UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

Mario de Oliveira Neto

**Espalhamento de raios X a baixo ângulo aplicado ao estudo
estrutural de proteínas**

São Carlos – 2008

MARIO DE OLIVEIRA NETO

Espalhamento de raios X a baixo ângulo aplicado ao estudo estrutural de proteínas

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.

Orientação: Prof. Dr. Igor Polikarpov

Co-orientação: Prof. Dr. Aldo Félix Craievich

São Carlos – 2008

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 IFSC/USP

Oliveira Neto, Mario de

Espalhamento de raios X a baixo ângulo aplicado ao estudo estrutural de proteínas /Mario de Oliveira Neto; orientador Igor Polikarpov./ co-orientador Aldo Felix Craievich.-- São Carlos, 2008.

153p.

Tese (Doutorado em Ciências - Área de concentração: Física Aplicada – Opção Física Biomolecular) – Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo.

1. SAXS. 2.Receptores nucleares. 3. IL-22/IL-22R1. 4. ferredoxina. I. Título.

**UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO**
Instituto de Física de São Carlos

Caixa Postal 369
13560-970 São Carlos, SP
Av. Trabalhador São-carlense, 400,
13560-970 São Carlos, SP

Fone/Fax (16) 3373-9777
www.ifsc.usp.br
svposgrad@ifsc.usp.br

FOLHA DE APROVAÇÃO

Mario de Oliveira Neto

Tese apresentada ao 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.

Aprovado em: 26/09/2008

Comissão Julgadora

Prof. Dr. Igor Polikarpov

Instituição: IFSC/USP

Assinatura

Prof. Dr. Guinther Kellermann

Instituição: LNLS

Assinatura

Prof. Dr. José Ramon Beltran Abrego

Instituição: UNESP

Assinatura

Prof. Dr. Ricardo De Marco

Instituição: IFSC/USP

Assinatura

Prof. Dr. Luis Mauricio Trambaioli da Rocha e Lima

Instituição: UFRJ

Assinatura

DEDICATÓRIA

*A Pri, aos meu pais e irmãos, com todo
amor e carinho.*

AGRADECIMENTOS

Aos orientadores, prof. Igor Polikarpov, prof. Aldo Félix Craievich, prof. Yvonne Primerano Mascarenhas e Hannes Fischer, pela confiança, amizade e pelas aulas de SAXS; a Maria Auxiliadora dos Santos, Marcos Calgaro e Ana Carolina M. Figueira pelos ensinamentos no laboratório de bioquímica; a equipe da oficina mecânica do IFSC, sob coordenação de Carlos Nazareth Gonçalves que desenvolveram os projetos mecânicos solicitados para o equipamento de SAXS do IFSC; aos técnicos de raios X, José Augusto L. Rocha e José Geraldo Catarino; as técnicas do laboratório de Bioquímica Norma Bianca Saes e Susana Andrea Sculaccio; ao Michel Ballestero, aluno de iniciação científica, parceiro nos estudos de SAXS; ao Thiago Bueno (ICMC/USP) pelo programa de pré-tratamento de dados feito para o equipamento de SAXS do IFSC; ao Ronaldo Luiz Alonso pelas demonstrações matemáticas envolvidas no fenômeno de espalhamento; as pessoas que confiaram no meu trabalho, e que desenvolveram estreita colaboração: Douglas Machado (IQSC/USP), Tatiana Bastista (IQSC/USP), Carla Cristina Schmitt Cavalheiro (IQSC/USP), Caroline Migliorini Figueira (IFSC/USP), Wanius Garcia (IFSC/USP), Fabio de Lima Leite (Embrapa), Eliangela de Moraes Teixeira, José Ribamar S. F. Júnior (USP) e José Ramon Beltran Abrego (Ibílce/UNESP); aos professores, colegas de trabalho e funcionários do Departamento de Cristalografia; aos amigos Luis Maurício T. R. Lima (UFRRJ), Napoleão F. Valadares (IFSC/USP), Rodrigo Mello, Fabiano Mello, Carlos Castilho A. França e Helena Aguiar França. Aos amigos de longa data, Eric Marques Regadas, Renan Marques Regadas, Fabio Fuckuma, Emerson Ribeiro e Antônio Joaquim da Silva Neto. Em especial a família pelo constante apoio, meu pai Gilmar Andrade de Oliveira, minha mãe Cristina Dantas de Oliveira, meus irmãos Rodrigo Andrade de Oliveira e Luciana Dantas Di

Stéfano, Renato Di Stéfano, Lorenzo Di Stéfano, Cecília A. de Paula; aos meus padrinhos Shiguero Takai e Leomar Leite Takai, a minha futura esposa Priscila Maziero. e seus pais Alcides Antônio Maziero (Alemão) e Sonia Regina Maziero. Muito obrigado!!! Todos vocês estão comigo...

*“Não convém a gente levantar escândalo de começo:
só aos poucos é que o escuro é claro”*

(Guimarães Rosa)

Resumo

O espalhamento de raios X a baixo ângulo tem se mostrado uma poderosa ferramenta na análise estrutural de proteínas em solução. Estudos em condições próximas ao estado nativo podem ser realizados, permitindo a visualização tridimensional de proteínas ou complexos formados. A tese apresentada aborda a teoria envolvida para utilização desta ferramenta. Uma nova metodologia foi proposta para a determinação da massa molecular de proteínas em solução, utilizando apenas uma curva de SAXS em unidades arbitrárias, visto que até o momento, este procedimento era realizado em comparação com outra proteína padrão de peso molecular conhecido. Com relação à instrumentação científica, um equipamento de SAXS foi desenvolvido no Instituto de Física de São Carlos, permitindo agora que medidas de SAXS em proteínas em solução sejam realizadas no instituto. Clonagem, expressão e purificação foram realizadas para o domínio de ligação ao DNA da isoforma β do receptor tireoideano humano, a caracterização experimental desta proteína foi realizada por anisotropia de fluorescência, crosslink e SAXS. Após formação do complexo DNA-proteína, F2-DBD hTR β , o mesmo foi submetido a cristalização, os cristais obtidos para o complexo não apresentaram padrão de difração e modelos de baixa resolução foram gerados utilizando SAXS. Além disso, estudos de baixo ângulo foram realizados linha de SAXS do LNLS para a enzima ferredoxina redutase *de leptospira interrogans* e para o complexo formado por interleucina-22 e pelo receptor interleucina-22, sendo seus modelos tridimensionais resolvidos.

Palavras-Chave: SAXS. receptores nucleares. IL-22/IL-22R1. ferredoxina.

ABSTRACT

Small angle X-ray scattering has been proven to be a powerful tool in the structural analysis of proteins in solution. This technique permits the three-dimensional visualization of native protein's envelop at the level of nanometers. In this study we discuss the small angle X-ray scattering theory and we proposed a new methodology to determine the molecular weight of proteins in solution, using only SAXS curve in arbitrary units. Prior the development of this method, the protein's molecular weighs were calculated by comparison with another of known size, usually bovine serum albumin. We also assembled SAXS equipment at the Physics Institute of São Carlos, which will permits in house measurements; as well as the cloning, expression and purification of DBD hTR β , followed by the characterization of this protein by fluorescence anisotropy, crosslink and SAXS. The DNA-protein complex, F2-DBD hTR β , was subjected to crystallization assays. Although, the crystals obtained for the complex showed no pattern of diffraction we were able to generate low-resolution models for the F2-DBD hTR using SAXS analysis. Moreover, the studies of the protein LepFNR and the complex IL-22/IL-22R1 by small angle X-ray scattering were performed in the line of SAXS of the LNLS, and their three-dimensional models were resolved.

