UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

FERNANDA APARECIDA HELENO BATISTA

Estudos estruturais do Receptor Ativado por Ativadores de Peroxissomos humano, hPPARδ

São Carlos

2012

FERNANDA APARECIDA HELENO BATISTA

Estudos estruturais do Receptor Ativado por Ativadores de Peroxissomos humano, hPPARδ

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada
Opção: Física Biomolecular
Orientador: Prof. Dr. Igor Polikarpov

Versão Corrigida

(versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos

2012

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca e Informação do IFSC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Aparecida Heleno Batista, Fernanda
Estudos estruturais do Receptor Ativado por Ativadores de Peroxissomos humano, hPPARdelta / Fernanda Aparecida Heleno Batista; orientador Igor Polikarpov - versão corrigida -- São Carlos, 2012.
102 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2012.

1. Receptor Nuclear. 2. PPAR. 3. Ligantes. I. Polikarpov, Igor, orient. II. Título.

Dedico esta tese à minha família que sempre me apoiou e aceitou as limitações que este trabalho impôs à nossa convivência. Sem vocês eu não seria nada.

Ao meu amado avô...saudades sem fim...

AGRADECIMENTOS

Agradeço à todos que de alguma maneira contribuíram para que este trabalho fosse realizado. Com muito carinho agradeço

à minha família, que tanto amo

ao Flávio, que é a pessoa mais importante da minha vida (você sempre ganha uma frase né?!)

ao Lucas, por tudo que significou para mim...você sempre será parte da minha vida

aos meus queridíssimos amigos que estiveram ao meu lado mesmo nos dias mais difíceis (amo vocês!)

à minha mãe adotiva de coração, Bel

aos colegas de laboratório

aos técnicos do IFSC

ao meu orientador.

"Para se obter o que nunca se teve, é necessário fazer algo que nunca se fez."

Chico Xavier

RESUMO

BATISTA, F. A. H. **Estudos estruturais do receptor ativado por ativadores de peroxissomos humano, hPPARδ**. 2011. 97p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

Os PPARs são fatores de transcrição ativados por ligantes, pertencentes à superfamília dos receptores nucleares, que são considerados sensores de lipídeos capazes de transformar alterações nos padrões de lipídeos/ácidos graxos dos organismos em atividade metabólica. Com isto, os 3 isotipos (α, δ e γ) estão associados a diferentes desordens metabólicas como doenças vasculares, diabetes, obesidade, câncer e certas doenças mentais que constituem um grave problema de saúde pública mundial, o que torna esta classe de proteínas, um valioso alvo para a indústria farmacêutica. Embora a importância do hPPARδ na regulação da transcrição de genes relacionados a uma série de processos metabólicos seja conhecida, não há ainda nenhum fármaco no mercado cujo alvo seja este receptor. O maior conhecimento a respeito da estrutura deste receptor pode trazer esclarecimentos capazes de auxiliar o desenvolvimento racional de fármacos. Desta forma, no presente trabalho, buscou-se encontrar características estruturais importantes para a seletividade e especificidade dos ligantes pelo isotipo δ. Para tal, determinou-se as condições de expressão e purificação da proteína hPPARδ LBD, bem como as condições apropriadas de manutenção da mesma por meio da técnica de dicroísmo circular. O estado oligomérico deste receptor foi determinado em solução através das técnicas de cromatografia por exclusão de tamanho e por espalhamento dinâmico de luz, onde se concluiu que a proteína é monomérica nas condições testadas. Além disto, através de uma estrutura de alta resolução da proteína hPPARδ LBD com o ligante GW 0742, propôs-se a construção de dois mutantes, V312M e I328M, através dos quais concluiu-se que estes dois resíduos são potencialmente importantes para interação de ligantes estruturalmente relacionados com GW 0742, ao isotipo δ, indicando dois determinantes relacionados à seletividade de ligantes por este isotipo. Como existem poucos relatos sobre a estrutura completa deste receptor, e consequentemente da influência que os domínios N-terminal e DBD apresentam sobre o domínio LBD, um breve estudo da interação diferencial entre o receptor nuclear hPPARδ *Full* e três diferentes cofatores, em presença de

ligante agonista e antagonista foi realizado. Para isto, determinou-se as condições de expressão e purificação da proteína hPPARδ *Full*, e prosseguiu-se com ensaios de anisotropia de fluorescência, através dos quais ficou claro que cada cofator apresenta um padrão diferente de interação com a proteína que pode ser dependente de outras regiões da proteína além daquelas já classicamente descritas. Isto é um forte indicativo de que diferentes regiões do hPPARδ podem ser chave no processo de regulação por intermédio de cofatores.

Palavras-Chave: Receptor Nuclear. PPAR. Ligantes.

ABSTRACT

BATISTA, F.A.H. **Structural studies of human peroxisome proliferator activated receptor, hPPARδ**. 2011. 97p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

PPARs are transcription factors activated by ligands, belonging to the superfamily of nuclear receptors, which are considered to be lipid sensors capable of making changes in patterns of lipid/fatty acid metabolic activity of organisms. The three isotypes (α, δ and γ) are associated with different metabolic disorders and vascular diseases as diabetes, obesity, cancer and certain mental illnesses which comprise a serious worldwide public health problem, making this class of proteins a valuable target for the pharmaceutical industry. Although it is known the importance of hPPARδ in regulating transcription of genes related to a series of metabolic processes, there is still no drug on the market directed to this receptor. Knowledge about the structure of this receptor can bring clarification able to assist the rational development of drugs. Therefore, in the present study, we sought to find structural features important for selectivity and specificity of ligand binding by the isotype δ. To this end, we determined the conditions of expression and purification of the protein hPPARδ LBD, as well as the appropriate conditions for maintaining it through the technique of circular dichroism. The oligomeric state of this receptor in solution was determined through the techniques of size exclusion chromatography and dynamic light scattering, which concluded that the protein is monomeric under the conditions tested. In addition, through a high-resolution structure of the protein hPPARδ LBD with the ligand GW 0742, we proposed the construction of two mutants, V312M and I328M, through which it was concluded that these two residues are potentially important for interaction of ligands structurally related to GW 0742 with the δ isotype. As there are few reports based on the complete structure of this receptor, and consequently about the influence of the N-terminal and DBD domains with the LBD domain, a brief study of the interaction between the nuclear receptor differential hPPARδ Full and three different cofactors in the presence of agonist and antagonist ligands were performed. For this, we determined the conditions of expression and purification of the protein hPPARδ Full,

and using fluorescence anisotropy, it became clear that each cofactor has a different pattern of interaction with the protein which may be dependent on other regions of the protein in addition to those already described classically. This is a strong indication that different regions of hPPARδ can be key points in the regulatory process through cofactors.

Keywords: Nuclear Receptor. PPAR. Ligand

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Composição estrutural dos receptores nucleares.. 21

Figura 2 - Estrutura cristalográfica do receptor PPARδ (PDBID: 2GWX), mostrando as "três camadas" de empacotamento das 12 hélices que compõem os LBDs da maioria dos receptores nucleares.. 23

Figura 3 - Ilustração da regulação exercida pelos complexos coativadores e correpressores sobre os receptores nucleares.. 24

Figura 4 - A) Heterodímero formado entre os receptores PPAR (azul) e RXR (roxo claro) mostrando o posicionamento de ambos sobre a Repetição Direta DR-1 28

Figura 5 - Superfície da molécula hPPAδ LBD com destaque para as regiões dos três braços do sítio de ligação..... 37

Figura 6- Alinhamento das sequências dos LBDs dos PPARs α (alfa), δ (beta) e γ (gama)..... 37

Figura 7- Mapa da região de clonagem do vetor de Expressão pET 15-b (Novagen). 41

Figura 8- Esquema representativo do sistema de transativação. 49

Figura 9 - Teste de Expressão do hPPARδ LBD. 54

Figura 10 - Purificação e Clivagem da Cauda de Histidina da Proteína hPPARδ LBD. 55

Figura 11 - Cromatografia de Exclusão Molecular da Proteína hPPARδ LBD. 57

Figura12 - Seqüência de aminoácidos da construção LBD da proteína hPPARδ..... 58

Figura 13 - Desnaturação térmica da proteína hPPARδ LBD, monitorada por dicroísmo circular a 222 nm.. 61

Figura 14 - Ligante GW 0742 com grupamentos químicos assinalados. 62

Figura 15 - Estrutura cristalográfica do complexo hPPARδ LBD:GW 0742.. 63

Figura 16 - Disposição esquemática dos resíduos do hPPARδ LBD que interagem com o ligante GW 0742..... 65

Figura 17 - *Stereo view* do sítio de ligação, mostrando a densidade eletrônica calculada para o ligante (mapa de omissão, contornado a σ=1.0) e os resíduos do hPPARδ responsáveis pela estabilização do ligante. 66

Figura 18 - A) Disposição espacial do resíduo de δVal312 (magenta) e os resíduos correspondentes nos outros dois isotipos de PPAR α (amarelo Ile339) e γ (verde

Met376). B) Disposição especial do resíduo de δIle328 (magenta) e os resíduos correspondentes dos outros dois isotipos de PPAR α (amarelo Met3559) e γ (verde Met392)..... 68

Figura 19 - Ensaios de ativação dos PPARs..... 70

Figura 20 - Resíduos envolvidos no c*harg clamp*, nas estruturas nativas do PPAR após as simulações de dinâmica molecular..... 73

Figura 21 - Resíduos envolvidos no c*harg clamp*, nas estruturas do PPARδ nativo e nos mutantes após as simulações de dinâmica molecular..... 74

Figura 22 - Teste de Expressão do hPPARδ *Full*..... 76

Figura 23 - Teste de Expressão do hPPARδ *Full*..... 76

Figura 24 - Teste de Expressão do hPPARδ *Full*..... 77

Figura 25 - Purificação da Proteína hPPARδ *Full*..... 78

Figura 26 - Cromatografia de exclusão molecular da proteína hPPARδ *Full*..... 79

Figura 27 - Curvas de titulação das proteínas hPPARδ LBD e hPPARδ *Full*, em cofatores, em presença e na ausência de ligantes, obtidas pela técnica de anisotropia de fluorescência..... 80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição dos tampões utilizados no ensaio de estabilidade da proteína hPPARδ LBD analisada por dicroísmo circular. 44

Tabela 2 - Parâmetros estatísticos da coleta e processamento dos dados de difração de Raios-X..... 46

Tabela 3 - Condições utilizadas para testar a expressão da proteína hPPARδ LBD. 53

Tabela 4 - Raio hidrodinâmico da proteína hPPARδ LBD, em função da concentração, obtido pela técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz. 59

Tabela 5 - Temperatura média de desnaturação da proteína hPPARδ LBD, obtidas por dicroísmo circular, em presença de diferentes tampões. 60

Tabela 6 - Interações assinaladas pelo programa LigPlot entre o receptor PPARδ LBD e o ligante GW 0742. 64

Tabela 7 - Valores de EC_{50}, para a ligação de GW 0742 à hPPARs nativos e mutantes, determinados através de ensaios de transativação. 70

Tabela 8 - Valores de RMSD dos resíduos δVal312 e δIle328 e os resíduos correspondentes nos PPARs α, γ e mutantes. 72

Tabela 9 - Condições utilizadas para testar a expressão da proteína hPPARδ *Full*. 75

Tabela 10 - Constantes de Dissociação (K_d) obtidas experimentalmente para as proteínas hPPARδ LBD e hPPARδ *Full* e cofatores, em presença e na ausência de ligantes. 81

LISTA DE ABREVIATURAS

DBD-Domínio de ligação ao DNA

DR-1- *Direct repeats*

FAAR- Receptor ativado por ácido graxo

hPPAR- Receptor ativado por ativadores de peroxissomos humano

LBD- Domínio de ligação ao ligante

MEC- Matriz extracelular

PPREs- Elementos responsivos de ativador de peroxissomos

PDB-Protein Data Bank

SDM-Simulação de dinâmica molecular

PMSF- Fenilmetilsulfonilfluor

TGF-β1- Fator de transformação de crescimento

SUMÁRIO

1.Introdução 21
1.1. Receptores Nucleares 21
1.2. Os receptores ativadores de proliferação de peroxissomos 25
1.2.1. Introdução 26
1.2.2. PPAR e Ligantes 28
1.2.2. PPARδ 30
1.2.3.1. Síndrome Metabólica. 30
1.2.3.2. Sistema Nervoso Central e Doenças Relacionadas. 31
1.2.3.3. Injúrias ao Tecido Epitelial. 32
1.2.3.4. Tumores 33

2.Objetivos Gerais 35
2.1. Objetivos e Justificativa de Cada Abordagem 36
2.1.1. Estudos realizados com o domínio de ligação ao ligante (LBD) 36
2.1.2) Estudos relacionados ao receptor completo (Full) 38

3. Materiais e Métodos 41
3.1. Estudos relacionados ao LBD 41
3.1.1. Testes de Expressão 41
3.1.2) Expressão em larga escala e purificação da proteína hPPARδ LBD 41
3.1.3. Cromatografia por Exclusão de Tamanho 42
3.1.4) Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) 43
3.1.5. Determinação da Estabilidade da Proteína Analisada por Desnaturação Térmica, Monitorada por Dicroísmo Circular 43
3.1.6. Cristalização, Coleta de Dados e Refinamento do Modelo 45
3.1.7. Mutações e Plasmídeos 47
3.1.8. Ensaio de Transativação 48
3.1.9. Docking e simulações de dinâmica molecular 49
3.2. Estudos relacionados ao receptor completo (Full) 50
3.2.1. Testes de expressão 50
3.2.2) Expressão em larga escala e purificação da proteína hPPARδ Full 50
3.2.3. Titulação monitorada pela Técnica de Anisotropia de Fluorescência 51

4.Resultados e Discussão 53
4.1. Estudos relacionados ao LBD 53
4.2. Estudos relacionados ao receptor completo 74

5.Conclusões 83

6.Perspectivas 85

Referências 87

1 Introdução

1.1 Receptores Nucleares

A superfamília dos receptores nucleares é dividida em três famílias ou classes: classe 1, família dos receptores esteroidianos (receptores de progesterona, estrógeno, glicocorticóide, andrógeno e mineralocorticóide), classe 2, família dos receptores tireoideanos/retinóides (receptor de vitamina D, retinóide, tireoideano e ativador da proliferação de peroxissomos) e classe 3, família dos receptores órfãos, cujos ligantes ainda não foram definidos [1].

Os receptores nucleares apresentam basicamente a mesma composição estrutural, formada por uma região N-terminal (A/B) pouco conservada entre os receptores, um domínio de ligação ao DNA (C ou DBD), uma região de ligação entre os domínios (D), e uma região que contém o motivo de ligação ao ligante (E/F ou LBD), de acordo com a figura 1 [2].

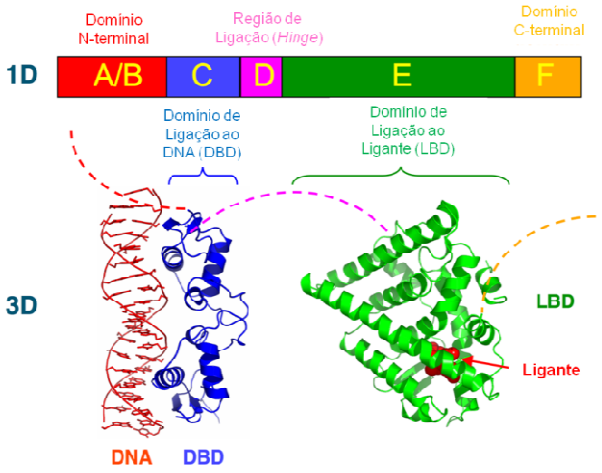

Figura 1 - Composição estrutural dos receptores nucleares. Parte superior da figura, disposição linear dos domínios que compõem os receptores nucleares. Parte inferior, disposição tridimencional dos domínios, apresentando a interação entre o receptor e seu elemento responsivo contido na fita de DNA. Modificado a partir de [3].

A região A/B é a mais variável em tamanho e composição da seqüência e apresenta, na maioria dos casos, um domínio AF-1 que é responsável pela ativação constitutiva do receptor, independente de ligante. Esta região apresenta atividade célula e promotor específica, sugerindo que ela seja responsável pela especificidade de ação entre isoformas de receptores[2].

As interações DNA-proteínas são realizadas através de seqüências altamente conservadas denominadas domínio de ligação ao DNA. Todos os receptores nucleares reconhecem seqüências derivadas do mesmo motivo de DNA, formado por seis pares de bases (5'-Pu GGTCA, Pu sendo A ou G) e denominado elemento responsivo. Apesar disto, processos como mutações, inversões e repetições deste motivo geram elementos responsivos que são específicos para cada classe de receptores[4]. O domínio de ligação ao DNA é basicamente composto por dois motivos denominados *zinc-finger*, onde em cada um existem quatro resíduos de cisteína coordenados por um átomo de Zn^{2}[-4].

Os receptores nucleares podem se ligar a seus elementos responsivos na forma de monômeros, homodímeros ou heterodímeros. Os elementos responsivos que são reconhecidos por dímeros são constituídos por dois motivos de reconhecimento arranjados de tal forma a permitir o perfeito contato DNA - proteína. As diferentes formas através das quais o receptor pode se ligar a seu elemento responsivo estão relacionadas às diferenças nos domínios de ligação ao DNA e no domínio de dimerização[5]. A dimerização é um mecanismo que aumenta a afinidade, a especificidade e a diversidade da ligação do receptor ao DNA[4].

Já foram descritas duas interfaces de dimerização distintas em receptores nucleares, uma fraca, existente no domínio de ligação ao DNA, e outra forte, no domínio de ligação ao ligante. A interface de dimerização do domínio de ligação ao DNA está relacionada com a seleção por elementos responsivos enquanto que a dimerização favorecida pelo domínio de ligação ao ligante é responsável por estabilizar os dímeros[4].

O domínio de ligação ao ligante (Figura 2A e B) está envolvido em diversas funções reguladas pela ligação do ligante, como a translocação para o núcleo, dimerização, ativação da transcrição de genes alvo e associação com proteínas reguladoras[6- 11]. A estrutura terciária deste domínio é comum a todos os receptores, com pequenas variações, sendo basicamente formado por 12 α-hélices, numeradas de 1 a 12, e 2 a 4 folhas-β, estruturadas como um “sanduíche”. Um cerne central hidrofóbico, composto por três hélices, é empacotado formando uma cavidade (o bolsão de ligação) capaz de acomodar o ligante relacionado a cada receptor. É neste domínio que está presente o sítio AF-2, responsável pela ativação da transcrição dependente de ligante.

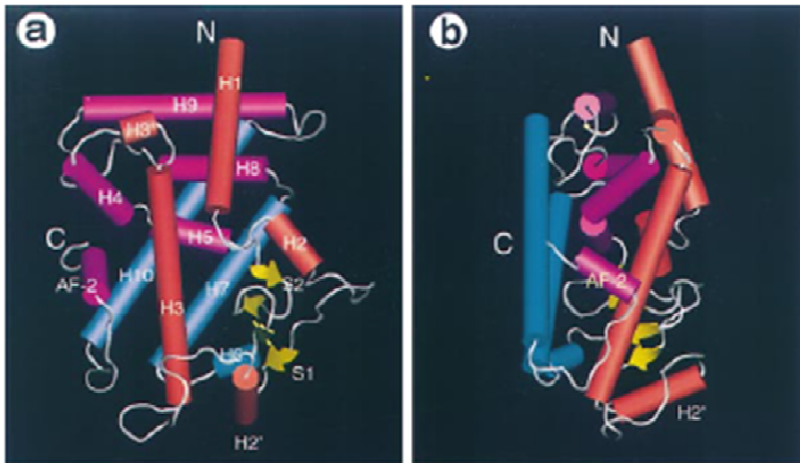

Figura 2 - Estrutura cristalográfica do receptor PPARδ (PDBID: 2GWX), mostrando as "três camadas" de empacotamento das 12 hélices que compõem os LBDs da maioria dos receptores nucleares. A) e B) Duas visões do LBD que diferem em 90° uma da outra, em relação ao eixo vertical. As camadas são representadas em vermelho, roxo e azul. As folhas betas são mostradas em amarelo e os loops em branco. A partir de [12].

A transcrição de genes em eucariotos é regulada em diferentes níveis. Existem 3 diferentes tipos de RNA polimerases e diferentes fatores de iniciação, que são responsáveis por dois níveis de controle[13]. Outro nível de controle está associado aos fatores de transcrição, capazes de se ligar ao DNA, como os receptores nucleares, que auxiliam na função da RNA polimerase II nos genes alvos[13]. Estes fatores de transcrição regulam a transcrição gênica através da formação de complexos multiprotéicos, constituído por um grupo de cofatores[14].

Os cofatores de receptores nucleares (também denominados correguladores) incluem proteínas correpressoras, coativadoras e proteínas associadas correpressoras ou coativadoras. Os cofatores que regulam positivamente a transcrição gênica, e cuja associação é ligante dependente, são denominados coativadores enquanto aqueles, capazes de se ligar a receptores apo ou complexados com ligantes antagonistas, responsáveis pela inibição da transcrição, são denominados correpressores[15].

Desta forma, a ligação de um agonista a um receptor nuclear resulta na dissociação do complexo correpressor e recrutamento de coativadores que são responsáveis pela modificação da estrutura de histonas e da cromatina, gerando uma estrutura de DNA aberta para a transcrição, enquanto outros são responsáveis pela ligação à maquinaria transcricional (Figura 3)[14;16]. Em ausência de agonistas ou na presença de antagonistas, o complexo correpressor associado, recruta histona desacetilases (ou outras enzimas capazes de fortalecer a estrutura da cromatina), reprimimindo a transcrição gênica[15-16].

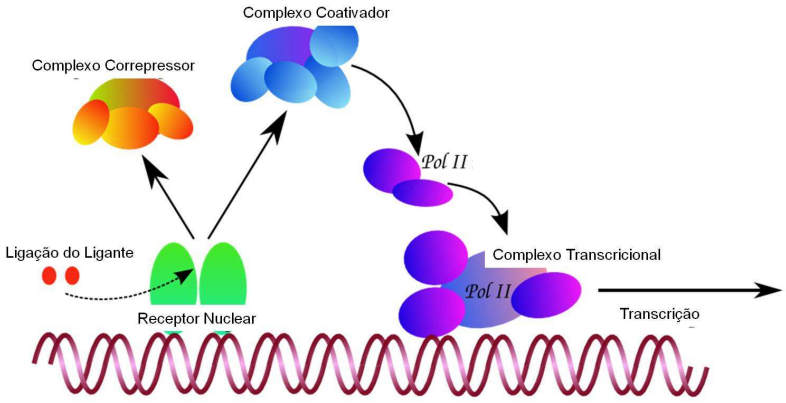

Figura 3 - Ilustração da regulação exercida pelos complexos coativadores e correpressores sobre os receptores nucleares. Uma vez que os ligantes se ligam ao receptor nuclear, o complexo correpressor se desliga, dando lugar ao complexo coativador, iniciando uma cascata de eventos que culminam na transcrição dos genes alvos do receptor nuclear. Modificado a partir de[17].

De maneira geral, os cofatores exercem suas funções através do remodelamento da cromatina ou atuando como moléculas adaptadoras entre os receptores nucleares e os componentes da maquinaria basal de transcrição[16], de maneira ligante dependente.

Coativadores que interagem diretamente com receptores nucleares contém uma ou mais regiões conservadas LXXLL (L=Leucina, X=qualquer aminoácido), cuja estrutura secundária é de uma hélice anfipática, responsável pela direta interação com a região AF-2 dos receptores nucelares[2;18].

Embora diferentes receptores sejam capazes de se ligar aos domínios LXXLL das proteínas coativadoras, existe uma utilização diferencial destes domínios pelos diferentes receptores nucleares, sendo que esta ligação preferencial é ditada pelos resíduos presentes nas regiões carboxi e N-terminal destes domínios[2].

