fortemente que uma menor expressão de Nr2f6 pode estar relacionada à atividade termogênica muscular. Em conjunto, essas descobertas sugerem que Nr2f6 pode ser um novo regulador do processo de termogênese em células musculares esqueléticas.

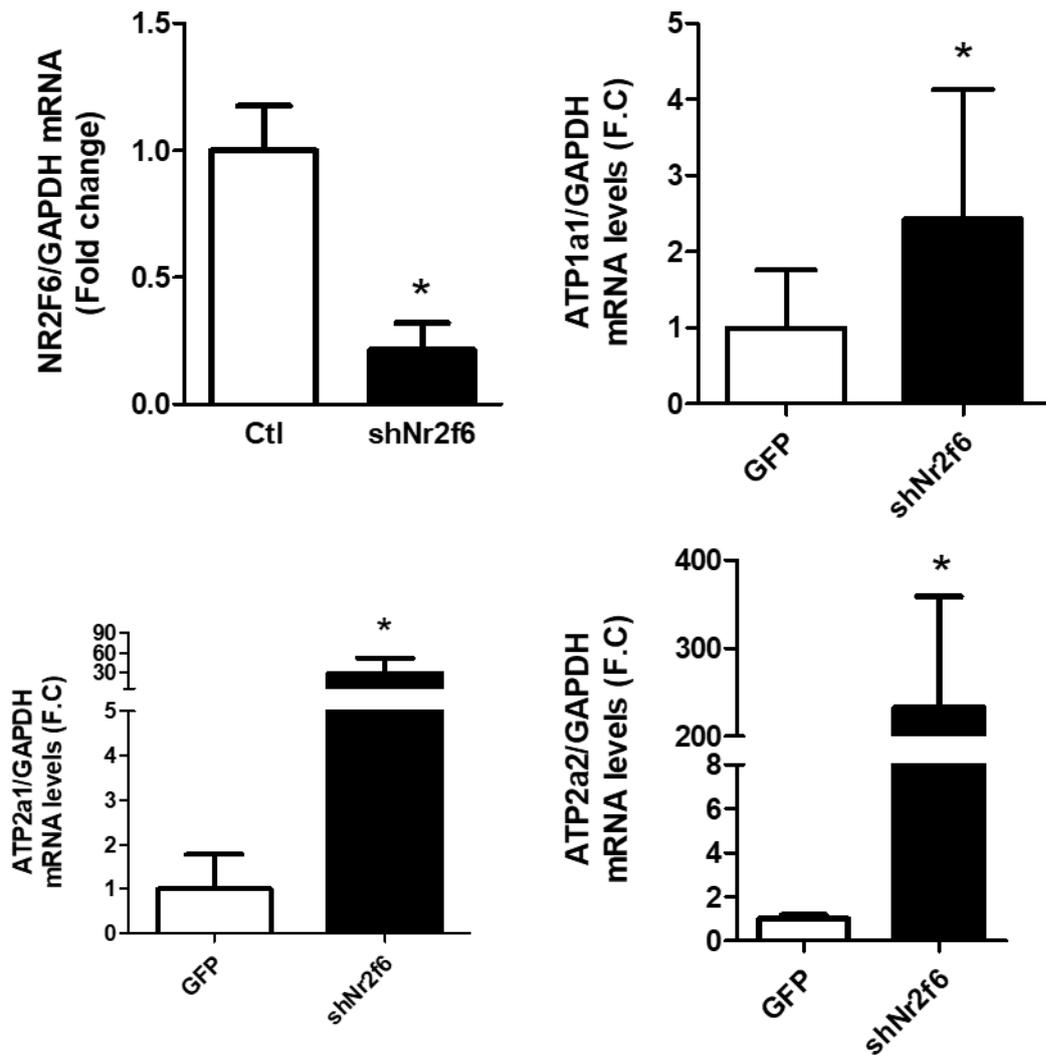


Figura 2: O knockdown de Nr2f6 induz a expressão de genes envolvidos na termogênese muscular. Marcadores termogênicos musculares regulados diferencialmente por knockdown de Nr2f6. Expressão gênica de marcadores termogênicos avaliados por RT-qPCR em células C2C12 (n=4-5.)

CONCLUSÕES:

Diante do exposto, nossas descobertas sugerem que o Nr2f6 pode ser um importante regulador molecular do programa termogênico nas células musculares esqueléticas. Portanto, o conhecimento do mecanismo molecular pelo qual a termogênese é regulada no músculo esquelético, tecido que constitui 45% da massa corporal, certamente abrirá uma ampla perspectiva que vai desde a investigação e diagnóstico até o tratamento de distúrbios metabólicos.

BIBLIOGRAFIA

1. Nelson, David L. (David Lee), 1942. (2005). *Lehninger principles of biochemistry*. New York :W.H. Freeman, 5th edition.
2. Shen et al. A map of the cis-regulatory sequences in the mouse genome. *Nature* 2012.
3. Wärnmark A et. al. Activation functions 1 and 2 of nuclear receptors: molecular strategies for transcriptional activation. *Mol. Endocrinol.*17(10):1901–9, 2003.
4. Huang P. et. al. Structural Overview of the Nuclear Receptor Superfamily: Insights into Physiology and Therapeutics *Annu Rev Physiol.* 72: 247–272, 2010.
5. Yu, C. et al. The Nuclear Receptor Corepressors NCoR and SMRT Decrease Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ Transcriptional Activity and Repress 3T3-L1 Adipogenesis. *J. Biol. Chem.* 280, 13600–13605, 2005.
6. Emily R. et. al. Structural analysis of the glucocorticoid receptor ligand-binding domain in complex with triamcinolone acetonide and a fragment of the atypical coregulator, small heterodimer partner. *Molecular Pharmacology*, 92 (1) 12-21, 2017.
7. Reis M, Farage M, de Meis L. *Mol Membr Biol.* Thermogenesis and energy expenditure: control of heat production by the Ca²⁺-ATPase of fast and slow muscle, 2002.
8. de Meis L. Uncoupled ATPase activity and heat production by the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. Regulation by_ ADP. *J Biol Chem*, 2001.
9. Maurya SK et al. Sarcolipin Signaling Promotes Mitochondrial Biogenesis and Oxidative Metabolism in Skeletal Muscle. *Cell Rep.* 24(11):2919-2931, 2018.
10. Concerted regulation of skeletal muscle metabolism and contractile properties by the orphan nuclear receptor Nr2f6 Dimitrius Santiago P. S. F. Guimarães