Keywords: SAXS. nuclear receptor. IL-22/IL-22R1. ferredoxin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - visão esquemática do espalhamento de raios X por elétrons livres. Um elétron está localizado na origem O na qual um feixe monocromático, paralelo e polarizado de raios X é incidente.....	22
Figura 1.2 - visão esquemática do espalhamento de raios X por um elétron sobre a ação de um feixe não polarizado. O elétron localizado na origem O na qual um feixe de raios X paralelo, monocromático e não polarizado é incidente na direção Ox . O campo incidente tem uma componente paralela ao plano OXp , $E_{//}$, e outra perpendicular a este plano, $E_{\perp}$	23
Figura 1.3 - visão esquemática do espalhamento de raios X por um par de elétrons. (A). Um elétron está localizado na origem e o outro a uma distância $\vec{r}$. Existe uma diferença ($AB + BC$) no caminho óptico entre os dois feixes espalhados, causando uma diferença de fase. (B). Relação geométrica entre os vetores $\vec{B}_1$, $\vec{B}_0$, e $\vec{q}$	25
Figura 1.4 - Lei da reciprocidade entre espaços real e recíproco. Duas esferas com densidade eletrônica constante $\rho(\vec{r})$ e raios R_1 e R_2 sofrendo a ação do mesmo feixe de raios X. As intensidades são normalizadas por $I(0)$	28
Figura 1.5 - Representação esquemática para a amplitude de espalhamento. Carbono (linha azul) e oxigênio (linha vermelha).....	29
Figura 1.6 - Intensidades de espalhamento e função de distribuição de distâncias para diferentes objetos geométricos. Figura extraída de (SVERGUN, KOCH, 2003).	38
Figura 1.7 – Representação esquemática de uma proteína em solução.....	45
Figura 3.1 - Esquema do equipamento de SAXS do IFSC. 1. Gerador de Raios X; 2. monocromador; 3. Fendas horizontal e vertical, o equipamento possui duas caixas de fendas espaçadas de 1 metro; 4. Tubo evacuado de 1 metro de comprimento; 5 Fenda horizontal (parasita); 6. Porta-amostra; 7. caminho de vácuo; 8. Bloqueador do feixe direto; 9. Detector unidimensional sensível a posição.....	51
Figura 3.2 - Visão geral do monocromador.....	53
Figura 3.3 - Sistema de colimação. (A) Visão geral do sistema de colimação. (B) Visão frontal da caixa das fendas 1 e 2. (C) Visão frontal da fenda 3 (fenda parasita).	54
Figura 3.4 – Porta-amostra.....	55
Figura 3.5 - Caminho de vácuo e bloqueador do feixe direto. (A) visão geral do caminho de vácuo. (B) O bloqueador do feixe direto encontra-se em frente a janela de saída dos fótons espalhados, o bloqueador pode ser movimentado com a ajuda de um micrômetro.	56
Figura 3.6 - Sistema de detecção unidimensional sensível a posição.	57
Figura 3.7 - esquema demonstrando a geometria de feixe linha com detector unidimensional. A altura do feixe, assim como a janela do detector causam deformação na curva de SAXS.	60
Figura 3.8 - Monocromador otimizado para o Cobre. (A) visão lateral da caixa do espelho monocromador. (B) visão superior da caixa do espelho monocromador.	63

Figura 3.9 - Cella do porta-amostra com câmara para exposição de filmes de raios X para verificação do alinhamento do porta-amostra.	63
Figura 3.10 - Perfil Trapezoidal do feixe de raios X.	64
Figura 3.11 - Imagens do feixe de raios X obtidas durante o alinhamento do equipamento. Na imagem da esquerda verificamos o feixe branco contendo todos os comprimentos de onda de raios X do Cu e o feixe com comprimento de onda do K_{α} do Cu. Na imagem da direita, temos somente o feixe K_{α} do Cu, após o fechamento da fenda de saída da câmara do espelho monocromador.	66
Figura 3.12 - (A) Cella do porta-amostra, e câmara para exposição de filme. (B) Filme de raios X demonstrando o perfil do feixe na posição do porta-amostra.	67
Figura 3.13 - Medida experimental do perfil da altura do feixe de raios X, obtido no plano de detecção.	68
Figura 3.14 - Intensidade de espalhamento em função do vetor de espalhamento q . (A) BSA medida a distância de 339 mm. (B) ferredoxina medida a distância de 739 mm.	69
Figura 3.15 - (A) Curvas de espalhamento corrigidas pelo efeito de deformação de ferredoxina a 5 mg/mL (B) Função de distribuição de distâncias para ferredoxina obtidas no IFSC. Pontos com barras de erros são os dados experimentais corrigidos pelo efeito de deformação da curva e a linha azul é o espalhamento simulado para o monômero de ferredoxina pdb id:2RC5	70
Figura 3.16 - Principais componentes da linha de SAXS do LNLS. (1) espelho para focalização vertical do feixe; (2) cristal de silício para monocromatização e focalização horizontal do feixe; (3) sistema de colimação; (4) porta-amostra; (5) detector de raios X. Uma visão lateral do equipamento é mostrada na parte superior da figura e outra visão superior do equipamento é mostrada na parte inferior da figura (KELLERMAN et al, 1997).	72
Figura 4.1 - Volume calculado para esferas de diferentes R_g ($V = 4/3\pi R^3$) contra o volume calculado pela relação $2\pi^2 I(0)/Q$ a partir das curvas de $I(q)$ calculadas para estas esferas. A equação 45 foi calculada para diferentes $q_{\max}$. Os intervalos mostrados vão de $1 \times 10^3 \text{ \AA}^3 \leq V \leq 10^6 \text{ \AA}^3$ e $0.1 \text{ \AA}^{-1} \leq q_{\max} \leq 0.9 \text{ \AA}^{-1}$	78
Figura 4.2 - Volume calculado com o programa Crysol para as 1148 proteínas do PDB em função do volume calculado a partir das curvas simuladas de SAXS para as mesmas 1148 proteínas utilizando a relação $2\pi^2 I(0)/Q$ para diferentes valores de $q_{\max}$. Os valores são mostrados em intervalos de $q_{\max}$. 0.2, 0.3 e $0.4 \text{ \AA}^{-1}$. A linha tracejada representa o volume esperado para as proteínas.	79
Figura 4.3 - Coeficientes obtidos a partir da reta obtida na figura 4.2 (A) coeficiente linear contra o valor de $q_{\max}$ (B) coeficiente angular contra o valor de $q_{\max}$	79
Figura 4.4 - (A) Intensidade de espalhamento para Ferredoxina. (B) Intensidade vezes (q^2) para Ferredoxina. Os dados experimentais são dados em pontos e o ajuste do Gnom extrapolado a $q=0$ em linha preta.	80
Figura 4.5 - Razão entre a massa molecular real (MM_{real}) e calculada ($MM_{\text{calculado}}$) contra a massa molecular do oligômero (MM_{real}) para 25 proteínas estudadas.	83
Figura 5.1 - Ilustração esquemática do RXR DBD.	86
Figura 5.2 - Elementos de resposta a receptores nucleares.	89