A interação entre os receptores nucleares e seus coativadores se dá através da formação de uma interação denominada "*charge-clamp*" onde um resíduo conservado de ácido glutâmico da hélice 12 e uma lisina presente na hélice 3 do receptor, fazem interações de hidrogênio com as leucinas 1 e 5 do domínio de ligação do coativador[2]. Estes contatos orientam e posicionam o domínio de ligação do coativador e permitem o empacotamento dos resíduos de leucina no bolsão formado pelas hélices 3, 4 e 5 ou 3, 5 e 6 dos receptores[2].

Correpressores apresentam motivos de ligação também conservados, formados pela seqüência LXXI/HIXXXI/L (L=leucina, X - qualquer aminoácido, I=isoleucina, H=histidina),

representando uma hélice mais estendida quando comparada com a hélice existente nos coativadores[16]. De acordo com o modelo da ratoeira[19] após a interação de um agonista com o receptor nuclear, a hélice 12 atua como uma tampa que sela o bolsão de ligação ao ligante do LBD. Apenas com a conformação "fechada" da hélice 12 os coativadores são capazes de interagir com os receptores nucleares, sendo que quando a hélice 12 está em conformação "aberta" (por intermédio de ligação com antagonista ou por ausência de ligante no bolsão de ligação), o receptor nuclear apenas se associa a proteínas correpressoras[20]. A exclusão da ligação de um tipo de cofator em detrimento do outro é explicada pelo fato de ambos os tipos de proteínas compartilharem regiões de ligação sobrepostas nos receptores nucleares. A hélice mais longa dos correpressores se ajusta em um bolsão formado pelas hélices 4, 5 e 6 do LBD do receptor nuclear, obstruindo a região onde os coativadores interagem e, desta forma, impedindo a ativação da transcrição[21].

Assim como observado para os coativadores, diferenças nos resíduos "X" (do domínio de ligação) e em aminoácidos adjacentes ao domínio de ligação nos correpressores, bem como nas seqüência de aminoácidos das hélices 4, 5 e 6 do receptor, contribuem para a diferença nas afinidades entre os diversos receptores e proteínas correpressoras[21].

Em contraste com a interação bem descrita entre cofatores e a região AF-2 dos receptores nucleares, a interação dos mesmos com a região AF-1 (presente na região A/B dos receptores nucleares), independente de ligante, é pouco conhecida. Publicações recentes vêm apresentando resultados que ajudam a ilustrar a forma pela qual cofatores, que interagem com a região AF-2, apresentam atividade AF-1 dependente.

Gelman e colaboradores[22] demonstraram que o PPARγ interage com o coativador p300 através dos motivos AF-1 e AF-2 de forma ligante independente e dependente. Também apontando para a importância da presença da região N-terminal do receptor para interação com o cofator, estão os dados de Berbaum e Harrison[23] que mostram que o domínio LBD do PPARα apresenta menor afinidade por coativadores em relação à construção completa do mesmo receptor, ainda que não tenha sido possível a comprovação da interação dos cofatores com o motivo AF-1. Para o receptor de estrógeno (ER), a interação do coativador SRC-1 com ambos os motivos AF-1 e AF-2 também já foi demonstrada[24].

1.2 Os receptores ativadores de proliferação de peroxissomos

1.2.1 Introdução

Os PPARs são fatores de transcrição ativados por ligantes, pertencentes à superfamília dos receptores nucleares[25-26]. Os PPARs estão envolvidos na regulação da diferenciação celular, desenvolvimento, metabolismo de açúcares e lipídeos e tumorigênese[27-29].

O PPARα (NR1C1) foi o primeiro representante da família a ser identificado em uma biblioteca de fígado de rato[30]. Nos anos seguintes, o receptor foi isolado de diferentes organismos[31], com conseqüente mapeamento do gene humano no cromossomo 22[32]. Este receptor mostrou-se responsivo a substâncias proliferadoras de peroxissomos e por esta razão, passou a ser denominado receptor ativador da proliferação de peroxissomos (PPAR)[30]. Na realidade, esta nomenclatura não é adequada para os PPARs de humanos, uma vez que nenhum dos isotipos é responsável pela proliferação de peroxissomos em humanos sendo mais correta a utilização do nome "receptores ativados por ativadores da proliferação de peroxissomos"

O isotipo γ foi primeiramente isolado de fígado de *Xenopus*[33] e, assim como os dois outros isotipos, já foi isolado em diferentes organismos, sendo que em humanos, é encontrado no cromossomo 3[34]. Duas isoformas do PPARγ (NR1C3), com diferenças apenas no N-terminal, já foram identificadas, sendo ambas derivadas do mesmo gene através de *splicing* alternativo e uso de promotores alternativos[35].

O isotipo PPARδ foi primeiramente denominado PPARβ quando isolado de uma biblioteca de oócitos de *Xenopus*[33] sendo que a proteína correspondente de camundongo foi denominada PPARδ, por não apresentar ampla conservação da seqüência primária em relação àquela identificada em *Xenopus*[33]. O PPARδ também foi denominado FAAR (receptor ativado por ácido graxo)[36] em ratos, e NUC1 em humanos[37], cuja localização do gene foi identificada como sendo no cromossomo 6[38]. Apesar da divergência na nomenclatura desta proteína, após a análise das seqüências primárias dos receptores concluiu-se que a subfamília dos PPARs é constituída apenas por três representantes e o receptor PPARβ passou a ser então denominado PPARβ/δ (NR1C2)[26]. Apenas por questão de praticidade, no presente trabalho, este receptor será denominado PPARδ.

Os PPARs apresentam expressão tecido-específica e dependente do isotipo. O PPARα é expresso em altos níveis nos órgãos que apresentam significante metabolismo de ácidos graxos como o tecido adiposo marrom, fígado, rins, coração e músculos[26;39]. O PPARδ é expresso na maioria dos tecidos, sendo os níveis de expressão em certos tecidos dependente da proliferação e da diferenciação celular. Este receptor está associado com processos que se dão na pele, nos intestinos, na placenta, no tecido adiposo, no cérebro e no músculo esquelético[26]. As duas isoformas do receptor PPARγ são encontradas no tecido adiposo marrom e branco, promovendo a diferenciação dos adipócitos e o estoque de lipídeos. Além disto, o PPARγ1 é expresso em outros tecidos como intestino, células vasculares, células do sistema imune, além de células inflamatórias[26;29].

Os PPARs podem regular a transcrição através de mecanismos distintos que podem envolver, ou não, a ativação a partir da interação com ligantes. A transcrição pode ser ativada de forma dependente de ligante, através da ligação ao DNA, sendo esta denominada transativação ligante dependente. Este mecanismo está relacionado ao recrutamento de complexos de coativadores que modificam a estrutura da cromatina e facilitam a associação da maquinaria transcricional ao promotor dos genes alvos[40].

Além de promover a transcrição, os PPARs também podem reprimi-la de forma ligante-dependente, inibindo a atividade de outros fatores de transcrição como àqueles pertencentes à família NF-κβ. A transrepressão ligante dependente, ao contrário da transativação, não envolve a ligação aos elementos responsivos de proliferador de peroxissomos (PPREs)[40]. A repressão de genes alvos pode ainda ser realizada na ausência de ligantes, sendo denominada repressão ligante independente, e acontece através do recrutamento de complexos correpressores que antagonizam as atividades dos complexos coativadores[40].

A regulação transcricional realizada pelo PPAR se dá através da heterodimerização dos isotipos com o receptor de retinóide X (RXR) sendo que os PPARs são incapazes de se ligar como monômeros aos seus elementos responsivos[41]. O heterodímero ativa a transcrição através de sua ligação às seqüências de DNA denominadas elementos responsivos de proliferador de peroxissomos (PPREs). Os PPREs são formados por repetições diretas de dois "meio-sítios", cuja seqüência consenso é AGGTCA, com espaçamento de um nucleotídeo entre as duas metades e denominada *Direct Repeat*-1 (figura 4A)[42]. Entretanto, a análise detalhada do PPRE de diversos genes, aliada ao estudo dos efeitos de mutações nas mesmas, levaram a definição de determinantes adicionais aos PPREs: uma extensão no meio sítio 5', um cerne DR-1 imperfeito e um resíduo de adenina como nucleotídeo espaçador entre os dois

meio sítios gerando a seguinte seqüência consenso: 5'-AACT AGGNCA A AGGTCA-3'. Estas particularidades contribuem para a ligação seletiva do PPAR-RXR em detrimento da ligação de outros receptores que também reconhecem elementos responsivos DR-1[41]. O PPAR e o RXR ligam-se aos meio-sítios 5' e 3' do elemento responsivo, respectivamente[43], sendo que a região 5' flanqueadora do PPRE contribui para a seletividade de ligação de cada isotipo pertencente à subfamília (Figura 4B)[29].

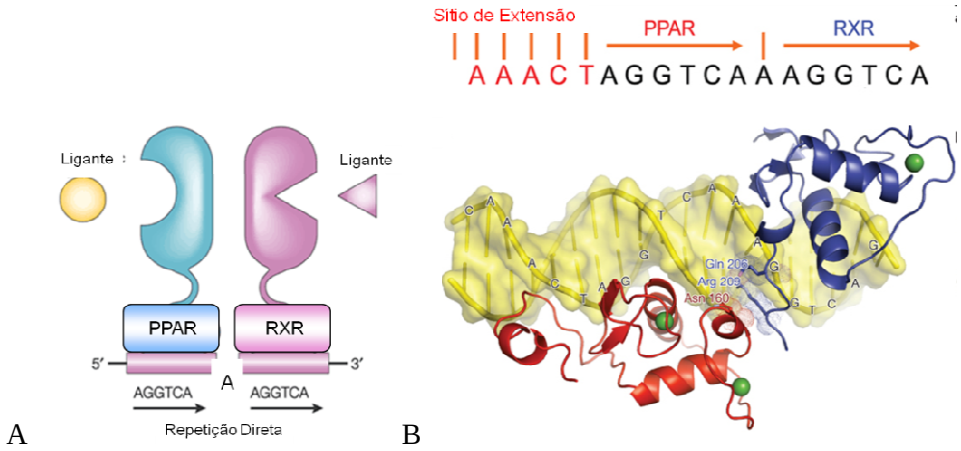

Figura 4 - A) Heterodímero formado entre os receptores PPAR (azul) e RXR (roxo claro) mostrando o posicionamento de ambos sobre a Repetição Direta DR-1 (AGGTCA A AGGTCA). Modificado a partir de[44]. B) Na parte superior da figura encontra-se a seqüência do elemento responsivo, contendo a DR-1, junto com a seqüência flanqueadora 5`, importante para a especificidade de ligação do heterodímero PPAR-RXR. Abaixo, posicionamento dos DBDs do PPARγ (vermelho) e do RXRα (azul) quando ligados ao elemento responsivo. Modificado a partir de[45].

Os representantes desta classe de receptores estão relacionados ao controle de diversos genes e, conseqüentemente, estão envolvidos em diversos processos metabólicos: fisiologia da pele, síndrome metabólica, resistência à insulina, aterosclerose, diferenciação de adipócitos, implantação do zigoto, processos tumorais, entre outros.[35;46-49]

1.2.2 PPAR e Ligantes

Os PPARs são considerados sensores de lipídeos capazes de transformar alterações nos padrões de lipídeos/ácidos graxos dos organismos em atividade metabólica, levando ao catabolismo de ácidos graxos ou ao estoque de lipídeos[26]. A diversidade de funções

desempenhadas pelos receptores desta subfamília está intrinsecamente relacionada à sua capacidade de acomodar diferentes tipos de ligantes em seu sítio de ligação. Desta forma, os três isotipos são capazes de se ligar a uma ampla gama de ligantes endógenos, relacionados com o metabolismo lipídico como ácidos graxos, prostaglandinas, leucotrienos, fosfolipídeos e produtos de seu metabolismo[50].

Devido seu potencial terapêutico no tratamento de desordens metabólicas, diferentes classes de ligantes sintéticos para PPAR têm sido desenvolvidas, bem como, a busca por ligantes de origem natural capazes de interagir com esta subfamília de receptores nucleares. A primeira classe de fármacos reconhecidos como ligantes de PPAR foram os fibratos. Seu desenvolvimento veio da observação, nos anos 50, de que alguns compostos derivados de certos ácidos eram capazes de promover a hipocolesteremia em ratos e humanos[50], sendo que o primeiro fibrato a ter sua utilização clínica liberada para uso nos EUA foi o clofibrato[51], ainda que sua ligação com a classe dos PPARs não fosse conhecida. Durante os anos 70 e 80, diversos fibratos capazes de diminuir os níveis séricos de lipídeos foram identificados, tais como genfibrozil e fenofibrato, até que nos anos 90, a segurança associada aos fibratos foi concluída, bem como, o mecanismo de ação dos mesmos, consolidando a utilização dos fibratos como medicamento pra o tratamento de dislipidemia, através da ativação do PPARα[50;52].

Outra classe presente no mercado que apresenta como alvo um PPAR são as glitazonas, ligantes do isotipo γ. Elas foram descobertas numa tentativa de melhorar a ação hipolipemiante dos fibratos, sendo que o primeiro composto liberado para utilização clínica foi a Troglitazona, que anos mais tarde foi retirada do mercado por causar toxicidade hepática[50]. Diferentemente dos fibratos capazes de normalizar níveis de lipídeos, as glitazonas apresentam ação hipoglicemiante, aumentando a sensibilidade à insulina nos órgãos alvos e reduzindo os níveis de ácido graxo e glicose em pacientes com diabetes tipo 2.[49]

Além das glitazonas, as sulfoniluréias constituem outra classe de fármacos hipoglicemiantes, com ação em PPARγ, que se encontra disponível para uso clínico.[53]

Existem na literatura diversos relatos de compostos naturais capazes de ativar um ou mais isotipos de PPAR. Mueller e colaboradores[54] demonstraram a ativação de PPARα por compostos extraídos de diferentes tipos de pimentas, noz-moscada, alcaçuz, colorau, coentro, açafrão e estévia. A ativação de PPARγ por flavonóides já foi descrita para compostos extraídos de várias origens tais como frutas leguminosas e folhas.[55-57] Além destes, o ácido ajulêmico, um composto da classe dos canabinóides, também é capaz de se ligar e ativar o isotipo γ[58-59].

Diferentes compostos sintéticos já se mostraram capazes de ativar o isotipo δ[60-61], porém, até o presente momento, não há medicamentos aprovados para uso clínico cujo alvo seja o PPARδ. Apesar disto, agonistas deste isotipo estão em desenvolvimento para o tratamento de dislipidemia, obesidade e/ou resistência à insulina como MBX-8025, CER-002, e KD3010[50].

1.2.2 PPARδ

1.2.2.1 Síndrome Metabólica.

A prevalência da obesidade atingiu níveis que a caracteriza como epidemia na sociedade moderna. A obesidade está associada a diversas condições clínicas, denominadas coletivamente como síndrome metabólica, que envolvem resistência à insulina, diabetes tipo 2, dislipidemia, hipertensão e doenças coronarianas e arteriais. Numerosas evidências sugerem que a obesidade afeta a comunicação entre o tecido adiposo e outros órgãos devida à alteração na produção de adipocitocina e que a deposição de gordura no fígado e nos músculos leve ao desenvolvimento de resistência a insulina e diabetes tipo 2[62]. Embora diversos fatores estejam associados ao desenvolvimento da síndrome, o estilo de vida, dietas hipercalóricas e sedentarismo são fatores de risco envolvidos em seu desenvolvimento[49].

Alternativas farmacológicas e não farmacológicas têm sido desenvolvidas no intuito de tratar a síndrome metabólica e/ou às condições associadas como a obesidade e a resistência a insulina. Os tratamentos direcionados contra obesidade apresentam apenas moderado sucesso. Os tratamentos direcionados contra diabetes tipo 2, embora tenham apresentado sucesso terapêutico têm a desvantagem de trazer uma gama de efeitos adversos que podem levar ao abandono do tratamento[49].

É descrito na literatura os benefícios dos agonistas do receptor PPARδ em condições de dislipidemia, aterosclerose, obesidade, aporte de colesterol assim como no decréscimo nos níveis de triglicérides e glicose em modelos animais portadores de diabetes tipo 2[47].

Estudos utilizando animais geneticamente modificados e culturas celulares demonstraram que o PPARδ controla o catabolismo de ácidos graxos na musculatura esquelética através da regulação da expressão de genes envolvidos com a queima dos mesmos assim como com a alteração da composição das miofibras musculares para um fenótipo mais oxidativo. Foi observado ainda que o aumento no catabolismo de ácidos graxos também se dá no tecido adiposo marrom. Estas observações explicam em partes os efeitos deste receptor em condições de obesidade[62].

1.2.2.2 Sistema Nervoso Central e Doenças Relacionadas.

Além do papel desempenhado pelos receptores nucleares no metabolismo de lipídeos, sabe-se que os três isotipos desta família de receptores são expressos em tecidos do sistema nervoso central (SNC) de ratos durante a embriogênese, sendo que o PPARδ é o mais abundante e aquele que permanece sendo expresso após o nascimento, enquanto os níveis de PPARα e PPARγ decrescem. Embora este padrão de expressão isotipo específico e controlado durante o desenvolvimento sugira que esta família desempenhe funções durante a formação do SNC, pouco se conhece a respeito do papel desempenhado por estes receptores neste cenário[46].

Observações *in vivo* e *in vitro* apontam que o PPARδ é o isotipo prevalente no cérebro sendo encontrado em todos os tipos celulares. É sugerido que ele esteja relacionado ao metabolismo de lipídeos no cérebro, uma vez que animais que não expressam este isotipo apresentaram padrão de mielinização alterado[46;63]. A ativação do PPARδ em oligodendrócitos imaturos promove diferenciação celular, turnover e maturação da mielina[46].

Iwashita e colaboradores[64] demonstraram que agonistas do receptor PPARδ apresentam atividade antiapoptótica in vitro, apontando para um possível potencial neuroprotetor desta classe de drogas e colocando este receptor como um atrativo alvo terapêutico em desordens neurodegenerativas e isquemias.

1.2.2.3 Injúrias ao Tecido Epitelial.

Após injúrias à pele, a cicatrização é responsável pela cobertura do sítio exposto por uma nova epiderme. O processo de cicatrização é altamente dinâmico, sendo responsável por restituir a integridade da pele através do balanço na deposição de colágeno e no remodelamento e reparo do tecido na região injuriada[65]. Este processo compreende diversas fases: inflamação, re-epitelização e remodelamento da cicatriz. A resposta inflamatória inicial é seguida de proliferação e migração de queratinócitos, com paralelo reparo da derme compreendendo a proliferação e diferenciação de fibroblastos, bem como, angiogênese[66].

Entre as citocinas excretadas no local da lesão, o fator de transformação de crescimento TGF β1 é responsável por diferentes funções na regulação da deposição e remodelamento da matriz extracelular (MEC), bem como na adesão e proliferação celular e na modulação da resposta inflamatória[67]. Nos estágios iniciais da cicatrização, a síntese de colágeno é acelerada, seguida por um gradual decréscimo na taxa de síntese que se normaliza no final do processo de cicatrização[65].

PPARα e δ são fundamentais no processo de recuperação da pele após uma lesão, cada qual exercendo funções distintas[26]. O isotipo α está relacionado com a fase inicial de inflamação. Animais PPARα *null* tiveram recrutamento de monócitos, macrófagos e neutrófilos deficiente para a área afetada, apresentando cicatrização retardada na fase inflamatória[68]. Enquanto a expressão do PPARα é transientemente super regulada e paralela à fase inflamatória, os níveis de PPARδ em queratinócitos se mantêm durante todo o processo de cicatrização. De acordo com estas observações, a cicatrização foi retardada em dois a três dias em animais PPARδ *null*[68]. O PPARδ é um importante regulador da sobrevivência de queratinócitos na epiderme lesionada, além de estar envolvido na adesão e migração celular[69]. Em concordância com estas observações, está o efeito do agonista δ específico, GW1514, em promover a diferenciação epitelial em camundongos (*in vivo*) sem afetar a proliferação celular[70]. Foi verificado ainda que o tratamento tópico em ratos com tal agonista acelerou a restauração da barreira epitelial após injúria causada por diferentes agentes agressores[70].

Além do efeito exercido diretamente na viabilidade celular, foi demonstrado que o PPARδ induz a expressão de TGF β1[71]. Como o TGF β1 está relacionado com a regulação da MEC, o PPARδ, por intermédio desta citocina, é capaz de influenciar a expressão de genes relacionados à regulação da MEC[65]. Corroborando esta observação, estão os relatos de que a ativação do PPARδ pelo, agonista GW501516, induziu a expressão de colágeno Tipos I e II, além de fibronectina, melhorando a cicatrização em tecido lesionado de camundongos[65].

Desta forma, o PPARδ participa na sobrevivência, migração e diferenciação de queratinócitos, bem como na expressão de fatores da MEC[65-66], sendo considerado alvo promissor tanto de interesse dermatológico, quanto cosmético.

1.2.3.4 Tumores

O PPARδ está relacionado com importantes funções celulares como adesão, proliferação, diferenciação e sobrevivência. Tais processos estão intimamente ligados com o desenvolvimento de tumores e a análise dos dados obtidos por diversos grupos, estabelece uma correlação entre o receptor e algumas formas de cânceres. Dependendo do tecido onde ocorre, a ativação do PPARδ pode ter conseqüências que favorecem o surgimento e desenvolvimento da patologia (aumento na propriedade de migração celular e resistência a apoptose), como conseqüências protetoras (diminuição da proliferação celular)[72]. São necessários maiores conhecimentos de como este receptor é capaz de controlar tais processos a fim de torná-lo um possível alvo terapêutico no controle destas doenças.

2 *Objetivos Gerais*

Doenças vasculares, diabetes, obesidade, câncer e doenças mentais são desordens não transmissíveis que coletivamente constituem um grave problema de saúde pública mundial. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde, estas desordens serão responsáveis por 73 % dos óbitos no ano de 2020, sendo que em países desenvolvidos, doenças não transmissíveis já levem a 79 % dos óbitos registrados[73].

O hPPARδ (PPARδ humano) está relacionado com várias destas doenças não transmissíveis. São doenças que atingem a população como um todo, não distinguindo entre pobres, ricos, homens, mulheres, jovens ou idosos. Desta forma, encontrar fármacos (agonistas ou antagonistas) capazes de interagir com este receptor e levar à prevenção, melhora e/ou cura das patologias associadas, seria de grande valia para os sistemas de saúde e de previdência do mundo todo, que reduziriam gastos relacionados com o tratamento e com as conseqüências geradas por estas doenças.

O maior conhecimento a respeito da estrutura deste receptor, bem como dos mecanismos envolvidos em sua interação com seus elementos responsivos e com o receptor RXR, ajudariam a elucidar mais claramente as funções desempenhadas pelo hPPARδ além de auxiliar no desenvolvimento racional de fármacos.

Agonistas do hPPARγ, como os fármacos da classe das glitazonas, são utilizadas no tratamento de diabetes tipo 2 dadas suas propriedades de diminuição dos níveis de glicose no sangue e de aumentar a sensibilidade à insulina. Da mesma forma, os agonistas do hPPARα (fármacos da classe dos fibratos), são utilizados graças a sua habilidade de reduzir os níveis plasmáticos de triglicerídeos. Por outro lado, apesar de já ser conhecido que o hPPARδ é capaz de regular a transcrição de diversos genes relacionados a uma série de processos metabólicos, não há nenhum fármaco no mercado cujo alvo seja este receptor[74-75].

Com isso, o objetivo do presente trabalho é ampliar os conhecimentos existentes sobre o hPPARδ, que é o isotipo sobre o qual menos informação está disponível, principalmente no que tange à sua caracterização estrutural. Para tanto se realizou estudos diversos, incluindo caracterização funcional em cultura celular, caracterização bioquímica e caracterização estrutural através de técnicas que possibilitaram avaliar o comportamento do hPPARδ, em solução, quando associado aos elementos responsivos e ao ligante.