Figura 5.3 - Eletroforese em 1% gel de agarose (BioRad) para visualização do produto da reação de digestão com as enzimas de restrição <i>NdeI</i> e <i>XhoI</i> .	108
Figura 5.4 - Eletroforese em 1% gel de agarose (BioRad) para visualização do produto da reação de PCR.	109
Figura 5.5 - SDS PAGE, expressão em função do tempo de indução. (1) <i>MM</i> , (2) T_0 Indução, (3) 1 hora (4) 2 horas (5) 3 horas (6) 4 horas (7) 5 horas.	109
Figura 5.6 - SDS PAGE - Lise celular (1) <i>MM</i> , (2) extrato lisado, (3) pellet. A seta preta indica o His ₆ DBD hTR β (15.3 KDa).	110
Figura 5.7 - SDS PAGE - cromatografia de afinidade (1) <i>MM</i> , (2) extrato, (3) 1ª Lavagem 10 mM Imidazol(4) 2ª Lavagem 10 mM Imidazol (5) 3ª Lavagem 10 mM Imidazol (6) Eluição 3 vc 250 mM Imidazol (7) Eluição 3 vc 500 mM Imidazol (8) Eluição 3 vc 500 mM Imidazol. A seta preta indica o His ₆ DBD-hTR β (15.3 KDa).	111
Figura 5.8 - Curva de calibração da Superdex 75 HL 26/60.	112
Figura 5.9 - Eluição isocrática do His ₆ -DBD hTR β , perfil medido a 280 nm.	112
Figura 5.10 - SDS PAGE do his ₆ DBD-hTR β após purificação por exclusão molecular: (1) padrão de <i>MM</i> (2)his ₆ DBD-hTR β .	113
Figura 5.11 - SDS PAGE - Digestão com trombina bovina (1) padrão de <i>MM</i> (2) T_0 (3) 1 hora (4) 2 horas (5) 3 horas (6) 4 horas.	114
Figura 5.12 - Anisotropia de fluorescência do DBD hTR β . A anisotropia é visualizada em função da concentração da proteína.	114
Figura 5.13 – Determinação da concentração de DSS utilizado na reação de crosslinking. 130 μ M de DBD hTR β reagiram com diferentes concentrações de DSS e as amostras foram resolvidas por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 15%. As concentrações finais de DSS, em mM, estão indicadas nas figuras. Os gel foi corado com Coomassie blue.	115
Figura 5.14 - <i>Crosslink</i> químico de DBD hTR β em concentrações de 2 – 130 μ M com 2.5 mM de DSS e as amostras foram resolvidas por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 15%. As concentrações finais de DBD hTR β em μ M, estão indicadas nas figura. O gel foi corado com Prata.	116
Figura 5.15 - Curva experimental de SAXS do DBD hTR β a 40 μ M com ajuste do programa Oligomer (KONAREV et al, 2003).	117
Figura 5.16 - Gel Nativo da reação de ligação com DNA (1) padrão de pesos moleculares, (2) DBD-hTR β (3) DNA F2 (3) DBD-hTR β . Após eletrofores, proteína e DNA podem ser visualizados no mesmo ponto no gel, o DNA em excesso pode ser visualizado mais abaixo no gel.	117
Figura 5.17 - Micro cristais obtidos em condições de cristalização (Hampton Research HR2-116). a.(0.05 M de Cacodilato de Sódio, pH 6.5, 0.08 M Acetato deMagnésio, 30% w/v PEG-4000) b.(0.05 MES, pH 5.6, 0.1 M Sulfato de Amônio, 0.01 M MgCl ₂ , 20% w/v PEG-8000).	122
Figura 5.18 - Curva de espalhamento em solução do hTR β DBD ligado ao elemento responsivo F2 e resultados de procedimento de ajuste. Curva experimental (pontos com barras de erro);	

intensidade de espalhamento para os DAMs (Gasbor) (linha azul clara); intensidade de espalhamento para o complexo em alta resolução (linha amarela). O inserto contém o gráfico de Guinier ($\ln I$ versus q^2).....	123
Figura 5.19 - Função de distribuição de distância evoluída a partir da curva de espalhamento do complexo hTR β DBD ligado ao F2.	124
Figura 5.20 - Sobreposição do modelo de átomos dummy (DAM) com o modelo proposto em alta resolução. Os modelos são rotados 90° em relação aos eixos x e y.	125
Figura 6.1 - Curva experimental de SAXS de LepFNR e ajuste teórico com modelo cristalográfico. Curva experimental de SAXS (círculos com barra de erros); intensidade de espalhamento simulado a partir da DAM (linha verde); intensidade de espalhamento simulado a partir do monómero cristalográfico de LepFNR (pdb id: 2RC5) (linha azul). O inserto contém o gráfico de guinier, do qual foi calculado o R_g	129
Figura 6.2 – Comparação da função de distribuição de distâncias para LepFNR. As $p(r)$ foram calculadas com o programa Gnom a partir dos dados experimentais (círculos com barra de erros); a partir do DAM (linha verde); a partir do monómero cristalográfico de LepFNR (pdb id: 2RC5) (linha azul).	130
Figura 6.3 – Visão <i>stereo</i> mostrando a superposição do monómero cristalográfico de LepFNR com o modelo obtido <i>ab initio</i> por SAXS. A imagem superior foi rotacionada 90 ° em torno dos eixos x (centro) e y (inferior).	131
Figura 6.4 – (A) Estrutura cristalográfica de IL-22 (pdb id:1M4R). (B) Estrutura cristalográfica de IL-10 (pdb id: 1J7V).	133
Figura 6.5 - Estrutura cristalográfica do complexo IL-10/IL-10R1 (pdb id:1J7V).	134
Figura 6.6 - Curva de espalhamento experimental de IL-22/IL-22R1 ($\log I$ contra q) e resultados de procedimento de ajuste. O inserto contém o gráfico de Guinier ($\log I$ versus q^2). Curva experimental após a subtração da constante de Porod (círculo com barra de erros); intensidade de espalhamento simulado para o DAM (Dammin) (linha verde); intensidade de espalhamento simulado para o modelo de corpo rígido (linha azul); intensidade de espalhamento simulado para o IL-10/IL-10R1 (pdb id: 1J7V) (linha vermelha).	136
Figura 6.7 - Função de distribuição de distâncias para os dados experimentais de IL-22/IL-22R1 (círculos com barras de erros); para o modelo de corpo rígido (linha azul); e para IL-10/IL-10R1 (linha vermelha).	137

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 - Parâmetros responsáveis pelo efeito de deformação nas curvas de SAXS.	69
Tabela 3.2 - parâmetros estruturais da ferredoxina obtidos por SAXS em comparação com Ferredoxina cristalográfico.	71
Tabela 4.1 - Volume, MM calculados e razão entre MM calculado e esperado (34.4 kDa) utilizando vários valores de $q_{\text{máx}}$ para ferredoxina.	81
Tabela 4.2 - Volume, MM calculados e razão utilizando vários valores de q_{max} para as 25 proteínas estudadas. Os resultados são mostrados em ordem crescente de MM.	81
Tabela 5.1 - oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação ds gene DBD hTR β	91
Tabela 5.2 - Reagentes utilizados na reação de PCR.	91
Tabela 5.3 - Protocolo do programa de PCR (com “Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity”) utilizado pelo termociclador PTC-100 TM Programable Thermal Controller.	92
Tabela 5.4 - Reagentes usados na reação de adição de dATP no gene DBD hTR β	93
Tabela 5.5 - Reagentes usados na reação de ligação do fragmento do DBD hTR β adenilado no vetor pGEM [®] -T (Promega).	93
Tabela 5.6 - Reagentes utilizados nas reações de clivagem.	95
Tabela 5.7 - Reagentes usados nas reações de clivagem (NdeI e XhoI).	95
Tabela 5.8 - Reagentes utilizados na reação de ligação com T ₄ DNA Ligase (Invitrogen).	96
Tabela 5.9 - condição de cristalização dos complexos de DBDs dos receptores nucleares e seus elementos responsivos.	119
Tabela 5.10 - condição do poço - 20 mM Hepes, PEG 3350 w/v 15-50%, pHs 6.5 – 8.0.	121
Tabela 5.11 - Parâmetros estruturais do complexo F2 DBD hTR β	123
Tabela 6.1 – Parâmetros estruturais da LepFNR.	132
Tabela 6.2 – Parâmetros estruturais da IL-22/IL-22R1.	139

LISTA DE ABREVIATURAS

AF-1 - função de ativação 1

BSA – albumina de soro bovino

DAM – modelo de átomos *dummy*

DBD – domínio de ligação ao DNA

DBD hTR β - domínio de ligação ao DNA da isoforma β do receptor tireoideano humano