2.1 Objetivos e Justificativa de Cada Abordagem

2.1.1 Estudos realizados com o domínio de ligação ao ligante (LBD)

Por estarem relacionados a uma ampla gama de efeitos fisiológicos, os receptores nucleares são importantes alvos terapêuticos e atualmente é intensa a pesquisa em busca de agonistas que combinem em uma única molécula os efeitos terapêuticos associados a dois ou mais isotipos destes receptores[76-78]. Apesar disto, algumas desordens podem ser tratadas mais adequadamente com agonistas seletivamente associados à apenas um isotipo. O grande desafio para esta abordagem é a grande similaridade estrutural e seqüencial que existe entre alguns membros desta vasta família de proteínas.

A estrutura tridimensional do LBD dos PPARs é a mesma encontrada em outros receptores nucleares[79], sendo que o sítio de ligação é um bolsão em forma de Y, formado por 3 braços[12; 39; 80- 81] (Figura 5). O braço I é a região mais polar do bolsão e, por esta razão, é responsável pela acomodação da cabeça hidrofílica dos ligantes do PPAR. O braço II é a parte mais hidrofóbica do bolsão seguida pelo braço III que é formado por resíduos hidrofílicos e hidrofóbicos. A parte hidrofóbica dos ligantes dos PPARs pode interagir com o braço II ou com o III.

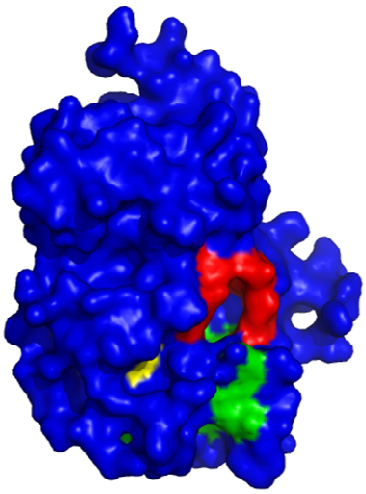

Figura 5 - Superfície da molécula hPPAδ LBD com destaque para as regiões dos três braços do sítio de ligação mostrados em amarelo (braço 1), verde (braço 2) e vermelho (braço 3).

Os resíduos que formam o LBD são cerca de 80% conservados entre os três isotipos (Figura 6), sendo que o braço III é a região mais conservada dentro do domínio[39]. O braço I apresenta outra importante região conservada que possui 4 resíduos polares (Thr253, H287, H413 e Y437, no hPPARδ, por exemplo) que são responsáveis por interações de hidrogênio entre a proteína e o grupo carboxilato dos ligantes. Estas interações levam ao reposicionamento da hélice 12, modificando a conformação do receptor e posicionando o AF-2 na conformação ativa, permitindo o recrutamento de coativadores[39].

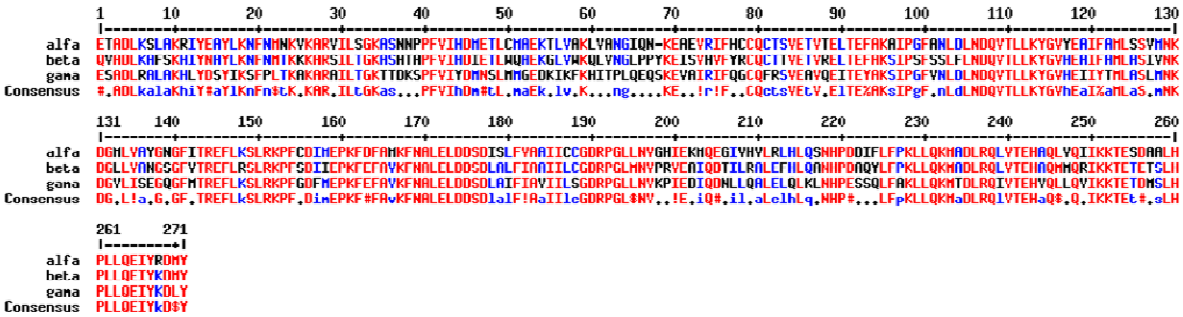

Figura 6- Alinhamento das sequências dos LBDs dos PPARs α (alfa), δ (beta) e γ (gama).

Devido o tamanho, o dinamismo e alto grau de conservação dos resíduos dos bolsões de ligação dos PPARs[80], estes receptores são capazes de acomodar uma vasta gama de ligantes. Desta forma, a base para a seletividade e especificidade dos ligantes de PPAR por

estes receptores constitui um importante objeto de estudo. Com a finalidade de elucidar mecanismos de afinidade, seletividade e especificidade, mais informações sobre as bases moleculares da interação entre receptores e múltiplos ligantes tornam-se crescentes.

Para isto, os objetivos dos estudos com a construção LBD do hPPARδ foram:

- expressão e purificação da construção hPPARδ LBD
- ensaios para determinação da estabilidade da proteína em diferentes tampões
- caracterização do estado oligomérico da proteína
- cocristalização do hPPARδ LBD com o ligante específico GW 0742
- estudos comparativos entre a proteína nativa e mutantes com a finalidade de compreender algumas das bases relacionadas com a seletividade e especificidade de tal ligante por este isotipo.

2.1.2 Estudos relacionados ao receptor completo (Full)

Embora estudos com um ou dois domínios dos receptores nucleares tenham ajudado a elucidar muitos dos mecanismos nos quais estas proteínas estão envolvidas, é desejável a obtenção de dados relativos a estudos realizados com as proteínas completas. Esta abordagem torna-se necessária para verificar a influência que outros domínios, como a região N-terminal, podem ter sobre o comportamento dos receptores nucleares.

Seguindo esta abordagem, até o presente momento, não há na literatura relatos da influência da região N-terminal ou de outras regiões do LBD do hPPARδ, que não a interface já conhecida, no recrutamento de proteínas cofatores. Uma vez que a importância desta região já foi demonstrada para outros receptores nucleares, incluindo os dois outros isotipos de PPAR[22; 24], há fortes razões para se acreditar que o mesmo aconteça com o isotipo δ. Desta forma, nesta parte do trabalho buscou-se:

- estabelecer protocolos para a expressão e purificação do receptor hPPARδ *Full*
- elucidar como a região N-terminal, e conseqüentemente o motivo AF-1, pode influenciar a afinidade do receptor por peptídeos cofatores, alterando assim a atividade do hPPARδ.

3 *Materiais e Métodos*

3.1 Estudos relacionados ao LBD

3.1.1 Testes de Expressão

O plasmídeo contendo a seqüência referente à construção hPPARδ LBD (resíduos 171-441) inserido no vetor pET15 (Novagen) (Figura 7), (generosamente doado pelo Dr. Willian Hunter-University of Dundee) foi inserido em cepa BL21(DE3) de *Escherichia coli.*

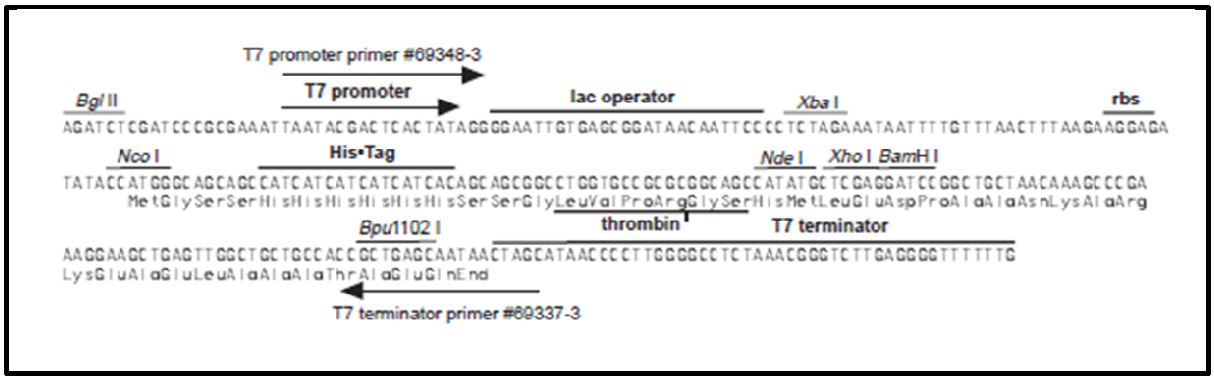

Figura 7- Mapa da região de clonagem do vetor de Expressão pET 15-b (Novagen).

Bactérias contendo o plasmídeo de interesse cresceram por 12 horas em meio Luria Broth (LB) em presença de 25 µg/mL de Ampicilina, a 37°C sob agitação (150 RPM). 5 mL desta cultura foram utilizados para inocular 1 L de meio LB estéril, em presença de 250 µg/mL de Ampicilina e incubado a 20 ou 37°C sob agitação (150 RPM) até atingir a DO_{280} = 0,6-0,8. A temperatura foi então ajustada para 18, 20 ou 23°C, com posterior indução da expressão com 1mM de Isopropil-β-D-Galactopiranosídeo (IPTG), por 16-18, 5 ou 3 horas respectivamente.

3.1.2 Expressão em larga escala e purificação da proteína hPPARδ LBD

Uma vez determinada a melhor condição de expressão, as células foram centrifugadas e ressuspendidas em 20 mL de tampão A (20 mM Hepes pH 7.5, 300 mM NaCl, 5% glicerol, 10 mM β-mercaptoetanol) acrescido de 10 mM Fenilmetilsulfonilfluor (PMSF) e lisozima a 250 µg/mL, por litro de cultura. O lisado foi sonicado, centrifugado, posteriormente submetido à cromatografia de afinidade em resina de cobalto Talon Superflow oMetal Affinity Resin (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA) e eluído em gradiente de Imidazol (0-300 mM). As frações, contendo a proteína purificada, foram concentradas e o Imidazol foi retirado pela lavagem da amostra com tampão A em concentrador Amicon (10 kDa). A cauda de histidina foi clivada com Trombina (7 U/mg proteína), a 18°C em 12 horas. A verificação da condição mais apropriada de expressão, a eficiência da clivagem da cauda de Histidina, bem como a verificação da qualidade da purificação foram analisadas através de eletroforese em gel desnaturante (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis- SDS Page*), corado por Coomassie Blue. A concentração da proteína foi determinada utilizando um kit comercial contendo o corante de Bradford[82] (Bio-Rad, Hercules, CA).

3.1.3 Cromatografia por Exclusão de Tamanho

A massa molecular aparente e, conseqüentemente, o estado oligomérico da proteína hPPARδ LBD foram determinados utilizando-se uma coluna de exclusão molecular Superdex 75 10/30 (Amersham Biosciences) acoplada a um *AKTA purifier system* (Amersham Pharmacia Biotech), equilibrada com tampão A. A proteína a uma concentração de 64 µM foi aplicada na coluna a um fluxo de 0,5 mL/min, e seu volume de eluição foi comparado àqueles dos padrões de massa molecular e raio hidrodinâmico.

Os padrões de massa e Rh utilizados foram Conalbumina (75 kDa), Ovalbumina (44 kDa), Anidrase Carbônica (29 kDa), Ribonuclease (13,7 kDa) e Aprotinina (6,5 kDa) (Sigma), todos eluídos em mesma condição que a proteína.

A curva de calibração foi construída através de um gráfico de Kav x log do PM (dos padrões), o qual é dado de acordo com a seguinte equação

$Kav = \frac{Ve - Vo}{Vt - Vo}$, sendo: Ve = volume de eluição da amostra, Vo = volume de exclusão e Vt = volume total de coluna.

Com o objetivo de determinar o Rh da proteína, a curva de calibração Kav x log Rh, baseada nos raios hidrodinâmicos, foi construída.

3.1.4 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

Aplicou-se a técnica de DLS para monitoramento do estado oligomérico da proteína hPPARδ LBD. Para tal utilizou-se o equipamento DynaPro MS (Protein Solutions), em medidas realizadas a 4°C, com tempo de aquisição de 2,5 s, totalizando 30 aquisições por medida. As analises foram realizadas em tampão A, sendo a concentração da proteína ajustada para 32, 64, 160, 208 e 448 μM. A influência do glicerol presente no tampão foi descontada em cada análise. Antes das medidas, as amostras foram centrifugadas a 10000 RPM por 10 min para retirada de possíveis agregados. Os raios foram obtidos pelas médias das aquisições e graficados em função da concentração de proteína.

3.1.5 Determinação da Estabilidade da Proteína Analisada por Desnaturação Térmica, Monitorada por Dicroísmo Circular

Para determinação das melhores condições para manutenção da proteína, o hPPARδ LBD, em tampão A, foi diluído à uma concentração final de 4,5 μM em tampões contendo diferentes compostos e incubado por 15 minutos a 4°C anteriormente à medida. Analisou-se a estabilidade da proteína em relação a diferentes pHs, concentração de NaCl e presença de aditivos. A descrição completa de cada tampão é apresentada na tabela 1.

Tabela 1 - Composição dos tampões utilizados no ensaio de estabilidade da proteína hPPARδ LBD analisada por dicroísmo circular.

Composição do Tampão
1) Acetato de Amônio 20 mM, pH 6,5, NaCl 300 mM, Glicerol 5%, 10 mM β-mercaptoetanol
2) Tris 20 mM, pH 8,0, NaCl 300 mM, Glicerol 5%, 10 mM β-mercaptoetanol
3) Borato 20 mM, pH 9,0, NaCl 300 mM, Glicerol 5%, 10 mM β-mercaptoetanol
4) Hepes 20 mM, pH 7,5, NaCl 300 mM, Glicerol 5%, 0,5% Chaps, 10 mM β-mercaptoetanol
5) 4) Hepes 20 mM, pH 7,5, NaCl 300 mM, Glicerol 5%, 10 mM β-mercaptoetanol
6) 4) Hepes 20 mM, pH 7,5, Acetato de Amônio 500 mM, Glicerol 5%, 10 mM β-mercaptoetanol
7) Fosfato de Sódio 20 mM, pH 7,5, NaCl 300 mM, Glicerol 5%, 10 mM β-mercaptoetanol
8) Hepes 20 mM, pH 7,5, KCl 200 mM, Glicerol 5%, 10 mM β-mercaptoetanol
9) Hepes 20 mM, pH 7,5, NaCl 50 mM, Glicerol 5%, 10 mM β-mercaptoetanol
10) Hepes 20 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM, Glicerol 5%, 10 mM β-mercaptoetanol
11) Hepes 10 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, 3 mM EDTA, 0,005% Tween 20, Glicerol 5%, 10 mM β-mercaptoetanol

As medidas foram realizadas em espectropolarímetro Jasco J715 (Jasco Corporation, Japão), equipado com um sistema de controle de temperatura Peltier, em cubeta retangular de quartzo de 1mm de caminho óptico, com aquecimento gradual de 2 em 2°C, em intervalo de 20 a 70°C, tempo de resposta de 16 s, largura de banda de 1 nm, sendo as alterações na estrutura secundária da proteína, induzidas pelo aquecimento, monitoradas em 222 nm. O branco (tampão testado + tampão A) foi subtraído em todas as medidas e os ensaios foram realizados em triplicata.

Curvas de desnaturação foram obtidas a partir dos dados experimentais. Para tanto, os valores relativos à elipsidade, expressa em termos de variação do sinal obtido, aqui denominada fração de proteína desnaturada (fd), foram colocados no eixo das ordenadas enquanto aqueles relativos à variação da temperatura foram colocados no eixo das abscissas. O calculo da fd é dada por

$$fd = \frac{\theta i - \theta obs}{\theta i - \theta f}, \qquad fn + fd = 1,$$

sendo θobs é o sinal obtido em cada temperatura e θi e θf os sinais relativos à proteína no estado inicial e final, respectivamente.

Para determinação da temperatura média de desnaturação ™, os dados foram ajustados de acordo com a equação sigmoidal de Boltzman (de acordo com o programa GraphPadPrism v.4.00 for Windows, Graphpad Software, San Diego, CA, USA):

$$y = Max + \frac{(Min - Max)}{\left(1 + \exp\left(\frac{T - Tm}{slope}\right)\right)}.$$

Nesta equação define-se:

Y= elipsidade medida normalizada em cada temperatura analisada

Min = elipsidade normalizada mínima

Max = elipsidade normalizada máxima

Tm = temperatura média de desnaturação

T = temperatura onde a medida foi tomada

Slope = coeficiente associado á cooperatividade do processo de desnaturação

assumindo-se que todas as alterações de elipsidade foram devidas à transições entre os estados nativo e desnaturado[83]. De acordo com este modelo assume-se que, na temperatura relativa ao Tm, encontram-se, em solução, metade das moléculas de proteína no estado nativo e metade no estado desnaturado.

3.1.6 Cristalização, Coleta de Dados e Refinamento do Modelo

Para realização dos ensaios de cristalização, o tampão da proteína foi mudado para 20 mM Hepes pH 7.5, 500 mM Acetato de Amônio, 10 mM β- mercaptoetanol, de acordo com[81]. A proteína hPPARδ LBD (256 μM) foi previamente incubada por 4 horas, a 4°C, em presença do ligante GW 0742 (solubilizado em DMSO), na razão molar 1:4 proteína: ligante. Nestes ensaios a concentração final de DMSO não foi superior a 5%. Os cristais da proteína com o ligante cresceram pela técnica de gota “sentada”, a 18°C, com solução de poço contendo 14%

(m/v) polietilenoglicol (PEG) 8000, 200 mM KCl, 40 mM *bis*-Tris-propano (pH 9.5), 6% propanol, 1 mM $CaCl_2$. A gota depositada era formada por 2 µl do complexo roteico, 0.5 µl do detergente n-Octil-β-D-tioglicosídeo e 2.5 µl da solução de poço. Os cristais se formaram após 3 dias e apresentavam formas geométricas bem definidas.

Os cristais foram transferidos para uma solução crioprotetora formada pela solução de poço acrescida de 10% de glicerol, sendo imediatamente resfriado a 100 K em nitrogênio antes da coleta de dados. A coleta de dados de difração de Raios-X foi realizada na linha MX-2 do Laboratório Nacional de Luz Sincroton (LNLS, Campinas, Brasil)[84], usando radiação sincroton em comprimento de onda de 1.459 Å, com a finalidade de aumentar a eficiência da difração do cristal. As imagens de difração foram registradas em um detector MAR225, com oscilação de 1° por imagem.

A redução de dados foi realizada com o programa HKL200/Scalepack[85]. As estatísticas da coleta de dados são apresentadas na tabela 2.

Tabela 2 – Parâmetros estatísticos da coleta e processamento dos dados de difração de Raios-X.

Comprimento de Onda (Å)	*1,46*
Grupo Espacial	P_{212121}
Cela Unitária (Å)	35,466 74,766 96,287
Faixa de Resolução (Å)	24,4 (1,95)
Número de Reflexões no *Working Set*	19134 (2519)
Número de Reflexões no *Test Set*	978 (135)
R*factor*	19,5 (25,6)
R*free*	24,6 (30,2)
Completeza (%)	99,28 (99,1)
Redundância	5,8 (4,7)
I/δ Médio	17,3 (2,6)
B*factor* Médio	24,85
Ramachandran Outliers	0/303

Os valores entre parênteses representam àqueles relativos à última faixa de resolução.

A estrutura cristalográfica do hPPARδ LBD (PDB ID 3ET2[76]) foi utilizada como modelo inicial para o processo de substituição molecular, através do programa PHASER[86] . O

modelo atômico foi obtido através de ciclos alternados de refinamento com o programa COOT[87] e de minimização com o programa PHENIX[88]. As moléculas de solvente e de ligante foram incluídas no último passo de refinamento. O modelo final era constituído por um monômero na unidade assimétrica, composto pelos resíduos de Gly167 à Tyr441, uma molécula do ligante GW 0742, 185 de moléculas de água e uma molécula de glicerol. Todos os resíduos da proteína foram encontrados em regiões permitidas de acordo com o gráfico de Ramachandran.

Os contatos entre a proteína e o ligante foram analisadas com o programa Ligplot[89], seguida por inspeção visual com o programa COOT. Uma distância de corte de 3,4 Å foi utilizada para as interações de hidrogênio. A sobreposição de diferentes estruturas cristalográficas de PPAR foi realizada com o programa Superpose e analisada com o programa Pymol (DeLano Scientific).

Código de acesso no PDB (Protein Data Bank): As coordenadas atômicas e os fatores de estrutura do complexo hPPARδ LBD:GW 0742 reportado aqui estão depositados no PDB com o código 3TKM.

3.1.7 Mutações e Plasmídeos

As mutações no domínio de ligação ao ligante do hPPARδ LBD foram introduzidas por PCR, num vetor já existente (PPARδGAL4), através da sobreposição de primers contendo as mutações com o vetor existente, pela técnica de QuikChange site-directed mutagenesis, com o kit da companhia Stratagene.

O mutante V312M foi obtido usando os primers 5’-GTA GCC AAC GGC AGT GGC TTT ATG ACC CGT GAG TTC CTG CGC AGC CTC-3’ e 5’-GAG GCT GCG CAG GAA CTC ACG-3’, enquanto para o mutante I328M os primers utilizados foram 5’- GTA GCC AAC GGC AGT GGC TTT ATG ACC CGT GAG TTC. Ambas mutações foram verificadas por seqüenciamento.

O plasmídeo repórter pGRE-LUC (elemento responsivo de GAL4, vetor repórter da luciferase de vagalume) e hPPARδ LBDGal4 inserido em vetor pBIND foram gentilmente cedidos pelo Dr Paul Webb (The Methodist Hospital Research Institute, Houston, USA). O plasmídeo pRL-TK, que contém a luciferase de *Renilla,* foi comprada da empresa Promega (*Dual-Luciferase Report Assay system* Promega, Madison, WI).

3.1.8 Ensaio de Transativação

Células HepG2 foram cultivadas em meio DEMEM *(Dulbecco's Modified Eagle's Med)* suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado, 2 mM de glutamina, 50 UI/mL de penicillina/estreptomicina, em atmosfera com 5% de CO_2 a 37°C. Para os ensaios de transativação, as células foram removidas por tripsinização e plaqueadas, a $1{,}2\times10^5$ celulas/poço, em placas de 24 poços.

A transfecção celular foi realizada, usando o reagente FuGENE 6 (Roche), 100 ηg de plasmídeo contendo a construção LBD dos hPPARα, δ e γ nativos ou hPPARδ mutante e a construção DBD (domínio de ligação ao DNA) de Gal4, 50 ηg de plasmídeo repórter de luciferase e 1 ηg de plasmídeo de luciferase de *Renilla* por poço.

Diferentes concentrações dos agonistas GW 7647, GW 0742 e Rosiglitazona específicos para os isotipos α, β e γ respectivamente, foram adicionados 24 horas após a transfecção. Passadas 24 horas de incubação o lisado celular foi preparado e o ensaio de luciferase foi realizado utilizando o kit *Dual-Luciferase Report Assay System* (Promega) (Figura 8). A emissão da luz foi tomada pela integração sobre 5 segundos de reação em um contador Safire (Tecan, Tecan US, NC, USA). A atividade da luciferase de vagalume foi normalizada pelo nível da atividade da luciferase de *Renilla,* a qual foi medida no mesmo lisado. Cada concentração de agonista foi testada em triplicata. Os dados foram analisados como médias das triplicatas, com seus respectivos desvios padrão. As curvas dose-resposta e os valores de EC_{50} foram obtidas com o ajuste dos dados a uma função dose-resposta sigmoidal calculada à partir de equações do programa GraphPad Prism (version 5.0).

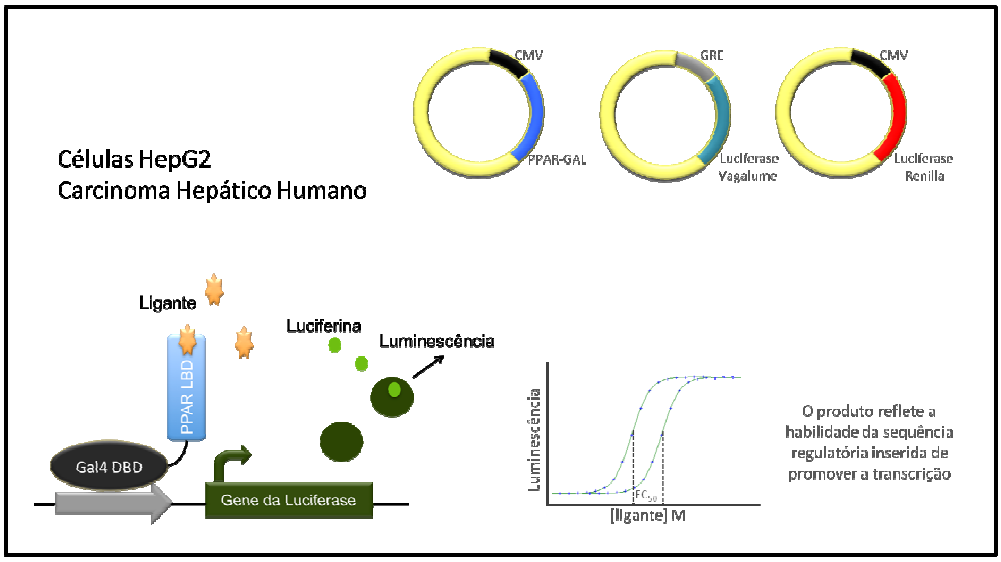

Figura 8- Esquema representativo do sistema de transativação. Neste sistema células HepG2 são transfectadas utilizando-se 3 plasmídios distintos: PPAR-GAL através do qual é expressa uma proteína quimérica com o LBD do PPAR desejado, fusionado ao DBD de Gal 4; Luciferase de Vagalume onde a proteína quimérica (após a interação com ligante específico) se liga e induz a expressão de luciferase de vagalume; Luciferase de *Renilla* onde a luciferase de *Renilla* é expressa constitutivamente e utilizada nos procedimentos de normalização. Através da luminescência medida após a interação entre a luciferase e a luciferina (adicionada ao meio), é possível obter o EC_{50} do ligante testado para cada receptor. Figura gentilmente cedida pela doutoranda Amanda Bernardes.

3.1.9. Docking e simulações de dinâmica molecular

Os complexos do PPAR α, γ e dos mutantes, bem como do ligante GW 0742, foram construídos usando a conformação do ligante obtido a partir da estrutura cristalográfica do complexo PPARδ LBD:GW 0742 (PDB ID 3TKM). Para isto, as estruturas dos LBDs dos PPARs α e γ (PDB ID 3ET1 e 3ET3 respectivamente) foram sobrepostas no complexo do PPARδ e as coordenadas do ligante foram copiadas nas estruturas dos PPARs α e γ. Os modelos dos mutantes do PPARδ LBD, V312M e I328M, foram construídos usando o programa YASARA[90]. Todas as estruturas foram submetidas à minimização de energia e simulações de dinâmica molecular usando YASARA. Os átomos de hidrogênio dos modelos foram criados usando parâmetros de campo de força, o qual foi obtido à partir do YAMBER3. Uma caixa de simulação foi definida em 15 Å ao redor de todos os átomos de cada complexo. A protonação foi realizada baseada em pH 7,0. A neutralização da célula foi atingida preenchendo a caixa com moléculas de água e Na^+/Cl^- como contra íons. Uma breve

simulação de dinâmica molecular (SDM) foi realizada para o ajuste do solvente, retirando-se água até que a densidade de 0.997 g/ml fosse atingida. Um passo de minimização de energia foi realizado até que a velocidade máxima dos átomos fosse inferior a 2200 m/s. À seguir, 500 passos de *simulated annealing* foram realizados com a temperatura de 0 K. Finalmente foi realizada uma simulação de 4 ns (nanosecond), à 298 K e um cutoff de ligação de 7.86 Å. O tempo de simulação foi ajustado para estabilizar os contatos entre a proteína e o ligante.

3.2 Estudos relacionados ao receptor completo (Full)

3.2.1 Testes de expressão

O plasmídeo contendo o inserto relativo à construção *Full* do hPPARδ (resíduos 1-441) foi inserido em cepa de E. coli Bl21 (DE3). Células positivas para a presença deste plasmídeo cresceram em 5 mL de meio LB (pré-inóculo), com 25 µg/mL de Kanamicina, por 12 horas, a 20 ou 37°C sob agitação (150 RPM). Cada pré-inóculo, foi utilizado, posteriormente, para inocular 30 mL de meio LB estéril, em presença de 250 µg/mL de Kanamicina e incubado a 20 ou 37°C sob agitação (150 RPM) até atingir a DO600=0,8-1. A temperatura foi então ajustada para 18 ou 20°C, com posterior indução da expressão com 0,1mM/0,5mM/1mM de Isopropil-β-D-Galactopiranosídeo (IPTG), por 16-18, 5 ou 3 horas.

3.2.2 Expressão em larga escala e purificação da proteína hPPARδ Full

Uma vez determinada a melhor condição de expressão, 6 litros de meio de cultura foram inoculados. Após o período de indução, as células foram centrifugadas e ressuspendidas e incubadas em 300 mL de tampão A acrescido de PMSF 10 mM e lisozima a 250 µg/mL por uma hora, em gelo, para o rompimento da parede celular. Após esse passo o extrato foi sonicado 6 vezes por 30 segundos com 50 segundos de descanso e depois,

centrifugado 14.000 rpm (Sorvall-SS34) por 40 minutos, a 4ºC e posteriormente submetido à cromatografia de afinidade em resina de cobalto Talon Superflow oMetal Affinity Resin (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA) e eluído em gradiente de Imidazol (0-300 mM).

Além da cromatografia de afinidade, associou-se um passo de cromatografia por exclusão molecular utilizando-se uma coluna Superdex 75 10/30 (Amersham Biosciences) acoplada a um AKTA *purifier system* (Amersham Pharmacia Biotech), equilibrada com tampão Tween (Hepes 10 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM, 0,005% Tween 20, Glicerol 5%, 10 mM β-mercaptoetanol), para adequada purificação da PPARδ *Full*.

A cauda de histidina foi clivada com Trombina (7 U/mg proteína), a 18°C em 12 horas. A verificação da condição mais apropriada de expressão, a eficiência da clivagem da cauda de Histidina, bem como a verificação da qualidade da purificação foram analisadas através de eletroforese em gel desnaturante (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis- SDS Page*), corado por Coomassie Blue. Posteriormente, as amostras foram concentradas e estocadas a –80ºC até o momento do uso. A concentração da proteína foi determinada utilizando o corante de Bradford[82] (Bio-Rad, Hercules, CA).

3.2.3. Titulação monitorada pela Técnica de Anisotropia de Fluorescência

Os cofatores utilizados nestes experimentos foram peptídeos contendo as regiões LXXLL dos coativadores ou LXXI/HIXXXI/L dos correpressores, marcados com a sonda fluoresceína (Invitrogen). Utilizou-se os correpressores NCOr e SMRT e o coativador TRAP-220.

Previamente às medidas, o PPARδ LBD foi dialisado contra tampão Tween/EDTA e o PPARβ *Full* contra tampão Tween e concentrados até 80 μM. Para cada medida, 10 nM do peptídeo desejado foi diluído em 200 μL de tampão (Tween/EDTA para a construção PPARδ LBD ou Tween para a construção PPARδ *Full*), com posterior adição de concentrações crescentes da proteína desejada. A cubeta foi levemente agitada e deixada incubando por 2 minutos após cada adição de proteína e antes de cada medida.

As medidas foram realizadas com as proteínas sem ligantes ou em presença de um agonista (GW 0742) ou de um antagonista (GSK 0660). Para tanto, incubou-se cada proteína com o ligante desejado numa razão 1:2 (proteína:ligante) por aproximadamente 3 hs a 4ºC.

Após este período as amostras foram centrifugadas a 10000 RPM por 5 minutos e a concentração foi verificada.

Cada curva obtida é resultado de pelo menos dois experimentos independentes. A normalização da anisotropia para cada experimento foi obtida pela equação:

$Anisotropia_{normal}=(Anisotropia_{medida}-Anisotropia_{mín})/(Anisotropia_{máx}-Anisotropia_{mín})$

onde,

$Anisotropia_{normal}$ = sinal normalizado

$Anisotropia_{medida}$ = sinal obtido em cada concentração de proteína adicionada

$Anisotropia_{mín}$ = menor sinal obtido

$Anisotropia_{Max}$ = maior sinal obtido

Depois de normalizados, os dados experimentais foram graficados utilizando uma equação para um sítio de ligação ($Sinal=Sinal_{máx}$* Concentração da Proteína/(K_d + Concentração da Proteína)) através do programa GraphPad Prism versão 4.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego Califórnia USA).

As medidas foram executadas em um fluorímetro ISS-PCI (ISS), montado em geometria L, a 10°C. O comprimento de onda de emissão utilizado foi de 495 nm, utilizando-se um filtro de *cuttoff* de 515 nm para coletar a luz emitida.

A anisotropia foi calculada pelo programa Vinci-ISS da seguinte maneira:

$$A = (I_{par} - I_{per}) / (I_{par} + 2I_{per})$$

onde I_{par} é a intensidade de luz polarizada quando os polarímetros estão em paralelo e I_{per}é a intensidade quando os polarímetros estão perpendiculares.

4 Resultados e Discussão

4.1 Estudos relacionados ao LBD

O plasmídeo contendo o inserto relativo à construção LBD do hPPARδ (resíduos 171-441) foi inserido em cepa de *E. coli* Bl21 (DE3). Células positivas para a presença deste plasmídeo cresceram em 5 mL de meio LB, com 25 μg/mL de Ampicilina, por 12 horas, a 37°C sob agitação. Cada tubo com tal conteúdo, denominado pré-inóculo, foi utilizado, posteriormente, para inocular 1L de meio LB em presença do mesmo antibiótico. Para que as melhores condições para expressão da proteína fossem encontradas, 3 diferentes conjuntos de temperaturas e períodos de indução foram testados, como mostrados na tabela 3.

Tabela 3 - Condições utilizadas para testar a expressão da proteína hPPARδ LBD.

Temperatura de Crescimento Celular (°C)	*Temperatura de Indução da Expressão Protéica (°C)*	*Período de Indução (horas)*
20	20	5
37	23	3
37	18	16-18

Em cada condição, o crescimento celular se deu sob agitação constante (150 RPM) até que a DO_{280} = 0,6-0,8 fosse atingida. Uma vez alcançada a densidade celular desejada, a indução foi realizada com 1 mM de IPTG, mantida a agitação.

De acordo com a figura 5, observa-se que a expressão aconteceu nas três condições testadas. Isto é demonstrado pela banda em torno de 30 kDa (massa aproximada da construção hPPARδ LBD) nas colunas 3, 5 e 7, referentes à alíquotas do meio após o período de indução.

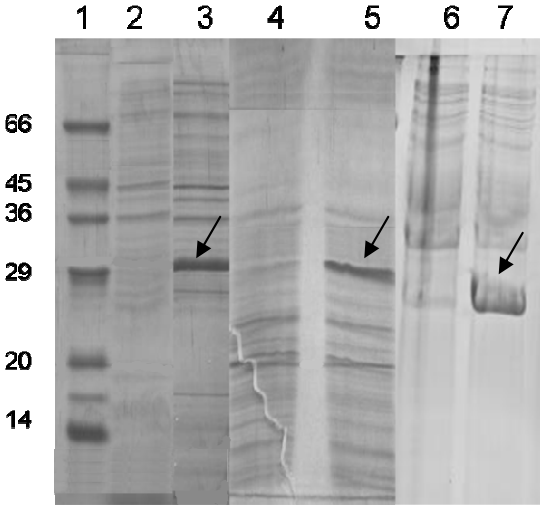

Figura 9 - Teste de Expressão do hPPARδ LBD. Coluna 1, Padrão de massa molecular de acordo com os valores apresentados à esquerda da coluna; Colunas 2, 4 e 6 representativas da cultura antes da indução, nas temperaturas de 20, 37 e 37°C respectivamente; Colunas 3, 5 e 7 representativas da cultura após a indução, nas temperaturas de 20, 23 e 18°C respectivamente. As setas indicam as bandas relativas à proteína de interesse.

Apesar de haver expressão em todas as condições, o maior rendimento após o processo de purificação foi conseguido com o crescimento celular a 37°C seguido de indução a 18°C. Uma provável explicação para isto reside no fato desta proteína (assim como outros receptores nucleares) ficar majoritariamente na fração insolúvel (Figura 9A coluna 3). Desta forma, a condição onde a solubilidade da proteína foi relativamente maior foi considerada a melhor condição de expressão.

Uma vez determinada a condição adequada para expressão, prosseguiu-se com a purificação da proteína hPPARδ LBD. Para tanto, após o período de indução, as células foram centrifugadas e ressuspendidas em tampão A (de acordo com o descrito em materiais e métodos). Como a construção apresenta cauda de histidina, o lisado foi incubado com resina de cobalto, sendo a proteína eluída com concentrações crescentes de imidazol. Os géis realizados após a purificação são apresentados nas figuras 10A e B. É possível notar que, embora a maior parte da proteína esteja na fração insolúvel (Figura 10A coluna 3), houve êxito na adequada purificação do receptor nuclear. Desta forma, o conteúdo eluído nas concentrações de 60 a 300 mM de imidazol foi colocado em concentrador e “lavado” para eliminação do imidazol. A cauda de histidina foi clivada com trombina (7 U/mg proteína), por 12 horas (Figura 10C, Coluna 3) e a proteína resultante foi concentrada, dosada pela metodologia de Bradford e armazenada em freezer -80°C até o momento do uso.

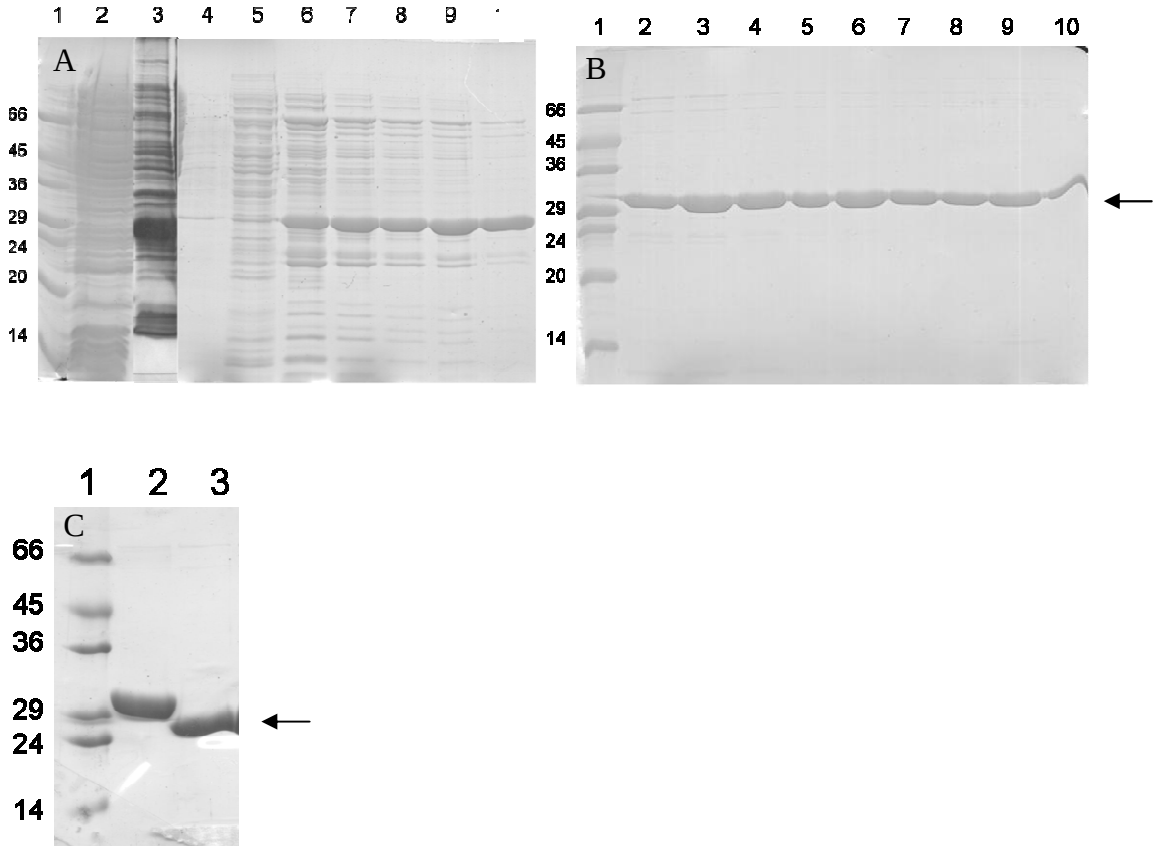

Figura 10 - Purificação e Clivagem da Cauda de Histidina da Proteína hPPARδ LBD. A) Purificação por Afinidade. Coluna 1- Padrão de massa molecular, Coluna 2- Sobrenadante, Coluna 3- *Pellet*, Coluna 4- *Flow throw*, Coluna 5- Lavado, Coluna 6- 30 mM Imidazol, fração1, Coluna 7- 30 mM Imidazol, fração 2, Coluna 8- 40 mM Imidazol, fração1, Coluna 9- 40 mM Imidazol, fração2, Coluna 10, 50 mM Imidazol, fração1. B) Purificação por Afinidade. Coluna 1- Padrão de massa molecular, Coluna 2- 50 mM Imidazol, fração 2, Coluna 3- 60 mM Imidazol, fração 1, Coluna 4-60 mM Imidazol, fração 2, Coluna 5- 100 mM Imidazol, fração 1, Coluna 6- 100 mM Imidazol, fração 2, Coluna 7- 150 mM Imidazol, fração 1, Coluna 8- 150 mM Imidazol, fração2, Coluna 9- 300 mM Imidazol, fração1, Coluna 10, 150 mM Imidazol, fração2. C) Clivagem da Cauda. Coluna 1- Padrão de massa molecular, Coluna 2- Antes da clivagem, Coluna 3- Depois da clivagem. As setas indicam as bandas relativas à proteína de interesse.

Para a verificação do estado oligomérico da proteína hPPARδ LBD, a proteína foi submetida à cromatografia por exclusão de tamanho em coluna Superdex 75 10/30, previamente calibrada com padrões de massa molecular. 160 uM da proteína purificada foram aplicados na coluna com posterior eluição em tampão A, com fluxo de 0,5 mL/min. Uma vez obtido o volume de eluição da proteína, este foi comparado àqueles dos padrões de massa molecular, através do gráfico de Kav x log PM (como descrito em materiais e métodos). Além disto, o Rh foi obtido através do gráfico de Kav x log Rh.

A figura 11 apresenta o cromatograma obtido. É possível observar a presença de um pico bem definido e a formação de outro pequeno pico. Para averiguar onde a proteína

hPPARδ LBD eluía, as frações representativas de cada pico foram submetidas à eletroforese desnaturante e o resultado pode ser visualizado no inserto da figura 11. Através desta análise, evidencia-se que a proteína de interesse eluiu nas frações correspondentes ao segundo pico encontrado no cromatograma (frações de 25-28). As frações relativas ao primeiro pico (de 14-18), não apresentaram a proteína de interesse e a formação deste pico pode ter sido devida a algum contaminante de maior massa molecular, presente em baixa concentração (o que inviabiliza sua visualização através da técnica de SDS-Page), a algum agregado (também presente em baixa concentração) ou à eluição de DNA que permaneceu na preparação após a lise celular. Desta forma, uma vez que se determinou o pico relativo à eluição da proteína hPPARδ LBD, seu volume de eluição foi determinado. A seta verde aponta o volume de eluição equivalente a 13,42 mL, que corresponde a uma proteína de massa molecular aparente de 30,9 kDa (de acordo com a curva de calibração).

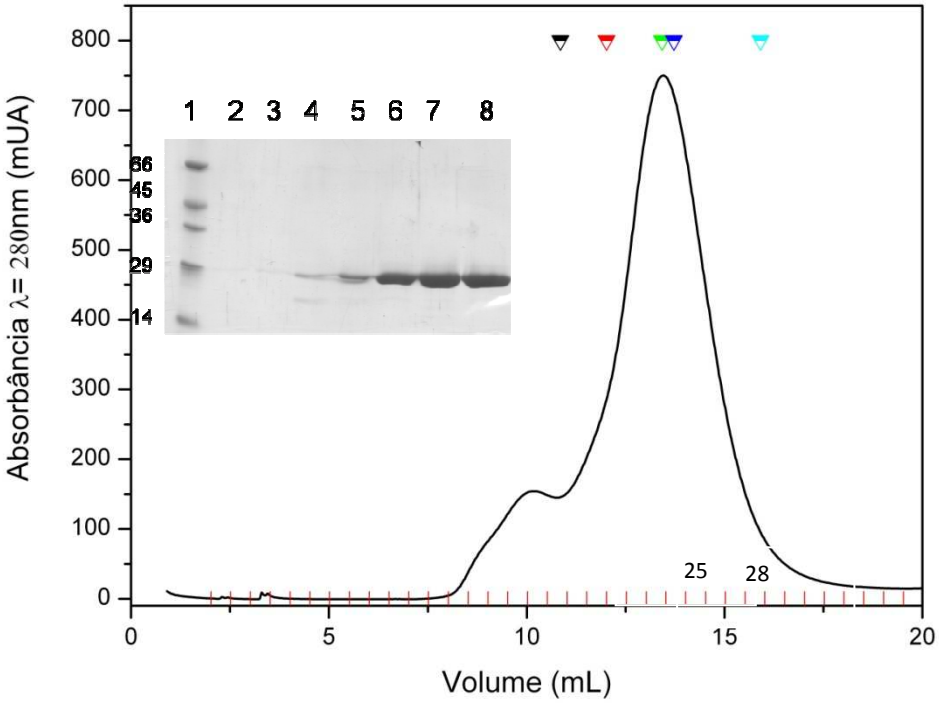

Figura 11 - Cromatografia de Exclusão Molecular da Proteína hPPARδ LBD. 160 μM da proteína hPPARδ LBD foram eluídos em coluna Superdex 75 10/30, previamente equilibrada com tampão A, a um fluxo de 1 mL/min, com frações de 0,5 mL. ∇ Posição da eluição do hPPARβ/δ LBD, ∇ Posição da eluição do padrão Conalbumina, ∇ Posição da eluição do padrão Ovalbumina, ∇ Posição da eluição do padrão Anidrase Carbônica, ∇ Posição da eluição do padrão Ribonuclease. As frações 23 e 28 estão assinaladas. Inserto: SDS-Page das frações referentes ao pico da eluição da proteína. Coluna 1- Padrão de Massa Molecular, Coluna 2- fração 16, Coluna 3- fração 17, Coluna 4- fração 23, Coluna 5- fração 24, Coluna 6- fração 25, Coluna 7- fração 26, Coluna 8- fração 28.

A construção apresentada neste trabalho (incluindo os resíduos remanescentes do vetor pET-15 após a clivagem da cauda de histidina) está representada na figura 12. De acordo com esta seqüência e utilizando o programa PROTPARAM[91], a massa molecular teórica calculada da proteína é de aproximadamente 31,4 kDa. Desta forma, a massa encontrada pelo método de cromatografia por exclusão molecular, fica em concordância com a massa teórica predita, sendo esta equivalente a de um monômero do receptor nuclear hPPARδ. Baseado ainda na sequência teórica da proteína e no programa PROTPARAM[91], a construção hPPARδ LBD apresenta ponto isoelétrico de 8,34 e a concentração de 1 mg/mL da proteína correspondem a 32 μM.

GSHMQVADLKAFSKHIYNAYLKNFNMTKKKARSILTGKASHTAPFVIHDIETLWQAEKGLVWKQL
VNGLPPYKEISVHVFYRCQCTTVETVRELTEFAKSIPSFSSLFLNDQVTLLKYGVHEAIFAMLASIVNKD
GLLVANGSGFVTREFLRSLRKPFSDIIEPKFEFAVKFNALELDDSDLALFIAAIILCGDRPGLMNVPRVEAI
QDTILRALEFHLQANHPDAQYLFPKLLQKMADLRQLVTEHAQMMQRIKKTETETSLHPLLQEIYKDMY

Figura 12 - Seqüência de aminoácidos da construção LBD da proteína hPPARδ. Os resíduos em vermelho são àqueles remanescentes do vetor pET-15 após a clivagem da cauda de histidina, em verde está apontada a metionina iniciadora e em preto, os resíduos relativos à proteína propriamente dita (de acordo com Uniprot Q03181).