D_{máx.} – diâmetro máximo

DMSO – sulfoxido de dimetil

DR – repetição direta

DSS – succinimidil

DTT - Ditioiodotreitól

ER – receptor do estrogênio

F2 – Palíndromo invertido espaçado por 6 pares de base

FITC – Isotiocianato de fluoresceína

GR – receptor de glucocorticóide

HREs – elementos responsivos dos hormônios

IL-22/IL-22R1 – interleucina 22/receptor 1 de interleucina 22

IPTG - Isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo

LBD – domínio de ligação ao ligante

LB – Meio de cultura c

LepFNR – ferredoxina de *Leptospira interrogans*

MM – massa molecular

NGFI-B – proteína B induzida pelo fator de crescimento neural

PCR – reação de polimerização em cadeia

PDB – banco de dados de proteínas

PPAR - receptor ativador da proliferação de peroxissomos

PSD 1D – detector unidimensional sensível a posição

PTC – controle de temperatura programável

RAR – receptor do ácido retinóico

R_g – raio de giro

RXR – receptor do ácido retinóico X

SAXS – espalhamento de raios X a baixo ângulo

TR – receptor tireoideano

TREs – elementos responsivos do T_3

V - volume

VDR – receptor de vitamina D

SUMÁRIO

1 Teoria de espalhamento de raios X a baixo ângulo aplicado ao estudo estrutural de proteínas.....	20
1.1 Princípios do espalhamento de raios X.....	21
1.1.1 Espalhamento de raios X por elétrons livres.....	21
1.1.2. Espalhamento de raios X por dois elementos de volume, interferência.....	25
1.1.3 Lei da reciprocidade.....	27
1.1.4 O problema de fase.....	28
1.1.5 Espalhamento de raios X por um átomo.....	29
1.1.6 Espalhamento de raios X para um grupo de n átomos.....	30
1.1.7. Transformada inversa da função Intensidade.....	30
1.1.8 Espalhamento para sistemas diluídos.....	32
1.1.9 Redefinição da função de correlação.....	35
1.1.10 Sistema isotrópico, diluído e monodisperso.....	36
1.2 Análises das curvas de SAXS.....	38
1.2.1 Região dos menores q_s na curva de SAXS, determinação do raio de giração.....	39
1.2.2 Região central da curva de SAXS, determinação do volume.....	39
1.3 Análises de proteínas em solução utilizando SAXS.....	41
1.3.1 Reconstrução ab-initio da forma da proteína a partir de dados de SAXS.....	41
1.3.2 Cálculo de intensidade de SAXS a partir das coordenadas atômicas.....	44
2 Objetivos do trabalho.....	47
3 Instrumentação para o espalhamento de raios X a baixo ângulo.....	49
3.1 Equipamento de SAXS do Instituto de Física da USP de São Carlos.....	49
3.1.1 Introdução.....	50
3.1.1.1 Descrição detalhada dos componentes do equipamento.....	52
3.1.1.2 Efeito de deformação da curva de intensidade de SAXS (smearing).....	58
3.1.2 Metodologia.....	62
3.1.2.1 Alinhamento do equipamento.....	62
3.1.2.2 Efeito de deformação da curva de intensidade de SAXS (smearing).....	64
3.1.2.2.1 Medida dos parâmetros do feixe.....	64
3.1.2.3 Experimentos para caracterização do equipamento.....	65
3.1.3 Resultados.....	66
3.1.3.1 Alinhamento do equipamento.....	66
3.1.3.2 Correção da deformação da curva de intensidade de SAXS.....	68
3.1.3.3. Experimento padrão para caracterização do equipamento.....	69
3.2 Linha de SAXS do Laboratório Nacional de Luz Sincrotron.....	72
4 Procedimento e resultados de determinação do estado oligomérico de proteínas em solução utilizando SAXS em escala relativa.....	74
4.1 Introdução.....	75
4.2 Metodologia.....	75
4.3 Resultados.....	77
4.4 Conclusão.....	83
5 Caracterização do domínio de ligação ao DNA da isoforma β do receptor tireoideano (DBD hTR β).....	84
5.1 Introdução.....	85

5.1.1 Os receptores nucleares.....	85
5.1.1.1 Detalhes da ligação do DBD aos elementos responsivos do DNA	86
5.1.1.2 Os Receptores Tireoideanos	89
5.2 Metodologia.....	90
5.2.1 Sub-clonagem do fragmento de DNA codificador do DBD hTR β	90
5.2.2 Expressão do DBD hTR β em células competentes de Escherichia coli BL21(DE3).....	98
5.2.3 Purificação do domínio de ligação ao DNA do Receptor Tireoideano Isoforma β	99
5.2.3.1 Cromatografia por afinidade do domínio DBD do hTR β	99
5.2.3.2 Cromatografia por exclusão molecular	100
5.2.4 Digestão com trombina bovina	100
5.2.5 Anisotropia de Fluorescência.....	101
5.2.6 Crosslink Químico	101
5.2.7 SAXS do DBD hTR β	103
5.2.8 Ligação do DBD hTR β no elemento responsivo F2	104
5.2.9 Ensaio de cristalização do DBD hTR β	104
5.2.10 SAXS do complexo F2-DBD hTR β	105
5.3 Resultados.....	107
5.3.1 Sub-clonagem do fragmento de DNA codificador do DBD hTR β	107
5.3.1.1 Sub-clonagem do fragmento de DNA codificador do DBD hTR β no vetor pGEM [®] -T	107
5.3.1.2 Sequenciamento do fragmento DBD hTR β	108
5.3.1.3 Transformação em células competentes de Escherichia coli BL21(DE3)	108
5.3.2 Expressão do DBD hTR β em células competentes de Escherichia coli BL21(DE3).....	109
5.3.3 Purificação do domínio de ligação ao DNA do Receptor Tireoideano Isoforma β	110
5.3.3.1 Cromatografia por afinidade do DBD hTR β	110
5.3.3.2 Cromatografia por exclusão molecular	111
5.3.4 Digestão com trombina bovina	113
5.3.5 Anisotropia de Fluorescência.....	114
5.3.6 Crosslink Químico	115
5.3.7 SAXS do DBD hTR β	116
5.3.8 Ligação do DBD hTR β no elemento responsivo F2	117
5.3.9 Estudos de cristalização do complexo DBD hTR β ligado ao elemento responsivo F2	118
5.3.10 SAXS do F2 DBD hTR β	122
5.4 Conclusão	125
6 Estudos por SAXS de ferredoxina-FAD e do complexo formado por interleucina-22 e interleucina-22R1	126
6.1 Estrutura de baixa resolução de ferredoxina de Leptospira interrogans.....	127
6.1.1 Introdução	127
6.1.2 Metodologia.....	128
6.1.3 Resultados e Discussão	129
6.1.4. Conclusão	132
6. 2 Estrutura de baixa resolução do complexo IL-22/IL-22R1	133
6.2.1 Introdução	133
6.2.2 Metodologia.....	134
6.2.2.1 Análise dos dados de SAXS	134
6.2.2.2 Modelagem de corpo rígido do complexo IL-22/IL-22R1.....	135
6.2.3 Resultados e discussão	136
6.2.4 Conclusão	139
Referências	140
Anexo 1. Lista de trabalhos publicados durante o período.	151
Anexo 2 – Publicações descritas na tese.....	153

1 Teoria de espalhamento de raios X a baixo ângulo aplicado ao estudo estrutural de proteínas.

Resumo

A determinação da estrutura terciária e quaternária de proteínas em solução é um importante passo para completa caracterização da amostra em estudo. A interpretação de dados de SAXS - espalhamento de raios X a baixo ângulo permite uma análise detalhada da estrutura global de proteínas, as quais podem ter seu tamanho variável entre poucos kDa e muitos MDa. A determinação direta do envelope molecular, a predição de estruturas quaternárias em oligômeros, a verificação de transições conformacionais que ocorrem por interação com ligantes, assim como, a visualização de processos de enovelamento e desenovelamento protéico (SVERGUN; KOCH, 2003) podem ser realizadas com SAXS (SVERGUN et al, 1996). Com o empacotamento cristalográfico, perdemos a informação exata a respeito da estrutura quaternária de uma proteína. Uma ligeira mudança na posição relativa dos domínios, ou subunidades, pode ser melhor visualizada próximo ao estado nativo, utilizando SAXS. Neste tipo de experimento, uma solução de macromoléculas é exposta aos raios X. A intensidade espalhada $I(q)$ é função da transferência de momento q . O capítulo a seguir explana detalhadamente a teoria envolvida em SAXS, o mesmo foi sintetizado no capítulo *Simulated Annealing of Two Electron Density Solution Systems*, aceito para publicação no livro *Global Optimization: Focus on Simulated Annealing*, I-Tech Education and Publishing KG.