Outra forma de verificarmos o estado oligomérico da proteína é analisarmos o raio hidrodinâmicos da mesma e compará-lo ao de outros receptores nucleares já descritos. O Rh (também conhecido como raio de Stokes) não é exatamente o raio da proteína hidratada, mas sim, refere-se ao raio de uma esfera maciça que se difunde em solução da mesma forma que a proteína relacionada (mesmo coeficiente friccional). O comportamento da esfera (bem como da molécula protéica) depende de efeitos de hidratação e de forma.

De acordo com a curva de calibração obtida através do gráfico de Kav x log Rh dos padrões, o Rh da proteína hPPARδ LBD é de 2,5 nm. Valores de Rh semelhantes já foram descritos para outros receptores nucleares na forma monomérica[92-93]. Além disto, este resultado fica em concordância com aquele encontrado em nosso grupo para a construção LBD do isotipo hPPARγ, o qual se encontra na forma monomérica em concentrações superiores a 300 μM (dados não publicados).

Embora as análises de cromatografia por exclusão molecular tenham apontado que a construção LBD do receptor hPPARδ é um monômero em solução, analisou-se a influência da concentração no estado oligomérico desta proteína pela técnica de espalhamento dinâmico de luz. Nesta técnica a velocidade de movimentação das moléculas em solução é relacionada ao tamanho que ela possui. Isto é possível porque o movimento Browniano experimentado por moléculas em solução está relacionado ao coeficiente friccional da molécula, bem como com seu tamanho e forma. Com esta técnica, determina-se o coeficiente de difusão translacional da molécula (D) e com ela, determina-se o valor de Rh associado a esta molécula pela equação de Stokes-Einstein:

$$D = \frac{kBT}{6\Pi \eta Rh}$$

kB=constante de Boltzman

T=temperatura em Kelvin

Para a realização das medidas a proteína foi concentrada a 32, 64, 160, 208 e 448 μM. As medidas foram realizadas em tampão A, em 30 aquisições de 2,5 s cada, a 4°C com posterior determinação do Rh da proteína em cada concentração analisada. A tabela 4 apresenta os resultados obtidos.

Tabela 4 - Raio Hidrodinâmico da proteína hPPARδ LBD, em função da concentração, obtido pela técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz.

Concentração da Proteína (μM)	*Raio Hidrodinâmico (nm)*
32	2,1
64	3,0
160	2,3
208	2,3
448	2,6

Embora o resultado obtido para a proteína a 64 μM seja discrepante (3,0 nm), os demais ficam em concordância com o raio determinado pela técnica de cromatografia por exclusão molecular. A presença de agregados que não foram sedimentados durante a centrifugação prévia pode ser uma possível explicação para este valor elevado na concentração citada. Excluindo-se este valor, conclui-se que a proteína hPPARδ LBD é um monômero em solução independentemente da concentração analisada.

Para a continuação dos estudos com o receptor nuclear hPPARδ LBD era necessário verificar a melhor condição para estabilização desta proteína. Para isto, procedeu-se com ensaios de estabilidade térmica monitorada por meio da técnica de dicroísmo circular. Por esta técnica, é possível monitorar a estrutura secundária da proteína, em cada tampão utilizado, conforme a temperatura na qual se encontra a proteína varia de 20 até 65°C. Com o aumento da temperatura, a proteína sofre alterações conformacionais devida o processo de desnaturação da mesma e, com isto, pode-se obter um parâmetro denominado temperatura de *melting* (Tm) que é relativo à estabilidade da proteína na condição onde o aumento de temperatura se deu.

Para isto, o hPPARδ LBD foi diluído em cada um dos tampões a ser testado (Tabela 1) e mantido em gelo por 15 minutos antes que a medida fosse realizada. Medidas realizadas após 30 minutos e 1 hora não mostraram diferenças significativas em relação àquelas realizadas após 15 minutos (dados não apresentados). Passado o período de incubação, a temperatura no porta-cela variou de 20 à 65°C e as alterações conformacionais foram acompanhadas através do monitoramento da elipsidade em 222 nm. Este comprimento de onda foi escolhido, pois se trata de um dos mínimos característicos de proteínas ricas em estrutura de hélice alfa[94], como é o caso do domínio LBD dos receptores nucleares.

Neste ensaio foi verificada a influência da concentração de NaCl, do pH e de aditivos, na correta manutenção da proteína hPPARδ LBD após o processo de purificação. As figuras 13A, B e C apresentam os resultados obtidos para cada tipo de influência estudado. A tabela 5 apresenta os valores de Tm obtidos em cada condição testada.

Tabela 5 - Temperatura média de desnaturação da proteína hPPARδ LBD, obtidas por dicroísmo circular, em presença de diferentes tampões.

Tampão (20 mM)	*Tm (°C)*
Acetato pH 6,5	49,2 ± 0,2
Borato pH 9,0	46,3 ± 0,1
Fosfato de Sódio pH 7,5	50,3 ± 0,2
Hepes pH 7,5	49,5 ± 0,1
Tris pH 8,0	49,5 ± 0,2
Concentração de NaCl (mM)	*Tm (°C)*
50	50,0 ± 0,1
100	49,7 ± 0,2
300	49,5 ± 0,1
Aditivo	*Tm (°C)*
Acetato de Amônio 500 mM	51,1 ± 0,2
Cloreto de Potássio 200 mM	49,5 ± 0,2
Chaps 0,5%	43,9 ± 0,1
Tween 0,005%, EDTA 3 mM	52,0 ± 0,2

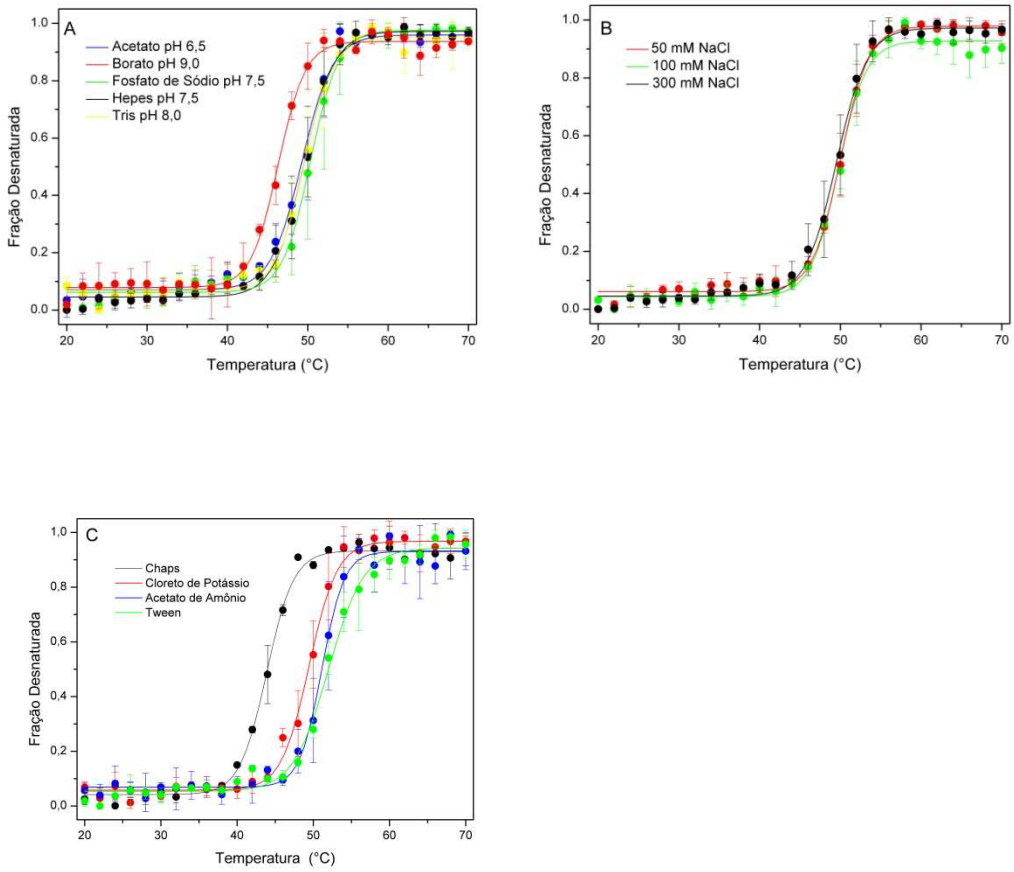

Figura 13 - Desnaturação térmica da proteína hPPARδ LBD, monitorada por dicroísmo circular a 222 nm. A) Aquecimento da proteína diluída em tampões com distintos sais tamponantes. B) Aquecimento da proteína diluída em tampão Hepes 20 mM pH 7,5, Glicerol 5%, β-mercaptoetanol 10 mM em presença de concentrações crescentes de NaCl. C) Aquecimento da proteína diluída em tampões contendo Acetato de Amônio, Cloreto de Potássio, Chaps e Tween/EDTA. Os dados experimentais são representados pelos pontos e a linha contínua representa o ajuste dos dados pela equação de Boltzmann.

De acordo com os valores de Tm obtidos, evidencia-se que os tampões que contém borato e chaps apresentaram maior influência no Tm apresentado pela proteína e, conseqüentemente, em seu grau de estabilidade. Através da figura 13A e C observa-se que o uso de pH 9,0, bem como a presença de chaps, respectivamente, deslocaram o Tm do hPPARδ LBD para valores mais baixos. Isto significa que, nestes tampões, a estabilidade da proteína foi menor em relação às demais condições testadas, uma vez que a condição na qual se tem 50% das moléculas desnaturadas (Tm) foi atingida mais cedo na rampa de aquecimento. Por outro lado, nenhuma outra condição testada foi capaz de estabilizar a proteína de forma que seu Tm fosse significativamente maior em relação aos demais.

Os tampões testados são condições já descritas para manutenção de outros receptores ou mesmo, adaptações delas. Com base nisto, nos valores obtidos e principalmente, na estabilidade da proteína após seu descongelamento, decidiu-se purificar a proteína no tampão 11 (denominado Tween/EDTA) para manutenção da proteína e futuros experimentos e no tampão 6 para os experimentos de cristalização[81].

Uma vez determinado o tampão mais adequado para se trabalhar com o receptor nuclear alvo deste trabalho, iniciou-se ensaios para obtenção do cristal da proteína em presença do seu agonista GW 0742 (Figura 14). A ativação do PPARδ por este ligante está relacionada com diferenciação celular, com ação protetora e de tratamento a alguns tipos de tumores, à angiogênese e aumento da capacidade oxidativa da musculatura esquelética[95; 96; 97; 98].

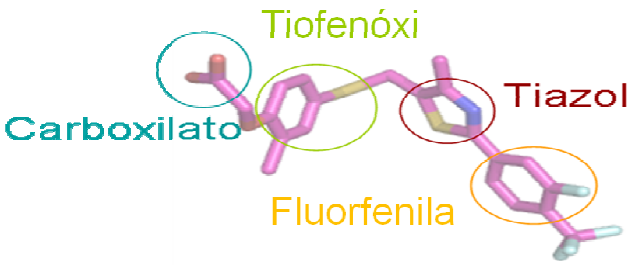

Figura 14 - Ligante GW 0742 com grupamentos químicos assinalados.

Os ligantes de PPAR geralmente apresentam um modelo farmacofórico que é constituído por uma cabeça hidrofílica orientada no sentido do motivo AF-2, formando interações de hidrogênio com resíduos polares do braço I, que estabilizam a conformação fechada da hélice 12, a qual é essencial para interação com os coativadores[15; 80-81]. O grupamento hidrofílico está ligado a uma cauda a hidrofóbica por meio de um braço com tamanho e flexibilidade variável[99]. A cauda hidrofóbica normalmente ocupa o braço II e a parte hidrofóbica do braço III do bolsão de ligação em forma de Y[39]. O ligante GW 0742 é um representante dos ligantes de PPAR que apresenta o modelo farmacofórico supracitado. Embora existam estudos da relação entre a estrutura – atividade sobre as bases químicas relacionadas com a seletividade (ele é cerca de 1000 vezes mais seletivo para o isotipo δ em relação aos demais) e a potência deste ligante, as bases estruturais responsáveis por estas características ainda não são conhecidas[60]. A obtenção de um modelo estrutural com o complexo proteína-ligante é fundamental para que tais questões possam ser esclarecidas.

Desta forma, obtiveram-se cristais do complexo pela cocristalização da proteína com o ligante GW 0742. A resolução estrutural obtida foi de 1,95 Å, com um adequado mapa de densidade eletrônica (Figura 15), que corrobora a ocupância predita pelo modelo farmacofórico previamente descrito. Os grupamentos carboxilato e tiofenol ocupam o braço I do sítio de ligação, enquanto a cauda, contendo os grupamentos tiazol e fenil, ocupa o braço II (Figura 15).

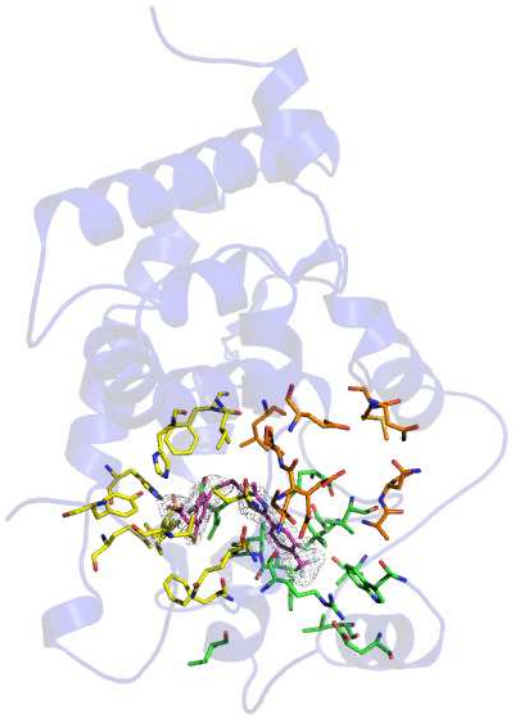

Figura 15 - Estrutura cristalográfica do complexo hPPARδ LBD:GW 0742. *(A)* O ligante (bastões magenta) ocupa o LBD do PPARδ (*cartoon* azul) e realiza interações com os resíduos pertencentes ao braço I (bastões amarelos), braço II (bastões verdes) e braço III (bastões laranja). Os átomos de nitrogênio, oxigênio, enxofre e flúor são coloridos em azul, vermelho, amarelo e azul claro, respectivamente. As figuras foram geradas com o programa Pymol[100].

A numeração dos resíduos, a partir de agora citados, está de acordo com a seqüência completa de cada isotipo[101]. Como indicado pelo programa Ligplot[89], o ligante GW 0742 realiza 29 interações com o sítio de ligação do hPPARδ LBD (Tabela 6). A figura 16 mostra os resíduos envolvidos em tais interações, bem como, o posicionamento de cada átomo do ligante.

Tabela 6 - Interações assinaladas pelo programa LigPlot entre o receptor PPARδ LBD e o ligante GW 0742.

átomo do ligante	ligante	átomo do PPARδ	residuo		tipo ligação	distância
CAO	GW0742	CD2	LEU	433	apolar	3,6532
CBA	GW0742	CE1	HIS	413	apolar	3,6903
CAK	GW0742	CE1	HIS	413	apolar	3,6614
CAI	GW0742	CE1	HIS	413	apolar	3,7533
CAV	GW0742	CE1	HIS	413	apolar	3,8466
CAM	GW0742	CD1	ILE	328	apolar	3,5373
SAS	GW0742	CD1	ILE	328	apolar	3,3301
SAT	GW0742	CD1	ILE	328	apolar	3,4447
CAM	GW0742	CG2	ILE	327	apolar	3,3979
CAL	GW0742	CD2	LEU	317	apolar	3,8989
CBE	GW0742	CG1	VAL	312	apolar	4,6358
CBE	GW0742	CG2	VAL	312	apolar	3,7474
CAY	GW0742	CG1	VAL	305	apolar	3,5413
CAP	GW0742	CD2	LEU	294	apolar	3,4367
CAI	GW0742	CE1	PHE	291	apolar	3,7958
CAB	GW0742	CG2	THR	252	apolar	3,7007
SAT	GW0742	SG	CYS	249	apolar	3,668
CBD	GW0742	SG	CYS	249	apolar	3,5545
CAZ	GW0742	SG	CYS	249	apolar	3,5907
CAJ	GW0742	SG	CYS	249	apolar	3,5629
CAA	GW0742	CB	CYS	249	apolar	3,4451
CAV	GW0742	CB	CYS	249	apolar	3,5229
CAM	GW0742	CB	CYS	249	apolar	3,8427
CAA	GW0742	CE1	PHE	246	apolar	3,4945
CAA	GW0742	CD1	PHE	246	apolar	3,5254
CAL	GW0742	CG1	VAL	245	apolar	3,8678
OAD	GW0742	OH	TYR	437	polar	2,6823
OAD	GW0742	NE2	HIS	413	polar	2,7625
OAC	GW0742	NE2	HIS	287	polar	2,7884

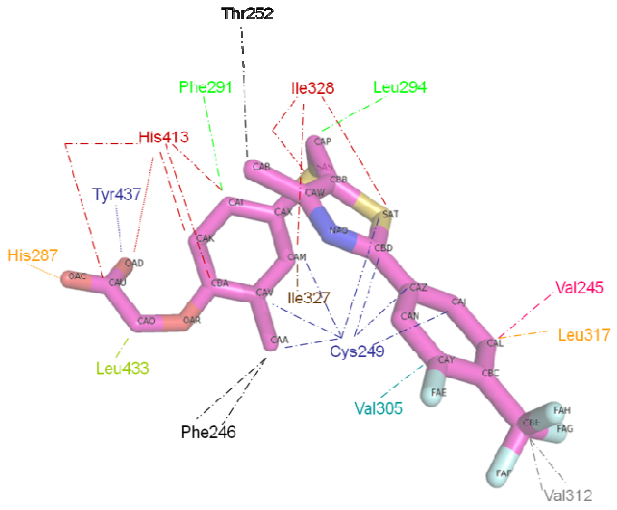

Figura 16 - Disposição esquemática dos resíduos do hPPARδ LBD que interagem com o ligante GW 0742. Interações de hidrogênio são apresentadas como linhas pontilhadas enquanto as demais interações são apresentadas como linhas tracejadas, que ligam o resíduo da proteína ao átomo do ligante que estão interagindo. Os átomos de nitrogênio, oxigênio, enxofre e flúor são coloridos em azul, vermelho, amarelo e azul claro, respectivamente.

O átomo de oxigênio OAC, pertencente à cabeça hidrofílica do ligante, faz uma interação de hidrogênio com o resíduo de His287. O carbono CAU, presente no grupamento carboxilato, realiza uma interação não polar com o resíduo de His413, assim como o oxigênio OAD, presente no mesmo grupamento, faz uma interação de hidrogênio com a His413. Este átomo de oxigênio ainda é capaz de outra interação de hidrogênio com o resíduo de Tyr437. Este conjunto de interações no braço I são responsáveis pela manutenção da conformação fechada da hélice 12, no complexo hPPARδ LBD:GW 0742 (Figura 17), como observado para outros ligantes de PPAR[80]. Além disto, a interação com resíduos da hélice 12 tem sido apontada como fator essencial para que o ligante induza uma resposta compatível com a de um agonista completo[102]. Apesar da descrição de um agonista parcial do isotipo γ que realizava tais interações com a hélice 12[103], a presença deste conjunto de interações em nossa estrutura, associada ao valor de EC_{50} na ordem de nanomolar encontrado em nossos ensaios de transativação (Tabela 7) e por[60], são fortes indicativos de que o ligante GW 0742 é um agonista total.

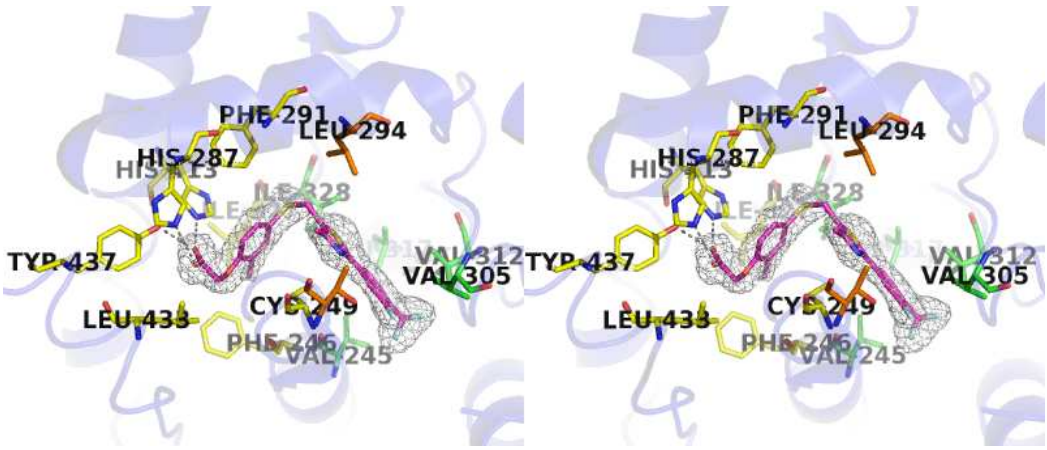

Figura 17 - *Stereo view* do sítio de ligação, mostrando a densidade eletrônica calculada para o ligante (mapa de omissão, contornado a σ=1.0) e os resíduos do hPPARδ responsáveis pela estabilização do ligante. Interações polares entre o hPPARδ LBD e o ligante GW 0742 são mostradas como linhas pontilhadas. Os átomos de nitrogênio, oxigênio, enxofre e flúor são coloridos em azul, vermelho, amarelo e azul claro, respectivamente. As figuras foram geradas com o programa Pymol[100].

Ainda no braço I, o átomo CAA interage com o resíduo de Phe246 enquanto os átomos CAI, CAM e CAO interagem com os resíduos de Phe291, Ile327 e Leu433, respectivamente. Os átomos CAA, CAV e CAM, bem como os átomos SAT, CBD e CAJ são responsáveis por interações com a Cys249. No braço II, átomos do mesmo grupo, bem como seus substituintes realizam interações com os resíduos Val245, Val305, Val312, Leu317 e Ile328. Por outro lado, no braço III, o átomo de carbono CAB interage com o resíduo Thr252 enquanto o carbono CD2 interage com a Leu294.

Embora todos os PPARs possuam o sítio de ligação em formato de Y, algumas sutis diferenças podem ser encontradas em cada isotipo, nas quais residem razões para a seletividade entre os PPARs. Entre os três isotipos, o PPARα tem o maior sítio de ligação[80], o que ajuda a explicar a interação diferencial dos PPARs com ácidos graxos de diferentes tamanhos e graus de insaturação[104]. O sítio maior do PPARα permite a esta isoforma a habilidade de interagir eficientemente com ácidos graxos saturados e insaturados, enquanto o PPARδ apresenta menor afinidade por tais moléculas e o PPARγ liga-se eficientemente a ácidos graxos poliinsaturados.

O reduzido tamanho do braço I do PPARδ pode explicar a baixa afinidade deste isotipo por alguns fibratos e ligantes com grandes grupamentos ligados à cabeça hidrofílica[39].

Esta observação foi confirmada por Takada e colaboradores[105] que realizou a mutação Met417V neste isotipo, alterando a metionina nativa para uma valina presente no PPARα. A substituição permitiu a interação entre os fibratos e a proteína mutante.

Ainda que seja a região mais conservada do bolsão de ligação, o braço III apresenta importantes diferenças entre os isotipos. O par Tyr344-Glu282 no PPARα reduz o tamanho da entrada do sítio de ligação, causando restrição estérica à entrada de ligantes. Por outro lado, os pares Glu255-Asn307 no PPARδ e Glu319-Glu371 no PPARγ não exercem o mesmo efeito nesta região[81].