1.1 Princípios do espalhamento de raios X.

1.1.1 Espalhamento de raios X por elétrons livres.

O uso dos raios X na caracterização estrutural de materiais depende essencialmente de sua interação com a matéria através dos elétrons que constituem seus átomos e moléculas. Os elétrons são sensíveis aos campos, elétrico e magnético oscilando senoidalmente. Se a radiação incidente é monocromática, os campos, elétrico e magnético podem ser representados por uma função periódica do tipo:

$$\vec{E} = \vec{E}_0 \cos 2\pi\omega t \quad (1)$$

$$\vec{H} = \vec{H}_0 \cos 2\pi\omega t$$

onde $\vec{E}_0$ e $\vec{H}_0$ são respectivamente os valores máximos dos campos elétricos e magnéticos e ω é a frequência da radiação.

A direção da propagação dos raios X é dada pelo vetor de Poynting: $\vec{P} = (c/4\pi)\vec{E} \times \vec{H}$. Considerando-se um elétron situado na origem de um sistema de coordenadas xyz, sobre o qual incide um feixe paralelo, polarizado e monocromático de raios X. (figura 1.1). O elétron sob a ação do campo elétrico $\vec{E}_0$ da onda incidente sofre a ação de uma força dada por:

$$\vec{F} = e\vec{E}_0 \cos 2\pi\omega t \quad (2)$$

Figura 1.1 - visão esquemática do espalhamento de raios X por elétrons livres. Um elétron está localizado na origem O na qual um feixe monocromático, paralelo e polarizado de raios X é incidente.

Sob a ação dessa força o elétron é acelerado

$$\vec{a} = \frac{\vec{F}}{m} = \frac{e\vec{E}_0}{m} \cos 2\pi\omega t \quad (3)$$

em decorrência desta aceleração o elétron torna-se uma fonte esférica de ondas eletromagnéticas de mesma frequência que a radiação incidente (espalhamento elástico). O espalhamento produzido pelo elétron foi analisado por J. J. Thomson, o qual determinou que:

$$E = \frac{ea \sin \phi}{4\pi R \epsilon_0 c^2} \quad (4)$$

Substituindo a equação 3 em 4 temos:

$$E = \frac{e^2 E_0}{m} \cos 2\pi\omega t \frac{\sin \phi}{4\pi R \epsilon_0 c^2} \quad (5)$$

onde ϕ é o ângulo entre a direção do feixe espalhado e a direção do campo elétrico da onda incidente, ϵ_0 é a constante dielétrica do vácuo, R é a distância entre o elétron e o ponto de observação, c é a velocidade da luz, e m e e são respectivamente, a massa e carga do elétron. A

expressão $\frac{e^2}{4\pi\epsilon_0 c^2 m}$ tem a dimensão de comprimento e, de acordo com o eletromagnetismo clássico, é denominada comprimento de espalhamento ou “raio” do elétron ($2.82 \cdot 10^{-15} m$). Para simplificar a notação a amplitude da onda espalhada por um elétron livre será designada apenas por A_e .

$$A_e = \frac{e^2}{4\pi\epsilon_0 c^2 m} \quad (6)$$

Para o caso do feixe incidente não polarizado, considerara-se o campo elétrico do feixe incidente decomposto em duas componentes iguais mutuamente perpendiculares. Na figura 1.2 temos um feixe não polarizado paralelo propagando-se na direção Ox incidindo sobre um elétron situado em O . Para determinar a natureza do campo elétrico espalhado na direção OP , o campo elétrico incidente pode ser decomposto em duas componentes mutuamente perpendiculares, uma paralela ao plano $OX P$, $E_{//}$, e outra perpendicular, $E_{\perp}$.

Figura 1.2 - visão esquemática do espalhamento de raios X por um elétron sobre a ação de um feixe não polarizado. O elétron localizado na origem O na qual um feixe de raios X paralelo, monocromático e não polarizado é incidente na direção Ox . O campo incidente tem uma componente paralela ao plano $OX P$, $E_{//}$, e outra perpendicular a este plano, $E_{\perp}$.

Sob a ação desses dois campos o elétron adquire uma aceleração com componentes perpendicular e paralela dadas respectivamente por $a_{\perp} = eE_{\perp} / m$ e $a_{\parallel} = eE_{\parallel} / m$. Substituindo estas expressões na equação 5, obtemos o campo elétrico da onda espalhada:

$$E_{\perp}' = \frac{e^2 E_{\perp}}{4\pi\epsilon_0 R c^2 m} = \frac{A_e E_{\perp}}{R} \quad (7)$$

$$E_{\parallel}' = \frac{e^2 E_{\parallel} \cos 2\theta}{4\pi\epsilon_0 R c^2 m} = \frac{A_e E_{\parallel} \cos 2\theta}{R}$$

a intensidade I_0 do feixe incidente pode também ser decomposta em duas componentes iguais perpendicular e paralela, respectivamente proporcionais a $E_{\perp}^2$ and $E_{\parallel}^2$:

$$E_{\parallel}^2 = E_{\perp}^2 \propto \frac{I_0}{2} \quad (8)$$

E a intensidade total espalhada no ponto P será dada por:

$$I(2\theta) = [E_{\parallel}'^2 + E_{\perp}'^2] \quad (9)$$

$$I(2\theta) = \frac{I_0}{R^2} \left(\frac{e^2}{4\pi\epsilon_0 c^2 m} \right)^2 \frac{(1 + \cos^2 2\theta)}{2}$$

$$I(2\theta) = \left(\frac{I_0}{R^2} \right) (A_e)^2 \frac{(1 + \cos^2 2\theta)}{2}$$

Levando-se em conta ainda que I_0 e R podem ser considerados constantes durante a medida, a intensidade espalhada pelo elétron dada por:

$$I_e(R, 2\theta) = A_e^2 \frac{(1 + \cos^2 2\theta)}{2} \quad (10)$$

Pode-se observar pelas equações 6 e 9 que apenas os elétrons contribuem efetivamente para a intensidade espalhada, pois a mesma varia inversamente com o quadrado da sua massa. Por essa razão, embora os núcleos atômicos também sejam carregados e, portanto, também

sofram a ação do campo elétrico da onda incidente, sua massa é muito maior que a dos elétrons (massa do próton = 1837 vezes a massa do elétron) e sua contribuição para a intensidade total é desprezível. O termo $(1 + \cos^2 2\theta)/2$ é chamado fator de polarização, em experimentos de SAXS, o máximo ângulo de espalhamento está em torno de 5 graus e $(1 + \cos^2 2\theta)/2$ é praticamente 1.

1.1.2. Espalhamento de raios X por dois elementos de volume, interferência.

Para calcular a amplitude de um feixe monocromático de raios X espalhado por um corpo com densidade eletrônica $\rho(\vec{r})$ arbitrária, calcularemos primeiramente a amplitude espalhada por um elemento de volume $d(\vec{r})$. Consideremos em uma partícula, dois elétrons espaçados por um $\vec{r}$, imersos em um feixe de raios X paralelo e monocromático, como ilustrado na figura 1.3(A). As ondas espalhadas serão coerentes, espalhamento incoerente também pode ocorrer, mas será desprezível para os baixos ângulos.

Figura 1.3 - visão esquemática do espalhamento de raios X por um par de elétrons. (A). Um elétron está localizado na origem e o outro a uma distância $\vec{r}$. Existe uma diferença $(AB + BC)$ no caminho óptico entre os dois feixes espalhados, causando uma diferença de fase. (B). Relação geométrica entre os vetores $\vec{B}_1$, $\vec{B}_0$, e $\vec{q}$.

Como existe uma diferença de caminho óptico entre os dois feixes, haverá obrigatoriamente uma diferença de fase entre eles representada por :

$$\Delta\varphi = \frac{2\pi\Delta l}{\lambda} \quad (11)$$

como a diferença de caminho óptico é dada por $\Delta l = AB + BC$, a diferença de fase é:

$$\Delta\varphi = \frac{2\pi(AB + BC)}{\lambda} \quad (12)$$

As direções dos feixes, incidente e espalhado são dadas pelos versores unitários $\vec{B}_0$ e $\vec{B}_1$.

$$AB = \vec{r} \cdot \vec{B}_0 \text{ e } BC = -\vec{r} \cdot \vec{B}_1 \quad (13)$$

E a diferença de fase pode ser reescrita:

$$\Delta\varphi = \frac{-2\pi\vec{r}(\vec{B}_1 - \vec{B}_0)}{\lambda} \quad (14)$$

onde:

$$\vec{q} = \frac{2\pi(\vec{B}_1 - \vec{B}_0)}{\lambda} \quad (15)$$

então:

$$\Delta\varphi = -\vec{r} \cdot \vec{q} = -rq \cos 2\theta \quad (16)$$

onde 2θ é o ângulo entre $\vec{r}$ e $\vec{s}$. Assim, somente o produto dos componentes $\vec{r} \cdot \vec{q}$ é relevante para $\Delta\varphi$.