O braço II é responsável por acomodar a parte hidrofóbica dos ligantes[39] e, juntamente com o braço I, geralmente é responsável por determinar a seletividade por cada isotipo[80].

Baseado neste principio e no fato do ligante GW 0742 realizar apenas 2 interações com resíduos do braço III, analisou-se os resíduos pertencentes aos braços I e II nos três isotipos. O braço I é o mais conservado entre os dois selecionados com um total de sete resíduos idênticos e cinco substituições conservadas para as mesmas posições nos três isotipos. Destes resíduos, oito estão envolvidos nas interações hPPARδ LBD GW 0742 sendo que dois deles são substituições conservadas: His287 e Phe291. Por outro lado, no braço II, de doze resíduos, cinco são idênticos, seis são substituições conservadas e uma é uma substituição não relacionada. Cinco resíduos estão associados com as interações com o ligante: Val245, Val305, Val312, Ile328 e Leu317, sendo que apenas o último é um resíduo conservado entre os três isotipos.

Visualizando esta situação, decidiu-se inspecionar mais atentamente as posições relativas aos resíduos Val245, Val305, Val312 e Ile328 na estrutura aqui obtida e nos outros dois PPARs (PDB ID 3ET1 e 3ET3). Os resíduos correspondentes nos isotipos α e γ ao resíduo δVal245 são Ile272 e Ile309, respectivamente. Os correspondentes ao resíduo δVal305 são os resíduos Val332 para o α e Ile369 para o γ. Apesar de apresentarem algumas sutis diferenças, estes resíduos ocupam posições semelhantes nas estruturas, não causando restrições estéricas ou outro tipo restrição estrutural à ligação do GW 0742 em cada sítio.

O resíduo δVal312 é substituído por uma Ile339 e uma Met376 nos isotipos α e γ respectivamente (Figura 18A). Enquanto aparentemente a alteração de uma valina para uma isoleucina não afeta o sítio no isotipo α, a presença de um carbono e um enxofre na metionina torna este resíduo mais volumoso que a valina podendo causar efeitos estéricos que impediriam a ligação do GW 0742 no hPPARγ. O mesmo efeito poderia explicar as diferenças no resíduo Ile328 do hPPARδ que é substituído pela Met355 no hPPARα e Met392

no hPPARγ (Figura 18B). A cadeia lateral da metionina pode impedir o correto posicionamento do ligante no sítio de ligação.

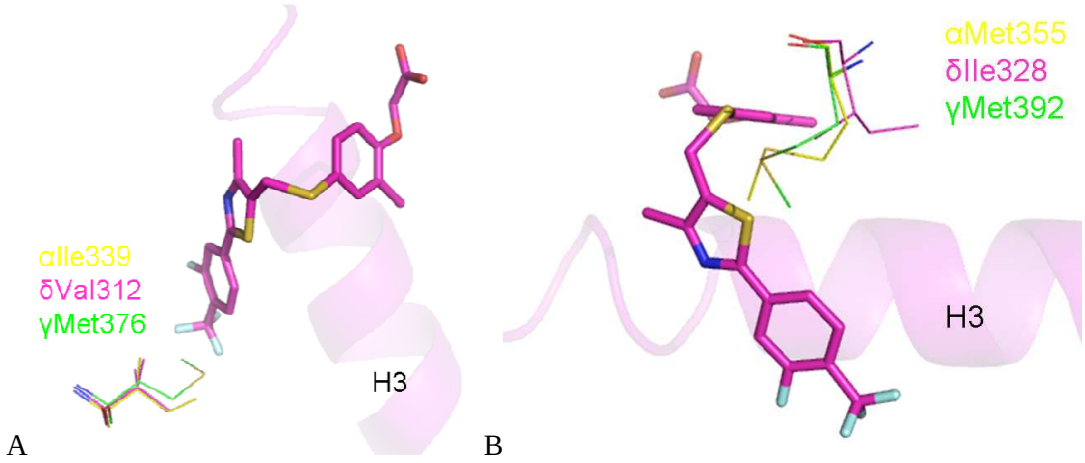

Figura 18 - A) Disposição espacial do resíduo de δVal312 (magenta) e os resíduos correspondentes nos outros dois isotipos de PPAR α (amarelo Ile339) e γ (verde Met376). B) Disposição especial do resíduo de δIle328 (magenta) e os resíduos correspondentes dos outros dois isotipos de PPAR α (amarelo Met3559) e γ (verde Met392). O ligante GW 0742 é mostrado como bastões magenta, e a hélice 3 do PPAR é mostrado como *cartoon* magenta. Os átomos de oxigênio, nitrogênio, enxofre e flúor são mostrados em vermelho, azul, amarelo e azul claro, respectivamente.

Para testar se os resíduos δVal312 e δIle328 estão envolvidos na seletividade da ligação do GW 0742 ao hPPARδ, construiu-se dois mutantes do PPARδ: PPARδ LBD/Val312Met e PPARδ LBD/Ile328Met. Esses mutantes foram experimental e computacionalmente testados quanto suas habilidades de ligação e ativação pelo GW 0742.

Primeiramente, os mutantes foram submetidos à ensaios de transativação onde os mutantes foram testados para a atividade induzida pelo pan-agonista benzafibrato para determinar se o baixo perfil de ativação observado para os mutantes poderia ser devido à um incorreto enovelamento da proteína. Os valores de EC_{50} já publicados para o benzafibrato em complexo com PPARα, PPARδ e PPARγ são de 50, 20 e 60 μM, respectivamente[106] . Nosso ensaio de transativação apresentou resultados compatíveis com os da literatura, com os valores de ativação decrescendo na seguinte ordem: PPARα, PPARδ e PPARγ (Figura 19A). O nível de ativação do Val312Met foi aproximadamente a ativação da proteína nativa, enquanto o nível de ativação do Ile328Met foi similar a do PPARγ (1,5 vezes de ativação). Juntos, esses resultados sugerem que as proteínas mutantes estão corretamente enoveladas.

A seguir, as ativações dos mutantes pelo agonista δ seletivo GW 0742, bem como pelos α agonista, GW 7647, e γ agonista, rosiglitazona foram testadas. A habilidade do ligante GW 0742 de se ligar aos mutantes é mostrada na figura 19B. Como especulado, as mutações afetaram a resposta apresentada pelos mutantes quando comparado com a proteína nativa. O valor de EC_{50} observado para o mutante Ile328Met foi uma ordem de magnitude maior (6.60 10^{-8}M) que aquela encontrada para a proteína nativa (3.25 10^{-9}M). Entretanto, uma menor ativação foi observada quando se comparou o mutante Val312Met. Mesmo em concentrações altas de ligante, como 10^{-6} M, não foi possível atingir a saturação da ligação, impossibilitando uma adequada estimativa do EC_{50} para o ligante GW 0742 para este mutante. Os níveis de ativação encontrados para o PPARα e PPARγ estão de acordo com o que foi descrito previamente[60; 107] e foram similares ao perfil apresentado pelo mutante Val312Met. Estes resultados indicam que as substituições volumosas propostas, significativamente afetaram a ligação do GW 0742 ao isotipo δ, especialmente a substituição Val312Met. Em particular, elas indicam que pequenas alterações no volume da cavidade próximo ao resíduo Val312 podem impedir a ligação do GW 0742, provavelmente por limitar a acomodação do ligante no braço II (Figura 18B).

O isotipo γ tem uma metionina na posição correspondente à valina no isotipo δ. A realocação do ligante causada pelos átomos extras da metionina leva a uma menor ativação no PPARγ, PPARα e mutantes do PPARδ pelo ligante GW 0742 (Figura 19B). A influência de resíduos volumosos nesta posição é corroborada pelo mutante Val312Met que também apresenta uma metionina numa posição similar ao PPARγ. Embora a ativação aconteça, a magnitude é muito menor que a ativação do PPARδ nativo.

Os resíduos Ile339, Val312 e Met376, nos PPARα, δ e γ respectivamente, estão na mesma conformação espacial (Figura 18A). Entretanto, a Ile328 no PPARδ está situada numa posição oposta aos resíduos correspondentes nos PPARs α e γ (Figura 18B). Esta orientação diferencial da metionina coloca sua cadeia lateral próxima aos átomos do ligante, e pode impedir a correta distância entre eles, evitando a ocorrência das interações adequadas. Além disto, o enxofre e o carbono adicionais na metionina também causam rearranjo do LBD e do ligante, empurrando o ligante contra a hélice 3 e desfazendo alguns contatos importantes entre a proteína e o ligante. Desta forma, as diferentes distâncias interatômicas entre os átomos da metionina e do ligante, combinadas com as modificações conformacionais, poderiam explicar o baixo perfil de ativação do mutante Ile328Met.

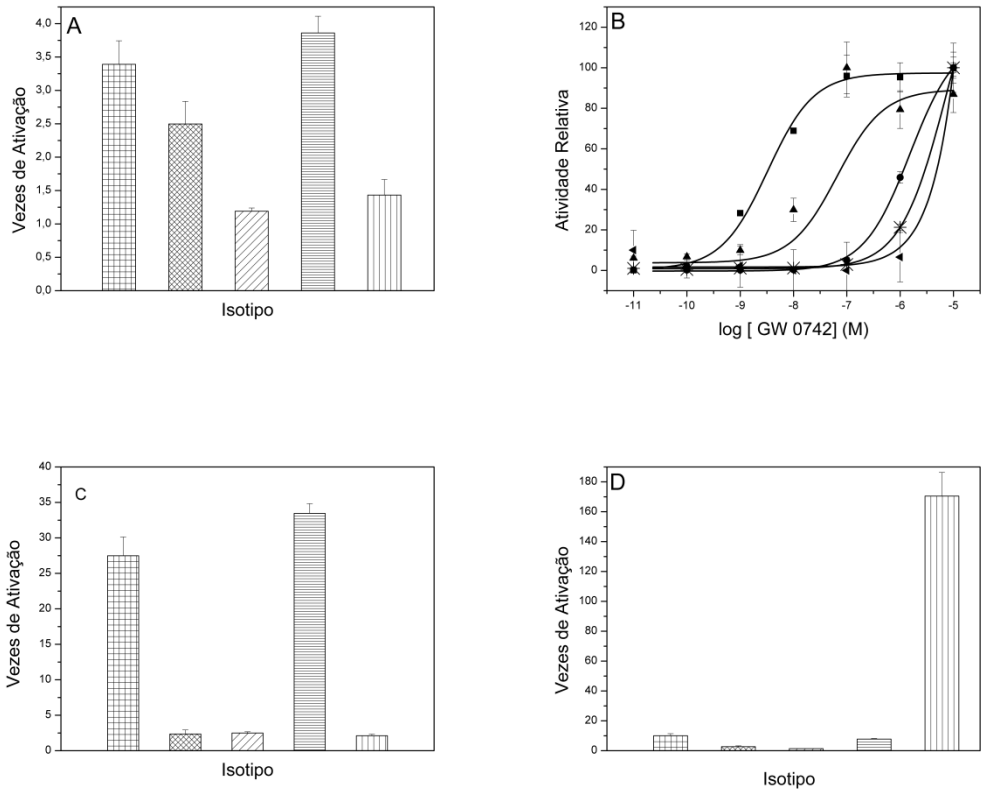

Figura 19 - Ensaios de ativação dos PPARs. Ativação dos PPARs induzida por *(A)* pan-agonista benzafibrato *(B)* agonista δ seletivo GW 0742; *(C)* agonista α seletivo GW 7647 e *(D)* agonista γ seletivo rosiglitazona. Todos os dados foram normalizados pelo nível de atividade da luciferase de *Renilla*. ■/# PPARδ nativo, ▲/xx PPARδVal312Met, •///PPARδIle328M, ✳/=PPARα e ◀/ ǁ PPARγ.

Tabela 7 - Valores de EC_{50}, para a ligação de GW 0742 à hPPARs nativos e mutantes, determinados através de ensaios de transativação.

Clone	*EC_{50} (nM)*
PPARδwt	3,253
PPARδV312M	1531
PPARδI328M	65,97
PPARα	7508
PPARγ	----------

Os ensaios de transativação conduzidos com o agonista α seletivo GW 7647 mostraram que o PPARα foi o mais ativado, seguido pelo PPARδ (Figura 19C). O PPARγ e os mutantes apresentaram o mesmo baixo perfil de ativação pelo ligante GW 7647, indicando que a existência de uma metionina na posição 328 (como encontrada no PPARα) não aumenta

a afinidade apresentada pelo isotipo δ e, surpeendentemente diminui a ativação encontrada para a proteína nativa.

O mesmo foi observado nos ensaios conduzidos com rosiglitazona (Figura 19oiD). A presença de resíduos volumosos nas posições 312 e 328 não são suficientes para proporcionar as interações adequadas com este ligante γ seletivo, uma vez que nenhum dos mutantes apresentou perfil de ativação maior que o apresentado pelo PPARδ nativo.

A fim de determinarmos as bases moleculares das interações do complexo PPARδ LBD:GW 0742 e testar a nossa hipótese, nós modelamos os mutantes do PPARδ LBD, ajustando o ligante dentro das estruturas dos modelos através da técnica de *docking*. Após os ciclos de *docking*, minimização de energia e simulações de dinâmica molecular, todos os LBDs (α, γ, δ e dos mutantes δVal312M e δIle328M) demonstraram pequenas acomodações da cadeia principal, com desvios (*trajectory root mean square deviation* - RMSDs) variando de 1.3 Ǻ to 1.65 Ǻ. As análises de *docking* mostraram que o ligante GW 0742 é capaz de ser acomodado em todos os PPARs. Apesar disto, para que o ligante seja acomodado nos isotipos α, γ e nos mutantes do δ, tanto o ligante como as cadeias laterais dos resíduos do sítio de ligação sofrem consideráveis alterações conformacionais neste processo, especialmente as cadeias laterais dos resíduos δVal312 e δIle328 (dados não mostrados).

Após as simulações, as análises dos desvios da Met312 e da Ile328 mostraram que o PPARδ apresentou a menor alteração conformacional em comparação aos outros PPARs (Tabela 8), indicando que os PPARs α, γ e os mutantes do δ necessitam rearranjar seus sítios de ligação para acomodar o ligante GW 0742.

Tabela 8 - Valores de RMSD dos resíduos δVal312 e δIle328 e os resíduos correspondentes nos PPARs α, γ e mutantes.

modelo	RMSD relativo ao δVal312 (Å)	RMSD relativo ao δIle328 (Å)
PPARδ	0.3	0.6
PPARα	0.6	1.1
PPARγ	1	1.8
PPARδV312M	0.9	0.7
PPARδI328M	0.3	0.9

Uma análise mais profunda dos resíduos de aminoácidos que formam o LBD dos PPARs levou a uma hipótese que poderia explicar, ao menos em parte, a menor afinidade do GW 0742 pelo PPARα, γ, bem como pelos mutantes δ. Em resumo, a posição e o tipo de resíduo presente em cada isotipo de receptor leva à diferenças na ocupação apresentada pelo ligante, o que é refletido no posicionamento da H12 e, como conseqüência, no *charge clamp*.

Os resíduos responsáveis pelo *charge clamp* são altamente conservados, sendo uma lisina da H3 e um glutamato da H12[107]. Para os PPARs, estes resíduos são α Lys292/Glu462, δ Lys265/Glu435 e γ Lys329/Glu499. Estes resíduos são responsáveis pelo mecanismo de ativação ligante dependente apresentado pelos receptores nucleares, sendo que o motivo LXXLL dos coativadores é acomodado entre estes resíduos[107] através de contatos polares formados entre o grupo carboxil do glutamato e o grupamento amino da lisina com os resíduos dos coativadores[107-108].

Quando se analisou as posições destes resíduos nas estruturas nativas (PPARα, δ e γ), identificou-se algumas diferenças sutis (Figura 20A e B). Primeiramente, o grupo carboxil do glutamato dos isotipos α e γ está perpendicular à H12, enquanto o glutamato do δ está paralelo à H12. Desta forma, o δGlu está posicionado em uma posição diferente daquela presente nos outros dois isotipos. Comparando-se a posição do glutamato nos isotipos α e γ, é possível observar que estes resíduos estão levemente deslocados um em relação ao outro (Figura 20A). O mesmo deslocamento é observado na lisina, com um efeito mais pronunciado no resíduo do isotipo γ (Figura 20B).

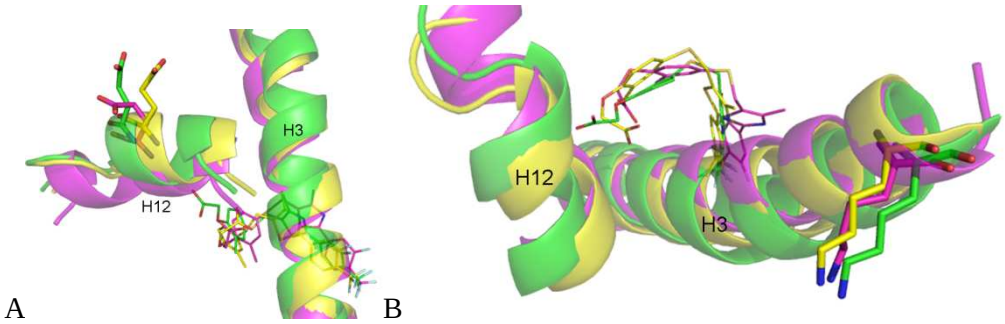

Figura 20 - Resíduos envolvidos no c*harg clamp*, nas estruturas nativas do PPAR após as simulações de dinâmica molecular. As representações em *cartoon* das hélices 3 e 12 dos PPARs α, δ e γ estão em amarelo, magenta e verde, respectivamente. As representações em linha do ligante GW 0742 dentro dos PPARs α, δ e γ estão em amarelo, magenta e verde, respectivamente. A) Representação em bastão dos resíduos αGlu462, δGlu435 e γGlu499 estão em amarelo, magenta e verde, respectivamente. B) Representação em bastão dos resíduos αLys292, δLys265 e γLys329 estão em amarelo, magenta e verde, respectivamente. Os átomos de oxigênio, nitrogênio, enxofre e flúor são mostrados em vermelho, azul, amarelo e azul claro, respectivamente.

A comparação de nosso modelo estrutural para o PPARδ nativo com os mutantes Val312Met e Ile328Met revelaram que os resíduos do *charge clamp* também apresentaram conformação espacial levemente diferente. Como observado com as estruturas nativas, o deslocamento da H12 faz com que o resíduo de glutamato apresente as maiores diferenças (Figure 21A). O grupamento carboxil do resíduo de glutamato do mutante Ile328Met está voltado para a parte da frente da estrutura (paralelo à H3), enquanto o mesmo grupo do PPARδ nativo e do mutante Val312Met está voltado na posição contrária (em direção à parte posterior da estrutura). Apesar disto, na estrutura nativa a cadeia lateral da lisina está em disposição espacial levemente diferente, com o grupamento amino posicionado na mesma disposição espacial (Figura 21B).

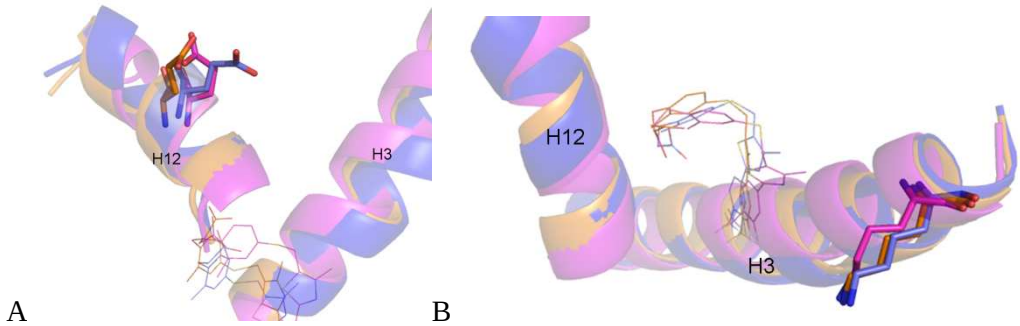

Figura 21 - Resíduos envolvidos no c*harg clamp*, nas estruturas do PPARδ nativo e nos mutantes após as simulações de dinâmica molecular. As representações em cartoon das hélices 3 e 12 dos PPARs nativo, Val312Met e Ile328Met estão em magenta, laranja e azul, respectivamente. As representações em linha do ligante GW 0742 dentro dos PPAR nativo, Val312Met e Ile328Met estão em magenta, laranja e azul, respectivamente. A) Representação em bastão dos resíduos Glu435nativo, Val312MetGlu435 e Ile328MetGlu435 estão em magenta, laranja e azul, respectivamente. B) Representação em bastão dos resíduos Lys265nativo, Val312MetLys265 e Ile328MetLys265 estão em magenta, laranja e azul, respectivamente. Os átomos de oxigênio, nitrogênio, enxofre e flúor são mostrados em vermelho, azul, amarelo e azul claro, respectivamente.

Baseado nestas interações, propôs-se que a menor ativação dos PPARα e γ, bem como dos PPARδ mutantes pode ser o resultado de uma ligação ineficiente das moléculas de coativadores, dada as diferenças nos resíduos do *charge clamp*. O PPARγ e o PPARδVal328Ile são as estruturas com maiores variações nos resíduos do *charge clamp* com relação aos resíduos do PPARδ nativo. Assim sendo, não é surpreendente que seus valores de EC_{50} sejam os maiores, corroborando a hipótese de que as mutações, o posicionamento e o tamanho de alguns resíduos nas estruturas nativas do PPARα e γ são responsáveis pela acomodação alternativa do GW 0742 dentro do sítio do LBD. Esta acomodação diferencial modifica o posicionamento dos resíduos do *charge clamp*, os quais interferem na ativação do PPAR por este ligante.

4.2 Estudos relacionados ao receptor completo

Para que as melhores condições para expressão da proteína fossem encontradas, diferentes conjuntos de temperaturas, períodos de indução e concentrações de IPTG foram testados, como mostrados na Tabela 9.

Tabela 9 - Condições utilizadas para testar a expressão da proteína hPPARδ *Full*.

Temperatura de Crescimento Celular (°C)	*Temperatura de Indução da Expressão Protéica (°C)*	*Período de Indução (horas)*	*[] de IPTG*
20	18	5	0,1mM/0,5mM/ 1mM
		12	0,1mM/0,5mM/ 1mM
37	18	5	0,1mM/0,5mM/ 1mM
		12	0,1mM/0,5mM/ 1mM
37	20	3	0,1mM/0,5mM/ 1mM
		5	0,1mM/0,5mM/ 1Mm

Bactérias contendo o plasmídeo de interesse cresceram em 5 mL de meio LB, com 25 μg/mL de Kanamicina, por 12 horas, a 20 ou 37°C sob agitação. O conteúdo de cada tubo foi utilizado, posteriormente, para inocular 30mL de meio LB em presença do mesmo antibiótico.

Em cada condição, o crescimento celular se deu sob agitação constante (150 RPM) até que a DO600=0,8-1 fosse atingida. Uma vez alcançada a densidade celular desejada, a indução foi realizada com a concentração desejada de IPTG e a agitação foi mantida. Após o período de indução, as células foram centrifugadas e posteriormente lisadas, originando o extrato protéico. O extrato foi submetido à centrifugação, originando uma fração denominada *pellet* (p) e outra denominada sobrenadante (s). Proteínas expressas na forma solúvel permanecem na fração sobrenadante enquanto àquelas expressas em corpos de inclusão, apresentam-se no *pellet*.

A figura 22A (colunas 2, 3 e 4) apresenta o padrão de expressão antes da indução em todas as condições de indução testadas. A ausência de banda em torno de 55 kDa (massa aproximada da construção hPPARδ *Full*), indica que não há expressão não induzida da proteína na ausência do indutor. As figuras 22 (B e C), 23 e 24 mostram o produto de expressão em cada condição testada. Embora pouco expressiva, em todas as figuras é possível observar uma banda relativa ao tamanho da proteína hPPARδ *Full* (tanto nas frações p como nas frações s) indicadas pelas setas (por motivo de clareza, apenas algumas bandas estão assinaladas). Isto é indicativo de que a expressão se deu em todas as condições testadas, sendo que a presença de tais bandas nas frações p e s demonstram que a proteína foi parcialmente expressa na forma solúvel e parcialmente expressa na forma insolúvel.