Na prática, devido ao enorme número de elétrons em uma macromolécula, é conveniente introduzir o conceito de densidade eletrônica $\rho(\vec{r})$. A amplitude de espalhamento será dada por:

$$A(\vec{q}) = \int A_e \rho(\vec{r}) e^{i\Delta\varphi} dV \quad (17)$$

Substituindo a equação 16 em 17:

$$A(\vec{q}) = \int A_e \rho(\vec{r}) e^{-i\vec{r} \cdot \vec{q}} dV \quad (18)$$

A Figura 1.3(B) mostra as relações geométricas existentes entre os vetores $\frac{2\pi\vec{B}_1}{\lambda}$, $\frac{2\pi\vec{B}_0}{\lambda}$, e $\vec{q}$. Pode ser visto facilmente que $\vec{q}$ é perpendicular a bissetriz do ângulo entre $\frac{2\pi\vec{B}_1}{\lambda}$ e $\frac{2\pi\vec{B}_0}{\lambda}$, e que seu módulo é:

$$q = \frac{4\pi \sin \theta}{\lambda} \quad (19)$$

1.1.3 Lei da reciprocidade

Qualquer processo de espalhamento é caracterizado por uma lei de reciprocidade que dá uma relação inversa entre tamanho da partícula e ângulo de espalhamento. No caso de duas esferas com densidade eletrônica $\rho(\vec{r})$ e raios R_1 and R_2 sob a ação do mesmo feixe de raios X; dI é a intensidade espalhada para um elemento de volume dV para dois diferentes pontos da esfera. (figura 1.4). Assim, existe uma diferença de caminho óptico nas duas esferas. Se 2θ é zero, então q , e $\Delta\phi$ são nulos para todos os elementos de volume. A mesma diferença de caminho igual a λ , por exemplo, ocorre a mais altos ângulos para a esfera menor. As curvas de espalhamento para as duas esferas claramente revelam a reciprocidade existente entre os espaços real e de espalhamento, também chamado, espaço recíproco. Uma consequência para a relação de reciprocidade entre os espaços, direto e recíproco é que quanto maior for a partícula, seu espalhamento de raios X a baixo ângulo estará concentrado em menores intervalos 2θ . (GLATTER; KRATKY, 1982)

Figura 1.4 - Lei da reciprocidade entre espaços real e recíproco. Duas esferas com densidade eletrônica constante $\rho(\vec{r})$ e raios R_1 e R_2 sofrendo a ação do mesmo feixe de raios X. As intensidades são normalizadas por $I(0)$.

1.1.4 O problema de fase

A intensidade de espalhamento $I(\vec{q})$ pode ser medida quantitativamente, e é proporcional ao quadrado da amplitude de espalhamento $A(q)$:

$$I(\vec{q}) \propto A(\vec{q}) \cdot A(\vec{q})^* \quad (20)$$

onde $A(\vec{q})^*$ é o complexo conjugado de $A(\vec{q})$.

De acordo com as propriedades de Fourier, a transformada inversa de $A(\vec{q})$ (equação 18) permite o cálculo da $\rho(\vec{r})$, o qual é uma quantidade real e positiva. Contudo, para obter a $\rho(\vec{r})$, a fase e o módulo do vetor de espalhamento $A(\vec{q})$ são requeridos:

$$A(\vec{q}) = |A(\vec{q})|e^{i\phi} \quad (21)$$

A intensidade de espalhamento, a qual é medida experimentalmente, é dada pela multiplicação entre a amplitude de espalhamento e seu conjugado.

$$I(\vec{q}) \propto (A(\vec{q}))^2 = |A(\vec{q})|^2 e^{i\phi} e^{-i\phi} = |A(\vec{q})|^2 \quad (22)$$

Somente o módulo de $A(\vec{q})$ pode ser conhecido, sua fase é perdida. Este é denominado “Problema da Fase”. Desta forma, não podemos determinar $A(\vec{q})$, pois não conhecemos $e^{i\theta}$.

1.1.5 Espalhamento de raios X por um átomo

A equação 18 pode ser calculada para os átomos de todos os elementos sempre que se conheça a função $\rho(\vec{r})$. Para $\vec{q} = 0$, a integral da equação 18 resulta no número total de elétrons dos diversos átomos neutros, i.e., o seu número atômico Z . Conforme $\vec{q}$ cresce, as diferenças de fase levam a uma diminuição progressiva do valor de $A(\vec{q})$. Curvas deste tipo são mostradas para o carbono e o oxigênio na figura 1.5.

Figura 1.5 - Representação esquemática para a amplitude de espalhamento. Carbono (linha azul) e oxigênio (linha vermelha).

Por definição, o fator de espalhamento atômico é a razão entre a amplitude espalhada pelo átomo e a amplitude espalhada por um elétron.

$$f(\vec{q}) = \frac{A(\vec{q})_{\text{átomo}}}{A_e} \quad (23)$$

1.1.6 Espalhamento de raios X para um grupo de n átomos

Uma vez obtidos os fatores de espalhamento atômicos, a equação 18 pode ser re-escrita levando-se em conta o vetor posição $\vec{r}_j$ de cada átomo e somando-se sobre todos n átomos, com fator de espalhamento $f_j(\vec{q})$:

$$A(\vec{q}) = \sum_{j=1}^n f_j(\vec{q}) e^{-i\vec{q} \cdot \vec{r}_j} \quad (24)$$

A intensidade de espalhamento pode ser obtida se as coordenadas atômicas dos átomos são conhecidas. Para n átomos com fatores de espalhamento $f_j(\vec{q})$ e coordenadas $\vec{r}_j$ para cada centro de espalhamento da partícula:

$$I(\vec{q}) = \sum_{j=1}^n \sum_{k=1}^n f_j(\vec{q}) f_k(\vec{q}) e^{-i\vec{q} \cdot \vec{r}_{jk}} \quad (25)$$

1.1.7. Transformada inversa da função Intensidade.

Devido ao Problema da Fase, não é possível inverter diretamente $A(\vec{q})$ para obter a densidade eletrônica $\rho(\vec{r})$. Patterson propôs o cálculo da transformada de Fourier tomando como coeficientes as intensidades dos feixes espalhados, obtidos pelo produto de $A(\vec{q})$ (equação 18) e seu complexo conjugado (PATTERSON, 1935):

$$I(\vec{q}) = \int \int dV_1 dV_2 \rho(\vec{r}_1) \rho(\vec{r}_2) e^{-i\vec{q} \cdot (\vec{r}_1 - \vec{r}_2)} \quad (26)$$

Se considerarmos a partícula isolada (na prática, um sistema diluído), esta integral depende apenas dos pares de distâncias relativas entre os elementos de volume da mesma e do produto das respectivas densidades eletrônicas. Esta integral pode ser calculada em dois passos:

1º passo: Matematicamente esta etapa corresponde ao cálculo da função de auto-correlação $\tilde{\rho}(\vec{r})$, fazendo $\vec{r} = \vec{r}_2 - \vec{r}_1$ constantes.

$$\tilde{\rho}(\vec{r}) = \rho(\vec{r}_1) \rho(\vec{r}_2) dV \quad (27)$$

Esta função, conhecida como função de Patterson ou função de distribuição de pares, é definida num novo espaço $C(r)$ (espaço de correlação) no qual cada $\vec{r}$ corresponde a uma distância $(\vec{r}_2 - \vec{r}_1)$ tomada sobre todo o objeto espalhador e cujo valor é a média dos produtos das densidades eletrônicas nos pontos $\vec{r}_1$ e $\vec{r}_2$.