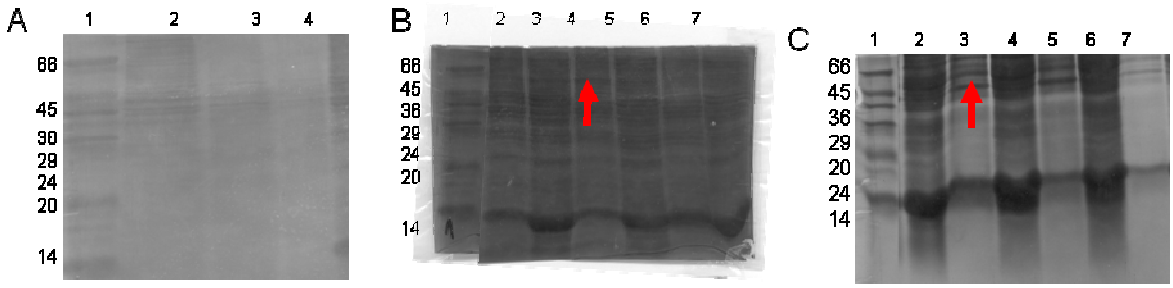

Figura 22 - Teste de Expressão do hPPARδ *Full*. A) Coluna 1, Padrão de massa molecular de acordo com os valores apresentados à esquerda da coluna; Coluna 2, Antes Ind cresc 37 ºC, ind 20 ºC; Coluna 3, Antes Ind cresc 20 ºC, ind 18 ºC; Coluna 4, Antes Ind cresc 37 ºC, ind 18 ºC. B) Teste de Expressão do hPPARδ *Full* Cresc 37 ºC, Ind 20 ºC. Coluna 1, Padrão de massa molecular de acordo com os valores apresentados à esquerda da col; Coluna 2, 0,1mM de IPTG, p, 3 h de ind. Coluna 3, 0,1mM de IPTG, s, 3 h de ind. Coluna 4, 0,5mM de IPTG, p, 3 h de ind. Coluna 5, 0,5mM de IPTG, s, 3 h de ind. Coluna 6, 1mM de IPTG, p, 3 h de ind. Coluna 7, 1mM de IPTG, s, 3 h de ind. C) Coluna 1, Padrão de massa molecular de acordo com os valores apresentados à esquerda da coluna; Coluna 2, 0,1mM de IPTG, p, 5 h de ind. Coluna 3, 0,1mM de IPTG, s, 5 h de ind. Coluna 4, 0,5mM de IPTG, p, 5 h de ind. Coluna 5, 0,5mM de IPTG, s, 5 h de ind. Coluna 6, 1mM de IPTG, p, 5 h de ind. Coluna 7, 1mM de IPTG, s, 5 h de ind. (cresc.= crescimento; ind.= indução; s = sobrenadante; p = pellet; h = hora).

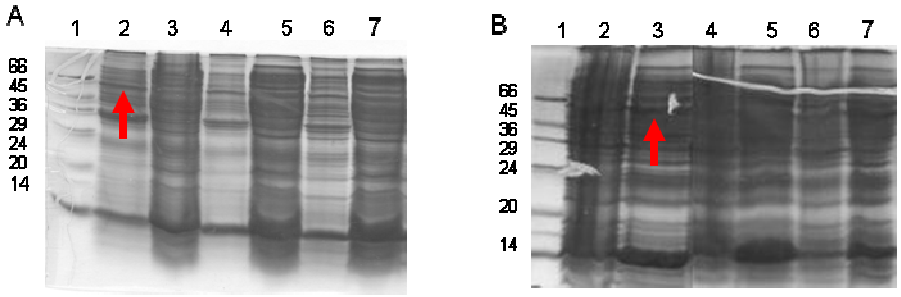

Figura 23 - Teste de Expressão do hPPARδ *Full*. Crescimento 20 ºC, Indução 18 ºC. A) Coluna 1, Padrão de massa molecular de acordo com os valores apresentados à esquerda da coluna; Coluna 2, 0,1mM de IPTG, p, 4 h de ind. Coluna 3, 0,1mM de IPTG, s, 4 h de ind. Coluna 4, 0,5mM de IPTG, p, 4 h de ind. Coluna 5, 0,5mM de IPTG, s, 4 h de ind Coluna 6, 1mM de IPTG, p, 4 h de ind. Coluna 7, 1mM de IPTG, s, 4 h de ind. B) Coluna, Padrão de massa molecular de acordo com os valores apresentados à esquerda da col; Coluna 2, 0,1mM de IPTG, p, 12 h n. Coluna 3, 0,1mM de IPTG, s, 12 h. Coluna 4, 0,5mM de IPTG, p, 12 h. Coluna 5, 0,5mM de IPTG, s, 12 h. Coluna 6, 1mM de IPTG, p, 12 h. Coluna 7, 1mM de IPTG, s, 12 h.

O maior rendimento na forma solúvel foi observado com o crescimento celular a 37°C seguido de indução a 18°C (12 hs), com 1mM de IPTG (Figura 24B, coluna 7) . Assim sendo, esta foi a condição escolhida para expressão da proteína em larga escala.

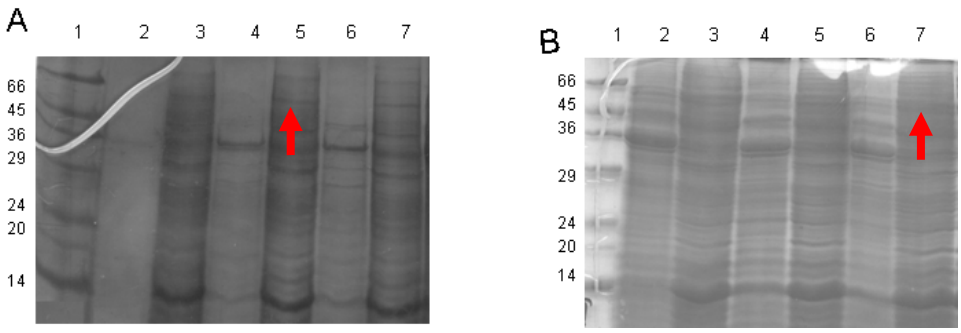

Figura 24 - Teste de Expressão do hPPARδ *Full.* Crescimento 37 ºC, Indução 18 ºC. A) Coluna 1, Padrão de massa molecular de acordo com os valores apresentados à esquerda da coluna; Coluna 2, 0,1mM de IPTG, p, 4 h de ind. Coluna 3, 0,1mM de IPTG, s, 4 h de ind. Coluna 4, 0,5mM de IPTG, p, 4 h de ind. Coluna 5, 0,5mM de IPTG, s, 4 h de ind. Coluna 6, 1mM de IPTG, p, 4 h de ind. Coluna 7, 1mM de IPTG, s, 4 h de ind. B) Coluna 1, Padrão de massa molecular de acordo com os valores apresentados à esquerda da coluna; Coluna 2, 0,1mM de IPTG, p, 12 h. Coluna 3, 0,1mM de IPTG, s, 12 h. Coluna 4, 0,5mM de IPTG, p, 12 h. Coluna 5, 0,5mM de IPTG, s, 12 h. Coluna 6, 1mM de IPTG, p, 12 h. Coluna 7, 1mM de IPTG, s, 12 h.

Uma vez determinada as melhores condições de crescimento e indução, seguiu-se com a inoculação de 1 L de meio LB, com posterior preparação do extrato protéico, de acordo com o descrito em Materiais e Métodos.

A proteína hPPARδ *Full* foi expressa com cauda de Histidina, sendo que uma cromatografia de afinidade com eluição da proteína em gradiente crescente de imidazol, foi o primeiro passo de purificação realizado. O sobrenadante do extrato protéico foi incubado com resina de cobalto, sendo a proteína eluída com concentrações crescentes de imidazol (30mM, 50mM, 60mM, 100mM e 300mM). A figura 25 apresenta as frações obtidas durante a purificação por afinidade. Com base na sequência primária da proteína e no programa PROTPARAM[91], a construção hPPARδ *Full* apresenta massa molecular de 50,2 kDa, ponto isoelétrico de 7,63 e a concentração de 1 mg/mL da proteína correspondem a 18 μM. É possível notar a adequada eluição da proteína nas frações que apresentam de 30 a 300 mM de imidazol (colunas 5 a 9). Por se mostrarem com menos contaminantes, as frações de 60 a 300 mM de imidazol (caixa tracejada vermelha) foram reunidas e concentradas para o próximo passo de purificação.

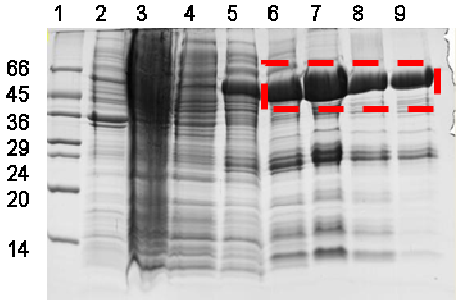

Figura 25 - Purificação da Proteína hPPARδ *Full*. Coluna 1, Padrão de massa molecular, Coluna 2, Pellet,Coluna 3, Fração não ligada, Coluna 4, lavagem, Coluna 5, 30 mM Imidazol, Coluna 6, 50 mM Imidazol, Coluna 7, 60 mM Imidazol, Coluna 8, 100 mM Imidazol, Coluna 9, 300 mM Imidazol.

Como após a cromatografia por afinidade a presença de contaminantes ainda era evidente, o hPPARδ *Full* foi submetido à cromatografia por exclusão de tamanho em coluna Superdex 75 10/30. A figura 26 apresenta o cromatograma obtido. É possível observar a presença de um pico bem definido e a formação de outro pequeno pico. Para averiguar onde a proteína hPPARδ *Full* eluía, as frações representativas de cada pico foram submetidas à eletroforese desnaturante e o resultado pode ser visualizado no inserto da figura 26. Através desta análise, evidencia-se que a proteína de interesse eluiu nas frações correspondentes ao segundo pico encontrado no cromatograma (frações de 19-23). As frações relativas ao primeiro pico (de 13-18), não apresentaram a proteína de interesse e a formação deste pico pode ter sido devida a algum contaminante de maior massa molecular, presente em baixa concentração (o que inviabiliza sua visualização através da técnica de SDS-Page), ou a algum agregado (também presente em baixa concentração).

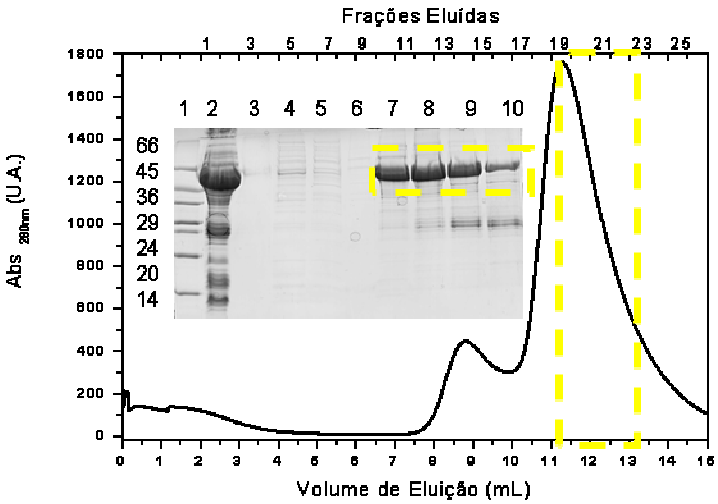

Figura 26 - Cromatografia de exclusão molecular da proteína hPPARδ *Full*. A proteína foi eluída em coluna Superdex 75 10/30, previamente equilibrada com tampão Tween, a um fluxo de 1 mL/min, com frações de 0,5 mL. As frações 19 a 23 estão assinaladas. Inserto: SDS-Page das frações referentes ao pico da eluição da proteína. Coluna 1, Padrão de Massa Molecular, Coluna 2, proteína antes de passar na coluna, Coluna 3, fração 13, Coluna 4, fração 15, Coluna 5, fração 16, Coluna 6, fração 17, Coluna 7, fração 19, Coluna 8, fração 21, Coluna 9, fração 22 e Coluna 10, fração 23.

Uma vez determinado o pico relativo à eluição da proteína, estas frações foram agrupadas e concentradas, sendo a concentração total de proteína determinada pelo método de Bradford, com posterior clivagem da cauda de histidina. Para isto incubou-se a proteína com trombina (7 U/mg proteína), a 18°C por 12 horas. A proteína resultante foi, concentrada, dosada pela metodologia de Bradford e armazenada em freezer -80°C até o momento do uso.

Após a obtenção das proteínas hPPARδ LBD e hPPARδ *Full* devidamente purificadas, as mesmas foram dialisadas contra os tampões Tween/EDTA (hPPARδ LBD) ou Tween (hPPARδ *Full*) e concentradas. Frações de cada proteína foram incubadas com ligante agonista (GW 0742) ou antagonista (GSK 0660) e submetidas ao experimento de titulação onde 10 nM de cada cofator que se desejava analisar era mantido na cubeta (diluído no tampão apropriado) e concentrações crescentes de proteína eram adicionadas. O mesmo foi realizado para as proteínas na ausência de ligantes.

Analisou-se a afinidade das proteínas por cada cofator, em cada condição testada, através da constante de dissociação (K_d) obtida após o ajuste dos dados experimentais, utilizando-se uma equação de um sítio simples, ou seja, admitindo-se que apenas uma molécula de cofator é capaz de se ligar a uma molécula de proteína.

As curvas obtidas são visualizadas na figura 27 e os K_{ds} na tabela 10.

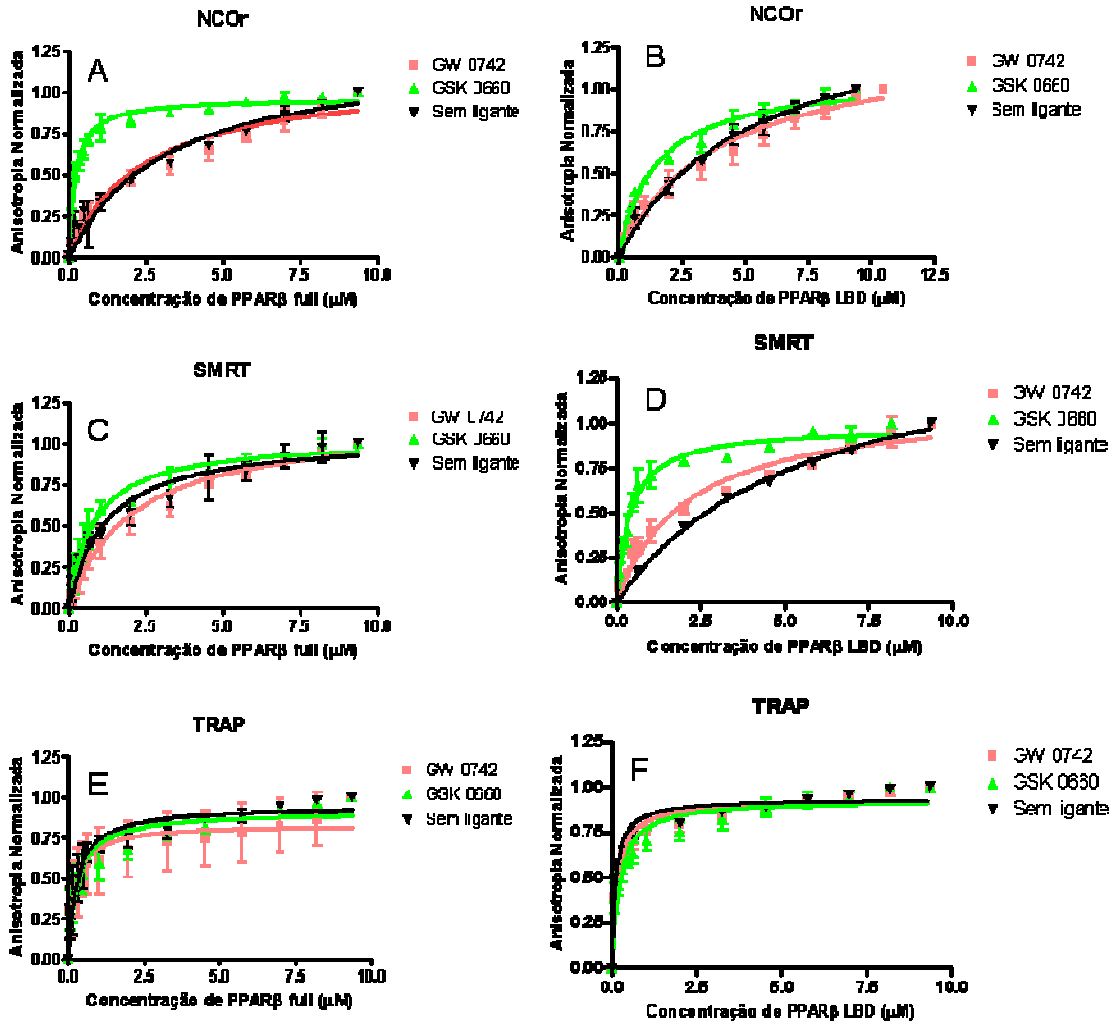

Figura 27 - Curvas de titulação das proteínas hPPARδ LBD e hPPARδ *Full*, em cofatores, em presença e na ausência de ligantes, obtidas pela técnica de anisotropia de fluorescência. Os gráficos mostram a média obtida em pelo menos dois experimentos independentes de titulação das proteínas hPPARδ LBD e hPPARδ *Full*, com e sem ligante, em peptídeos cofatores, monitorados pela técnica de anisotropia de fluorescência. A) e B) hPPARδ *Full* hPPARδ LBD titulados em NCOr; C) e D) PPARβ *Full* e PPARβLBD titulados em SMRT; E) e F) hPPARδ e hPPARδ LBD titulados em TRAP.

Tabela 10 - Constantes de Dissociação (K_d) obtidas experimentalmente para as proteínas hPPARδ LBD e hPPARδ *Full* e cofatores, em presença e na ausência de ligantes.

Full/LBD	*GW 0742 (μM)*	*GSK 0660 (μM)*	*Sem ligante (μM)*
NCOr	2,4 ± 0,5	0,2 ± 0,02	3,1 ± 0,7
SMRT	2,0 ± 0,3	0,8 ± 0,1	1,2 ± 0,2
TRAP	0,2 ± 0,05	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,04
NCOr	3,8 ± 0,7	1,4 ± 0,2	5,2 ± 0,7
SMRT	3,8 ± 0,7	0,4 ± 0,04	5,5 ± 0,5
TRAP	0,1 ± 0,02	0,2 ± 0,04	0,1 ± 0,02

Os cofatores NCOr e SMRT são correpressores[18] enquanto o TRAP é um coativador[18]. Desta forma, como descrito para outros receptores nucleares, o antagonista do PPARδ, GSK0660, deve propiciar a interação da proteína com os correpressores e o agonista GW 0742 deve propiciar a interação com o coativador[20].

De acordo com esta observação, nota-se que as duas construções do PPARδ apresentaram maior afinidade (menor K_d) pelos correpressores NCOr e SMRT em presença do antagonista (K_d = 0,20 ± 0,02 μM e 0,80 ± 0,1 μM para a construção *Full* e K_d = 1,4 ± 0,2 μM e 0,4 ± 0,04 μM para a construção LBD, respectivamente) do que em presença do agonista (K_d = 2,4 ± 0,5 μM e 2,0 ± 0,3 μM para a construção *Full* e K_d = 3,8 ± 0,7 μM e 3,8 ± 0,7 μM para a construção LBD, respectivamente).

Para a proteína sem ligante, esperava-se que a interação com os correpressores fosse comparável à interação que acontece na presença de antagonista, porém, o que se observou com ambas as construções, foi um perfil mais próximo ao obtido com o agonista do que com o antagonista (Tabela 10). A provável explicação para este fato é a presença de ácidos graxos (agonistas naturais de PPARs) provenientes da bactéria do sistema de expressão, no bolsão de ligação. A presença de ligantes provenientes da expressão já foi demonstrada por Fyffe e colaboradores[81], e explica a menor afinidade dos correpressores, por ambas construções sem ligante, quando comparada às condições onde as proteínas apresentavam antagonistas em seu bolsão de ligação.

O tipo de construção utilizada mostrou-se mais importante na interação com NCOr, uma vez que a afinidade da construção *Full* com antagonista foi maior (K_D = 0,2 ± 0,02 μM) do que a apresentada pela construção LBD (K_D = 1,4 ± 0,2 μM), indicando que outra região da proteína, além do LBD, pode estar favorecendo a adequada interação do correpressor pela proteína. É possível que o NCOr esteja interagindo com outras regiões como o domínio AF-1

ou com o braço (não presentes na construção LBD) ou que a presença dos demais domínios tenha permitido um enovelamento mais adequado da proteína *Full*, aumentando a afinidade da interação PPAR/GW 0660-NCOr. Tal preferência não foi observada para o SMRT uma vez que as constantes encontradas para proteína com antagonista estão na mesma ordem de grandeza (K_D = 0,8 ± 0,1 μM para construção *Full* e K_D = 0,4 ± 0,04 μM para construção LBD).

As constantes encontradas para ambas as construções da proteína em todas as condições testadas para a interação com o coativador TRAP, estão na mesma ordem de grandeza, não sendo consideradas significativamente diferentes. Isto significa que o tipo de ligante ou a presença de domínios além do LBD não alteraram a afinidade na interação com o cofator.

5 *Conclusões*

A expressão e purificação da proteína hPPARδ LBD foi adequadamente alcançada. As condições apropriadas de manutenção da mesma foram averiguadas por meio da técnica de dicroísmo circular, onde se determinou o melhor tampão para os demais experimentos. O estado oligomérico deste receptor foi determinado em solução através das técnicas de cromatografia por exclusão de tamanho e por espalhamento dinâmico de luz, onde se concluiu que a proteína é monomérica nas condições testadas. Por apresentarem bolsões de ligação com mesmo formato e constituição de resíduos muito próximos, é intrigante saber que existam ligantes com alta afinidade e especificidade por cada isotipo de PPAR.

Uma maneira de elucidar as possíveis razões nas quais residem as bases estruturais para tal característica é a obtenção de estruturas de alta resolução com ligantes específicos para cada isotipo, associado a estudos estruturais e funcionais com mutantes de resíduos que se mostrem potencialmente importantes para tais interações. Esta abordagem foi utilizada no presente trabalho onde houve êxito na obtenção da estrutura de alta resolução do complexo da proteína hPPARδ LBD:GW 0742. Através desta estrutura e da construção de dois mutantes, V312M e I328M, concluiu-se que estes dois resíduos são potencialmente importantes para interação de ligantes estruturalmente relacionados com GW 0742, ao isotipo δ.

Assim como ocorreu com o domínio LBD, a expressão e purificação da proteína hPPARδ *Full* foi adequadamente alcançada.

Através da técnica de anisotropia de fluorescência, foi possível realizar uma breve análise qualitativa da interação diferencial entre o receptor nuclear hPPARδ *Full* e três diferentes cofatores, em presença de ligante agonista e antagonista. Através da mesma ficou claro que cada cofator apresenta um padrão diferente de interação com a proteína que pode ser dependente de outras regiões da proteína além daquelas já classicamente descritas. Isto já foi verificado para outros receptores e será investigado mais detalhadamente em nosso grupo para determinação de como e quais regiões do hPPARδ podem ser chave no processo de regulação por intermédio de cofatores.

6 *Perspectivas*

Os resultados obtidos se mostraram promissores no que tange o aumento do conhecimento das bases relacionadas com a especificidade de ligantes pelos isotipos de PPARs. Desta forma, os próximos passos diretamente relacionados a tais resultados serão à obtenção de estruturas de alta resolução, com ligantes que ocupem posições distintas no sítio de ligação, buscando encontrar outros resíduos relacionados à seletividade de ligantes ao isotipo δ. Seguiremos tentando obter cristais da proteína com ligantes antagonistas, uma vez que não existem estruturas já descritas de hPPARδ com este tipo de moléculas no sítio ativo.

Além disto, a identificação de outras regiões de interação entre o receptor hPPARδ e proteínas correguladoras auxiliaria na melhor compreensão dos mecanismos que envolvem a regulação desta classe de proteínas. Desta forma, intenciona-se obter cristais de complexos mutiprotéicos que envolvam o hPPARδ *Full*, ligantes (agonistas e antagonistas) e peptídeos, ou preferencialmente, proteínas correguladoras.

REFERÊNCIAS

1 BAIN, D. L. et al. Nuclear receptor structure: implications for function. **Annual Reviews of Physiology**, v. 69, p. 201-220, 2007. ISSN 0066-4278. Disponível em: < http://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.physiol.69.031905.160308>. Acesso em: 30 May 2011.

2 ARANDA, A.; PASCUAL, A. Nuclear hormone receptors and gene expression. **Physiological Reviews**, v. 81, n. 3, p. 1269-1304, Jul 2001. ISSN 0031-9333.

3 NUCLEAR Receptor. Disponível em: < http://en.wikipedia.org/wiki/Nuclear_receptor >. Acesso em: 10 Out. 2011.

4 LAUDET, V.; GRONEMEYER, H. **The nuclear receptor Factsbook**. San Diego: Academic Press, 2002.

5 GLASS, C. K. Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers. **Endocrine Reviews**, v. 15, n. 3, p. 391-407, Jun 1994. ISSN 0163-769X.

6 CHEN, Z. P. et al. Pure and functionally homogeneous recombinant retinoid X receptor. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 41, p. 25770-25776, Oct 1994. ISSN 0021-9258.

7 HÖRLEIN, A. J. et al. Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. **Nature**, v. 377, n. 6548, p. 397-404, Oct 1995. ISSN 0028-0836.

8 HEERY, D. M. et al. A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. **Nature**, v. 387, n. 6634, p. 733-6, Jun 1997. ISSN 0028-0836.

9 JEYAKUMAR, M.; TANEN, M. R.; BAGCHI, M. K. Analysis of the functional role of steroid receptor coactivator-1 in ligand-induced transactivation by thyroid hormone receptor. **Molecular Endocrinology**, v. 11, n. 6, p. 755-767, Jun 1997. ISSN 0888-8809.

10 GLASS, C. K.; ROSE, D. W.; ROSENFELD, M. G. Nuclear receptor coactivators. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 9, n. 2, p. 222-232, Apr 1997. ISSN 0955-0674.

11 FENG, W. et al. Hormone-dependent coactivator binding to a hydrophobic cleft on nuclear receptors. **Science**, v. 280, n. 5370, p. 1747-1749, Jun 1998. ISSN 0036-8075.

12 XU, H. E. et al. Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors. **Molecular Cell**, v. 3, n. 3, p. 397-403, Mar 1999. ISSN 1097-2765.

13 ROEDER, R. G. Transcriptional regulation and the role of diverse coactivators in animal cells. **FEBS Letters**, v. 579, n. 4, p. 909-915, Feb 2005. ISSN 0014-5793.

14 YU, S.; REDDY, J. K. Transcription coactivators for peroxisome proliferator-activated receptors. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1771, n. 8, p. 936-951, Aug 2007. ISSN 0006-3002.

15 ZHANG, G. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma) agonist inhibits transforming growth factor-beta1 and matrix production in human dermal fibroblasts. **Journal of Plastic Reconstructive and Aesthetic Surgery**, v. 63, n. 7, p. 1209-1216, Jul 2010. ISSN 1748-6815.

16 LEE, J. W. et al. Transcriptional coregulators of the nuclear receptor superfamily: coactivators and corepressors. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 58, n. 2, p. 289-97, Feb 2001. ISSN 1420-682X.

17 Disponível em: <http://www.structuralbioinformatics.at> Acesso em: 12 Nov. 2011, Structural Bioinformatics.

18 MCKENNA, N. J.; O'MALLEY, B. W. Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. **Cell**, v. 108, n. 4, p. 465-74, Feb 2002. ISSN 0092-8674.

19 MORAS, D.; GRONEMEYER, H. The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. **Current Opinion in Cell Biology,** v. 10, n. 3, p. 384-391, Jun 1998. ISSN 0955-0674. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S095506749880015X >**.** Acesso em: 10 Out. 2011.

20 LEMPIÄINEN, H. et al. Antagonist- and inverse agonist-driven interactions of the vitamin D receptor and the constitutive androstane receptor with corepressor protein. **Molecular Endocrinology**, v. 19, n. 9, p. 2258-72, Sep 2005. ISSN 0888-8809.

21 PRIVALSKY, M. L. The role of corepressors in transcriptional regulation by nuclear hormone receptors. **Annual Review of Physiology,** v. 66, p. 315-60, 2004. ISSN 0066-4278.

22 GELMAN, L. et al. p300 interacts with the N- and C-terminal part of PPARgamma2 in a ligand-independent and -dependent manner, respectively. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 12, p. 7681-8, Mar 1999. ISSN 0021-9258.

23 BERBAUM, J.; HARRISON, R. K. Comparison of full-length versus ligand binding domain constructs in cell-free and cell-based peroxisome proliferator-activated receptor alpha assays. **Analytical Biochemistry**, v. 339, n. 1, p. 121-128, Apr 2005. ISSN 0003-2697.

24 MÉTIVIER, R. et al. Synergism between ERalpha transactivation function 1 (AF-1) and AF-2 mediated by steroid receptor coactivator protein-1: requirement for the AF-1 alpha-helical core and for a direct interaction between the N- and C-terminal domains. **Molecular Endocrinology**, v. 15, n. 11, p. 1953-70, Nov 2001. ISSN 0888-8809.

25 COMMITTEE, N. R. N. A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. **Cell**, v. 97, n. 2, p. 161-163, Apr 1999. ISSN 0092-8674.

26 MICHALIK, L. et al. International Union of Pharmacology. LXI. peroxisome proliferator-activated receptors. **Pharmacological Reviews**, v. 58, n. 4, p. 726-741, Dec 2006 . ISSN 0031-6997.

27 BELFIORE, A.; GENUA, M.; MALAGUARNERA, R. PPAR-gamma agonists and their effects on igf-i receptor signaling: implications for cancer. **PPAR Research**, v. 2009, p. 830501, 2009. ISSN 1687-4757.

28 BERGER, J.; MOLLER, D. E. The mechanisms of action of PPARs. **Annual Review of Medicine,** v. 53, p. 409-35, 2002. ISSN 0066-4219.

29 FEIGE, J. N. et al. From molecular action to physiological outputs: peroxisome proliferator-activated receptors are nuclear receptors at the crossroads of key cellular functions. **Progress in Lipid Research**, v. 45, n. 2, p. 120-59, Mar 2006. ISSN 0163-7827.

30 ISSEMANN, I.; GREEN, S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. **Nature**, v. 347, n. 6294, p. 645-50, Oct 1990. ISSN 0028-0836.

31 SERTZNIG, P. et al. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and the human skin: importance of PPARs in skin physiology and dermatologic diseases. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 9, n. 1, p. 15-31, 2008. ISSN 1175-0561.

32 SHER, T. et al. cDNA cloning, chromosomal mapping, and functional characterization of the human peroxisome proliferator activated receptor. **Biochemistry**, v. 32, n. 21, p. 5598-604, Jun 1993. ISSN 0006-2960.

33 DREYER, C. et al. Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. **Cell**, v. 68, n. 5, p. 879-87, Mar 1992. ISSN 0092-8674.

34 GREENE, M. E. et al. Isolation of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma cDNA: expression in hematopoietic cells and chromosomal mapping. **Gene Expression**, v. 4, n. 4-5, p. 281-99, 1995. ISSN 1052-2166.

35 SCHOONJANS, K.; STAELS, B.; AUWERX, J. The peroxisome proliferator activated receptors (PPARS) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1302, n. 2, p. 93-109, Jul 1996. ISSN 0006-3002.

36 AMRI, E. Z. et al. Cloning of a protein that mediates transcriptional effects of fatty acids in preadipocytes. Homology to peroxisome proliferator-activated receptors. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 5, p. 2367-2371, Feb 1995. ISSN 0021-9258.

37 SCHMIDT, A. et al. Identification of a new member of the steroid hormone receptor superfamily that is activated by a peroxisome proliferator and fatty acids. **Molecular Endocrinology**, v. 6, n. 10, p. 1634-41, Oct 1992. ISSN 0888-8809.

38 YOSHIKAWA, T. et al. Assignment of the human nuclear hormone receptor, NUC1 (PPARD), to chromosome 6p21.1-p21.2. **Genomics**, v. 35, n. 3, p. 637-8, Aug 1996. ISSN 0888-7543.

39 ZOETE, V.; GROSDIDIER, A.; MICHIELIN, O. Peroxisome proliferator-activated receptor structures: ligand specificity, molecular switch and interactions with regulators. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1771, n. 8, p. 915-25, Aug 2007. ISSN 0006-3002.

40 RICOTE, M.; GLASS, C. K. PPARs and molecular mechanisms of transrepression. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1771, n. 8, p. 926-935, Aug 2007. ISSN 0006-3002.

41 DESVERGNE, B.; WAHLI, W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. **Endocrine Reviews,** v. 20, n. 5, p. 649-88, Oct 1999. ISSN 0163-769X.

42 PALMER, C. N. et al. Novel sequence determinants in peroxisome proliferator signaling. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 27, p. 16114-21, Jul 1995. ISSN 0021-9258.

43 IJPENBERG, A. et al. Polarity and specific sequence requirements of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)/retinoid X receptor heterodimer binding to DNA. a functional analysis of the malic enzyme gene PPAR response element. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 32, p. 20108-20117, Aug 1997. ISSN 0021-9258.

44 TATA, J. R. Signalling through nuclear receptors. **Nature Reviews of Molecular Cell Biology**, v. 3, n. 9, p. 702-710, Sep 2002. ISSN 1471-0072.

45 CHANDRA, V. et al. Structure of the intact PPAR-gamma-RXR-alpha nuclear receptor complex on DNA. **Nature**, p. 350-356, Oct 2008. ISSN 1476-4687.

46 HENEKA, M. T.; LANDRETH, G. E. PPARs in the brain. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1771, n. 8, p. 1031-1045, Aug 2007. ISSN 0006-3002.

47 KOTA, B. P.; HUANG, T. H.; ROUFOGALIS, B. D. An overview on biological mechanisms of PPARs. **Pharmacology Research**, v. 51, n. 2, p. 85-94, Feb 2005. ISSN 1043-6618.

48 MICHALIK, L.; WAHLI, W. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in skin health, repair and disease. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1771, n. 8, p. 991-998, Aug 2007. ISSN 0006-3002.

49 GRIMALDI, P. A. Peroxisome proliferator-activated receptors as sensors of fatty acids and derivatives. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, n. 19-20, p. 2459-2464, Oct 2007. ISSN 1420-682X.

50 LALLOYER, F.; STAELS, B. Fibrates, glitazones, and peroxisome proliferator-activated receptors**. Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 30, n. 5, p. 894-899, May 2010. ISSN 1524-4636.

51 THORP, J. M.; WARING, W. S. Modification of metabolism and distribution of lipids by ethyl chlorophenoxyisobutyrate. **Nature**, v. 194, p. 948-949, Jun 1962. ISSN 0028-0836.

52 PERAZA, M. et al. The toxicology of ligands for peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR). **Toxicological Sciences**, v. 90, n. 2, p. 269-295, APR 2006 2006. ISSN 1096-6080.

53 FUKUEN, S. et al. Sulfonylurea agents exhibit peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonistic activity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 25, p. 23653-25659, Jun 2005. ISSN 0021-9258.

54 MUELLER, M.; BECK, V.; JUNGBAUER, A. PPARα activation by culinary herbs and spices. **Planta Medica**, v. 77, n. 5, p. 497-504, Mar 2011. ISSN 1439-0221.

55 HARMON, A. W.; HARP, J. B. Differential effects of flavonoids on 3T3-L1 adipogenesis and lipolysis. **American Journal of Physiology-**cell physiology, v. 280, n. 4, p. C807-C813, Apr 2001. ISSN 0363-6143.

56 LIANG, Y. C. et al. Suppression of inducible cyclooxygenase and nitric oxide synthase through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma by flavonoids in mouse macrophages. **FEBS Letters**, v. 496, n. 1, p. 12-18, May 2001. ISSN 0014-5793.

57 KURODA, M. et al. Phenolics with PPAR-gamma ligand-binding activity obtained from licorice (Glycyrrhiza uralensis roots) and ameliorative effects of glycyrin on genetically diabetic KK-A(y) mice. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 13, n. 24, p. 4267-4272, Dec 2003. ISSN 0960-894X.

58 AMBROSIO, A. L. et al. Ajulemic acid, a synthetic nonpsychoactive cannabinoid acid, bound to the ligand binding domain of the human peroxisome proliferator-activated receptor gamma. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 25, p. 18625-33, Jun 2007. ISSN 0021-9258.

59 BURSTEIN, S. PPAR-gamma: a nuclear receptor with affinity for cannabinoids. **Life Science**, v. 77, n. 14, p. 1674-1684, Aug 2005. ISSN 0024-3205.

60 SZNAIDMAN, M. L. et al. Novel selective small molecule agonists for peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPARdelta)--synthesis and biological activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 13, n. 9, p. 1517-21, May 2003. ISSN 0960-894X.

61 SHEARER, B. et al. Identification and characterization of a selective peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta (NR1C2) antagonist. **Molecular Endocrinology**, v. 22, n. 2, p. 523-529, Feb 2008. ISSN 0888-8809.

62 LUQUET, S. et al. Roles of peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPARdelta) in the control of fatty acid catabolism. a new target for the treatment of metabolic syndrome. **Biochimie**, v. 86, n. 11, p. 833-837, Nov 2004. ISSN 0300-9084.

63 BORDET, R. et al. PPAR: a new pharmacological target for neuroprotection in stroke and neurodegenerative diseases. **Biochemical Society Transactions**, v. 34, pt 6, p. 1341-1346, Dec 2006. ISSN 0300-5127.

64 IWASHITA, A. et al. Neuroprotective efficacy of the peroxisome proliferator-activated receptor delta-selective agonists in vitro and in vivo. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics,** v. 320, n. 3, p. 1087-96, Mar 2007. ISSN 0022-3565.

65 HAM, S. A. et al. PPARdelta promotes wound healing by up-regulating TGF-beta1-dependent or -independent expression of extracellular matrix proteins. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 14, n. 6B, p. 1747-1759, Jun 2010. ISSN 1582-4934.

66 YESSOUFOU, A.; WAHLI, W. Multifaceted roles of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) at the cellular and whole organism levels. **Swiss Medical Weekly**, v. 140, p. w13071, 2010. ISSN 1424-3997. DOI: 10.4414/smw.2010.13071.

67 VERRECCHIA, F.; MAUVIEL, A. Transforming growth factor-beta signaling through the Smad pathway: role in extracellular matrix gene expression and regulation. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 118, n. 2, p. 211-215, Feb 2002. ISSN 0022-202X.

68 MICHALIK, L. et al. Impaired skin wound healing in peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)alpha and PPARbeta mutant mice. **The Journal of Cell Biology**, v. 154, n. 4, p. 799-814, Aug 2001. ISSN 0021-9525.

69 TAN, N. S. et al. Critical roles of PPAR beta/delta in keratinocyte response to inflammation. **Genes Development**, v. 15, n. 24, p. 3263-3277, Dec 2001. ISSN 0890-9369.

70 SCHMUTH, M. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-beta/delta stimulates differentiation and lipid accumulation in keratinocytes. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 122, n. 4, p. 971-983, Apr 2004. ISSN 0022-202X.

71 KIM, H. J. et al. Transforming growth factor-beta1 is a molecular target for the peroxisome proliferator-activated receptor delta. **Circulation Research**, v. 102, n. 2, p. 193-200, Feb 2008. ISSN 1524-4571.

72 MICHALIK, L.; DESVERGNE, B.; WAHLI, W. Peroxisome-proliferator-activated receptors and cancers: complex stories. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 1, p. 61-70, Jan 2004. ISSN 1474-175X.

73 DESVERGNE, B.; MICHALIK, L.; WAHLI, W. Be fit or be sick: peroxisome proliferator-activated receptors are down the road. **Molecular Endocrinology**, v. 18, n. 6, p. 1321-1332, Jun 2004. ISSN 0888-8809.

74 SAUBERG, P. Identification and synthesis of a novel selective partial PPARä agonist with full efficacy on lipid metabolism in vitro and in vivo. **Journal of Medicine Chemistry**, n. 50, p. 1495-1503, 2007.

75 EHRENBORG, E.; KROOK, A. Regulation of skeletal muscle physiology and metabolism by peroxisome proliferator-activated receptor delta. **Pharmacological Reviews**, v. 61, n. 3, p. 373-393, Sep 2009. ISSN 1521-0081.

76 ARTIS, D. R. et al. Scaffold-based discovery of indeglitazar, a PPAR pan-active anti-diabetic agent. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 1, p. 262-267, Jan 2009. ISSN 1091-6490.

77 OYAMA, T. et al. Adaptability and selectivity of human peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) pan agonists revealed from crystal structures. **Acta Crystallographica D,** v. 65, pt 8, p. 786-795, Aug 2009. ISSN 1399-0047.

78 CIOCOIU, C. C. et al. Synthesis and dual PPARalpha/delta agonist effects of 1,4-disubstituted 1,2,3-triazole analogues of GW 501516. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 7, p. 3047-55, Jul 2010. ISSN 1768-3254.

79 WURTZ, J. M. et al. A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors. **Nature Structural Biology**, v. 3, n. 2, p. 206, Feb 1996. ISSN 1072-8368.

80 MARKT, P. et al. Pharmacophore modeling and parallel screening for PPAR ligands. **Journal of Computer-Aided Mol Design**, v. 21, n. 10-11, p. 575-590, Oct-Nov 2007. ISSN 0920-654X.

81 FYFFE, S. A. et al. Recombinant human PPAR-beta/delta ligand-binding domain is locked in an activated conformation by endogenous fatty acids. **The Journal of Molecular Biology**, v. 356, n. 4, p. 1005-1013, Mar 2006. ISSN 0022-2836.

82 BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-54, May 1976. ISSN 0003-2697.

83 ALEXANDROV, A. I. et al. Microscale fluorescent thermal stability assay for membrane proteins. **Structure**, v. 16, n. 3, p. 351-359, Mar 2008. ISSN 0969-2126.

84 GUIMARÃES, B. G. et al. The MX2 macromolecular crystallography beamline: a wiggler X-ray source at the LNLS. **Journal of Synchrotron Radiation**, v. 16, pt 1, p. 69-75, Jan 2009. ISSN 0909-0495.

85 OTWINOWSKI, Z.; MINOR, W. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. **Methods in Enzymology**, v. 276, p. 307-326, 1997.

86 MCCOY, A. J. et al. Phaser crystallographic software. **Journal of Applied Crystallography**, v. 40, pt 4, p. 658-674, Aug 2007. ISSN 0021-8898.

87 EMSLEY, P.; COWTAN, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. **Acta Crystallographica D**, v. 60, pt 12, p. 2126-2132, Dec 2004. ISSN 0907-4449.

88 ADAMS, P. D. et al. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. **Acta Crystallographica Section D**, v. 66, n. Pt 2, p. 213-21, Feb 2010. ISSN 1399-0047.

89 WALLACE, A. C.; LASKOWSKI, R. A.; THORNTON, J. M. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. **Protein Engineering Design and Selection**, v. 8, n. 2, p. 127-134, Feb 1995. ISSN 0269-2139.

90 KRIEGER, E.; KORAIMANN, G.; VRIEND, G. Increasing the precision of comparative models with YASARA NOVA - a self-parameterizing force field. **Proteins-Structure Function and Genetics**, v. 47, n. 3, p. 393-402, MAY 2002. ISSN 0887-3585.

91 BAIROCH, A. et al. The universal protein resource (UniProt). **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. Database issue, p. D154-9, Jan 2005. ISSN 1362-4962.

92 EGEA, P. F. et al. Effects of ligand binding on the association properties and conformation in solution of retinoic acid receptors RXR and RAR. **The Journal of Molecular Biology**, v. 307, n. 2, p. 557-576, Mar 2001. ISSN 0022-2836.

93 GARCIA, W. et al. Probing conformational changes in orphan nuclear receptor: the NGFI-B intermediate is a partially unfolded dimer. **Biophysical Chemistry**, v. 137, n. 2-3, p. 81-87, Oct 2008. ISSN 0301-4622.

94 SHARON, N. A life with lectins. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 62, n. 10, p. 1057-1062, May 2005. ISSN 1420-682X.

95 BILITY, M. T. et al. Ligand activation of peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta (PPAR beta/delta) inhibits chemically induced skin tumorigenesis. **Carcinogenesis**, v. 29, n. 12, p. 2406-2414, Dec 2008. ISSN 1460-2180.

96 Ligand activation of peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta and inhibition of cyclooxygenase-2 enhances inhibition of skin tumorigenesis. **Toxicological Science**, v. 113, n. 1, p. 27-36, Jan 2010. ISSN 1096-0929.

97 WAGNER, N. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor beta stimulation induces rapid cardiac growth and angiogenesis via direct activation of calcineurin. **Cardiovascular Research**, v. 83, n. 1, p. 61-71, Jul 2009. ISSN 1755-3245.

98 GAUDEL, C. et al. Pharmacological activation of PPARbeta promotes rapid and calcineurin-dependent fiber remodeling and angiogenesis in mouse skeletal muscle. **American Journal of Physiology-**endocrinology and metabolism, v. 295, n. 2, p. E297-304, Aug 2008. ISSN 0193-1849.

99 SUNDRIYAL, S.; BHARATAM, P. V. Important pharmacophoric features of pan PPAR agonists: common chemical feature analysis and virtual screening. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 9, p. 3488-3495, Sep 2009. ISSN 1768-3254.

100 SCHRÖDINGER, L. The PyMOL molecular graphics system, Version 1.3. Disponível em: <http://pymol.sourceforge.net/overview/index.htm>.

101 JAIN, E. et al. Infrastructure for the life sciences: design and implementation of the UniProt website. **BMC Bioinformatics**, v. 10, p. 136, 2009. DOI:10.1186/1471-2105-10-136

102 BRUNING, J. B. et al. Partial agonists activate PPARgamma using a helix 12 independent mechanism. **Structure**, v. 15, n. 10, p. 1258-1271, Oct 2007. ISSN 0969-2126.

103 SHI, G. Q. et al. Design and synthesis of alpha-aryloxyphenylacetic acid derivatives: a novel class of PPARalpha/gamma dual agonists with potent antihyperglycemic and lipid modulating activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, n. 13, p. 4457-4468, Jun 2005. ISSN 0022-2623.

104 XU, H. E. et al. Structural determinants of ligand binding selectivity between the peroxisome proliferator-activated receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 24, p. 13919-13924, Nov 2001. ISSN 0027-8424.

105 TAKADA, I. et al. Alteration of a single amino acid in peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPAR alpha) generates a PPAR delta phenotype. **Molecular Endocrinology**, v. 14, n. 5, p. 733-740, May 2000. ISSN 0888-8809.

106 WILLSON, T. M. et al. The PPARs: from orphan receptors to drug discovery. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 4, p. 527-550, Feb 2000. ISSN 0022-2623.

107 LI, Y.; LAMBERT, M. H.; XU, H. E. Activation of nuclear receptors: a perspective from structural genomics. **Structure**, v. 11, n. 7, p. 741-746, Jul 2003. ISSN 0969-2126.

108 NOLTE, R. T. et al. Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. **Nature**, v. 395, n. 6698, p. 137-143, Sep 1998. ISSN 0028-0836.