2º passo: Consiste na integração no espaço $C(r)$ para obter $I(\vec{q})$:

$$I(\vec{q}) = \int dV \tilde{\rho}^2(\vec{r}) e^{-i\vec{q} \cdot \vec{r}} \quad (28)$$

Para um sistema concentrado de macromoléculas em solução, a intensidade de espalhamento é dada por $I^*(\vec{q}) = I(\vec{q}) \cdot S(\vec{q})$, onde $I(\vec{q})$ é chamado fator de forma (equação 26) e está relacionada com as distâncias intra-partículas, ou seja, correlações de distâncias internas das macromoléculas, enquanto $S(\vec{q})$ é chamado fator de estrutura, e está associado com correlações entre as partículas. Para sistemas diluídos, os quais serão abordados nesta tese, $S(\vec{q})$ se aproxima de 1, e somente o fator de forma contribui para o espalhamento (CRAIEVICH, 2005).

Podemos concluir que a distribuição das intensidades espalhadas no espaço recíproco é função da distribuição de densidade eletrônica na partícula espalhadora através da sua função de auto-correlação e que esta última pode ser obtida diretamente das intensidades espalhadas pelo cálculo da transformada inversa de Fourier da equação 28:

$$\tilde{\rho}^2(\vec{r}) = \left(\frac{1}{2\pi}\right)^3 \int I(\vec{q}) dV^* e^{-i\vec{q}\cdot\vec{r}} \quad (29)$$

onde dV^* é o elemento de volume no espaço recíproco.

Uma propriedade importante da função de auto-correlação é a existência de um centro de inversão nessa função, pois o produto $\rho(\vec{r}_1)\rho(\vec{r}_2)$ é igual a $\rho(\vec{r}_2)\rho(\vec{r}_1)$, resultando no mesmo valor para a função tanto para r como para $-r$, independentemente do fato da partícula espalhadora possuir ou não um centro de inversão. Devemos ainda notar a relação de reciprocidade existente entre as equações 28 e 29, pois os seus valores dependem apenas do produto $\vec{q} \cdot \vec{r}$. Assim conforme $\vec{r}$ cresce, forçosamente $\vec{q}$ diminui.

1.1.8 Espalhamento para sistemas diluídos.

Para análise das curvas de SAXS, adotaremos algumas restrições simplificadoras:

(a) O sistema é estatisticamente isotrópico devido à esfericidade da partícula, ou a distribuição espacial das partículas ou ainda devido ao movimento randômico das partículas no meio.

(b) Não há interação de longa distância entre as partículas, i.e, o sistema é suficientemente diluído.

De acordo com a restrição (a), a $\tilde{\rho}^2(\vec{r})$ é centro simétrica dependendo somente do módulo de $\vec{r}$. Assim podemos substituir o fator de fase $e^{-i\vec{q}\cdot\vec{r}}$ pelo valor médio em torno de $\vec{r}$. A equação é chamada de fórmula de Debye (GLATTER; KRATKY, 1982).

$$\langle e^{-i\vec{q}\cdot\vec{r}} \rangle = \frac{\sin qr}{qr} \quad (30)$$

Assim podemos reescrever as equações 25 e 28:

$$I(q) = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n f_i f_j \frac{\sin qr_{ij}}{qr_{ij}} \quad (31)$$

$$I(q) = \int dV \tilde{\rho}^2(r) \frac{\sin qr}{qr} \quad (32)$$

Ainda, a expressão da reciprocidade entre r e q é aparente na fórmula de Debye. Se o produto qr é mantido constante, um acréscimo em r causa um decréscimo em q .

O termo $\sin qr$ é uma função periódica e o denominador qr é chamado fator de amortecimento, gerando máximos progressivamente menores. Desta forma, o intervalo para medida usual de espalhamento é aproximadamente de 0 a 2.5° .

A consequência da restrição (b) é que para grandes valores de r , as densidades eletrônicas ficam independentes e podem ser substituídas pelo seu valor médio $\langle \rho \rangle$. A função de auto-correlação deve tender para um valor constante $V\langle \rho \rangle^2$, enquanto que na origem $\tilde{\rho}^2(0)$ toma o valor máximo $\overline{V\rho^2}$ (o máximo do curso). Assim, no espaço $C(r)$ haverá informação estrutural relevante apenas na região em que $\langle \rho \rangle^2$ for significativamente diferente do valor constante final. Por essa razão a função de auto-correlação é redefinida como $\eta = \rho - \langle \rho \rangle$, expressando de fato apenas as flutuações de densidade eletrônica responsáveis pelo fenômeno de espalhamento:

$$\tilde{\eta}^2(r) = (\rho(r) - \langle \rho \rangle)^2 = V\gamma(r) \quad (33)$$

Com a conveniente mudança de notação, a função de correlação $\gamma(r)$ é introduzida, a qual está associada com a média da flutuação de densidade eletrônica entre dois elementos de volume separados pela distância r , onde $r = |r_1 - r_2|$.

$$\gamma(r) = \langle \eta(r_1) \eta(r_2) \rangle \quad (34)$$

As flutuações de densidade eletrônica, tomadas em relação ao meio que contém os espalhadores, podem ser negativas ou positivas. Assim a presença de poros em um material leva a uma flutuação η negativa. Entretanto a função característica $\gamma(r)$ será sempre positiva, uma vez que, de acordo com a equação 33, ela é dada por $\tilde{\eta}^2(r)$, com $\gamma(0) = \overline{\eta^2}$ e $\gamma \rightarrow 0$ para grandes r_s . Adicionando $\gamma(r)$ e os limites de integração de 0 a ∞ na equação 32 e mudando o parâmetro de integração para dr , a intensidade é:

$$I(q) = V \int_0^{\infty} 4\pi r^2 dr \gamma(r) \frac{\sin qr}{qr} \quad (35)$$

Para $q = 0$

$$I(0) = V \int_0^{\infty} 4\pi r^2 dr \gamma(r) \quad (36)$$

$\gamma(r)$ é encontrado como a transformada inversa de Fourier da equação 35:

$$V\gamma(r) = \frac{1}{2\pi^2} \int_0^{\infty} q^2 dq I(q) \frac{\sin qr}{qr} \quad (37)$$

Para $r = 0$

$$V\gamma(0) = \frac{1}{2\pi^2} \int_0^{\infty} q^2 dq I(q) = V\overline{\eta^2} \quad (38)$$

O valor de $I(0)$ dado pela equação 36 é experimentalmente impossível de medir por coincidir com a direção do feixe incidente. Entretanto ele pode ser obtido por extrapolação da curva $I(q)$ e permite obter, ao menos aproximadamente, o número total de elétrons existente no volume da partícula.

Por sua vez, a equação (38) nos diz que o valor da integral da intensidade no espaço recíproco é constante. Mesmo que uma dada partícula apresente alterações em sua forma, se ela se conservar íntegra, o valor da integral será constante igual a $V\overline{\eta^2}$, apesar das eventuais alterações que ocorram no padrão de difração ou espalhamento. Esta constante, é chamada “Invariante”, e é dada por:

$$Q = \int_0^{\infty} q^2 dq I(q) \quad (39)$$

A condição de restrição para sistemas isotrópicos nos levaram a considerar valores médios dando, como consequência, um caráter escalar à distribuição da função de auto-correlação no espaço $C(r)$.

1.1.9 Redefinição da função de correlação

Devido ao quadrado da diferença de densidade eletrônica ser constante e sempre positiva (a densidade das proteínas são sempre maiores que a do solvente), é conveniente separar $\gamma(r)$, definida na equação 33, na forma

$$\gamma(r) = (\Delta\rho)^2 \gamma_0(r) \quad (40)$$

Onde $\gamma_0(r)$ é uma nova função de correlação, dependente somente da geometria da partícula, com $\gamma_0(0) = 1$ e $\gamma_0(r \geq D_{\max}) = 0$ (onde $D_{\max}$ é a máxima distância intra partícula).

$\gamma_0(r)$ é chamada “função característica” e tem significado mais intuitivo.

Assim, é conveniente reescrever as equações 35, 36, 37, 38 e 39:

$$I(q) = V(\Delta\rho)^2 \int_0^D 4\pi r^2 dr \gamma_0(r) \frac{\sin qr}{qr} \quad (41)$$

$$I(0) = V(\Delta\rho)^2 \int_0^D 4\pi r^2 dr \gamma_0(r) \approx (\Delta\rho)^2 V^2 \quad (42)$$

$$V\gamma_0(r)(\Delta\rho)^2 = \frac{1}{2\pi^2} \int_0^\infty q^2 dq I(q) \frac{\sin qr}{qr} \quad (43)$$

$$V\gamma_0(0)(\Delta\rho)^2 = \frac{1}{2\pi^2} \int_0^\infty q^2 dq I(q) \quad (44)$$

$$Q = \int_0^\infty q^2 dq I(q) = V 2\pi^2 (\Delta\rho)^2 \quad (45)$$

1.1.10 Sistema isotrópico, diluído e monodisperso

Assumindo-se que o sistema de interesse é uma solução diluída de partículas idênticas (monodisperso) com densidade eletrônica constante ρ , embedida em um meio com densidade constante ρ_0 (solvente). Assim somente $\Delta\rho = (\rho - \rho_0)$ é relevante para o espalhamento. A condição de sistema diluído garante que cada partícula faça contribuição independente para intensidade de espalhamento, como todas as partículas são idênticas, somente uma única partícula precisa ser considerada.

Uma análise mais completa para determinação da geometria da partícula pode também ser feita através do cálculo, a partir dos dados experimentais, da função de distribuição de distâncias $p(r)$, onde $p(r) = 4\pi r^2 \gamma_0(r)$. Assim, a equação 41 pode ser reescrita como:

$$I(q) = V(\Delta\rho)^2 \int_0^D p(r) dr \frac{\sin qr}{qr} \quad (46)$$

A $p(r)$ pode ser obtida a partir da transformada inversa da transformada de Fourier de $I(q)$, a qual possui valor igual a 0 na máxima dimensão da partícula D_{max} . É importante a consideração

de que este material assume condições restritivas de um sistema monodisperso de partículas suficientemente diluídas em solução. Além disso, é também importante ter contraste entre partícula e solvente.

A $p(r)$ contém a mesma informação da intensidade de espalhamento $I(q)$, mas a representação da $p(r)$ no espaço real é mais intuitiva. Além disto, informação sobre a forma da partícula em solução pode ser deduzida visualmente da $p(r)$. A figura 1.6 apresenta padrões de espalhamento e $p(r)$ característicos de objetos geométricos com mesmo D_{max} . Partículas globulares possuem uma $p(r)$ na forma de uma função gaussiana centro simétrica com um máximo em $D_{max}/2$. Partículas alongadas possuem uma $p(r)$ com máximo em menores distâncias correspondendo ao raio da secção de corte R_c . Partículas achatadas mostram um máximo mais alargado, também deslocando o máximo para distâncias menores que $D_{max}/2$. $p(r)$ com um máximo deslocado para distâncias maiores que $D_{max}/2$ é indicativa de cascas esféricas. Partículas consistindo de subunidades bem separadas apresentam dois máximos, o primeiro correspondendo às distâncias intra-subunidades e outro a separação entre as subunidades. (SVERGUN, KOCH, 2003).

As diferenças nos padrões de espalhamento permitem determinar objetos esfericamente simétricos, os quais produzem mínimos no padrão de espalhamento. Partículas muito anisotrópicas possuem padrão de espalhamento com um decaimento bem menor comparado com partículas globulares.

Figura 1.6 - Intensidades de espalhamento e função de distribuição de distâncias para diferentes objetos geométricos. Figura extraída de (SVERGUN, KOCH, 2003).

1.2 Análises das curvas de SAXS

Para análise de uma curva de SAXS, é conveniente distinguir três regiões na curva de espalhamento. Na região dos ângulos próximos de zero, pode-se determinar o raio de giração R_g da macromolécula. Na região central, a razão $I(0)/Q$ pode fornecer informação relativa ao volume e na região de mais alto ângulo obtemos a relação superfície/volume da macromoléculas (Feigin e Svergun, 1987).

1.2.1 Região dos menores q s na curva de SAXS, determinação do raio de giração

Assumindo o caso ideal, de partículas esféricas não interagentes em solução, Guinier mostrou que para $q \rightarrow 0$, a curva de Intensidade pode ser descrita como uma função exponencial: (GUINIER; FOURNET, 1955)

$$I(q) = I(0)e^{\frac{-q^2 R_g^2}{3}} \quad (47)$$

Onde R_g é o raio de giração correspondente a distância média quadrática dos elétrons da partícula até o seu centro de gravidade, analogamente, o R_g pode ser visto com o raio de inércia na mecânica clássica. Aproximações similares, não discutidas nesta tese, são consideradas para partículas alongadas e achatadas. Para um sistema monodisperso, o gráfico de Guinier, $\ln I(q) \times q^2$ demonstra uma linha reta a qual intercepta $I(0)$, a inclinação desta reta é proporcional ao R_g . Contudo devemos ter em mente que a aproximação de Guinier é válida somente para os ângulos próximos de 0, respeitando a equação $q < 1.3/R_g$ (GLATTER; KRATKY, 1982). É também possível obter o R_g como o segundo momento normalizado da função de distribuição de distâncias $p(r)$ da partícula (Svergun e Koch, 2003). O programa Gnom (Semenyuk e Svergun, 1991) (Svergun, 1992) calcula o R_g a partir da $p(r)$, este pode ser comparado com R_g obtido pelo método de Guinier.

1.2.2 Região central da curva de SAXS, determinação do volume

Ao se dividir a equação 42 por 45, tem-se um termo relativo a uma intensidade arbitrária presente tanto no numerador como no denominador da equação. As características associadas a estas intensidades serão canceladas, permitindo o cálculo do volume ser realizado em unidades absolutas ($\text{\AA}^3$):

$$\frac{I(0)}{Q} = \frac{V}{2\pi^2} \quad (48)$$

É importante frisar que para o cálculo de V , os dados devem ser corretamente extrapolados a $I(0)$ utilizando a aproximação de Guinier. A relação 48 será utilizada no capítulo 4 para determinação do estado de oligomerização de proteínas em solução.

1.2.3 Região de mais alto ângulo da curva de SAXS, determinação da razão superfície/volume

A análise da região de mais alto ângulo de SAXS contém informação acerca dos aspectos finos da partícula, ou seja, expressa o comportamento de $\gamma_0(r)$ a pequenos r_s , nós assumimos que a partícula tenha densidade eletrônica uniforme (corpo homogêneo) com interface bem definida com a densidade eletrônica do solvente. Porod mostrou que neste caso o comportamento assintótico no final da curva é dado pela relação existente entre a parte da curva de intensidade e a quarta potência de q (GLATTER; KRATKY, 1982):

$$I(q) \rightarrow (\Delta\rho)^2 V \frac{8\pi}{q^4} = (\Delta\rho)^2 \frac{2\pi}{q^4} S \quad (49)$$

O valor assintótico para $I(q)$ x q^4 é esperado ser proporcional a superfície total da partícula:

$$\frac{S}{V} = \frac{\pi}{Q} \lim_{q \rightarrow \infty} q^4 I(q) \quad (50)$$

Os dados a altos ângulos são assumidos seguir um comportamento linear em $q^4 I(q)$ contra q^4 . Se houver heterogeneidades na densidade eletrônica da particular espalhadora, verifica-se uma inclinação na região linear de $q^4 I(q) \approx B q^4 I(q) + A$. Subtraindo B (constante de Porod) de $I(q)$, a o espalhamento correspondente será característico de um corpo homogêneo.

1.3 Análises de proteínas em solução utilizando SAXS

1.3.1 Reconstrução *ab-initio* da forma da proteína a partir de dados de SAXS.

Um dos objetivos de SAXS aplicado ao estudo de proteínas em solução está em resolver um modelo tridimensional a partir de uma curva unidimensional de espalhamento. Exceto para casos triviais de partículas esféricas, a solução não é claramente única e modelos diferentes podem ser obtidos da mesma curva de SAXS, possuindo estes quase a mesma discrepância em relação às curvas experimentais. (VOLKOVA, 2003)

No passado, a determinação de forma de objetos espalhadores foi realizada por julgamento de acerto erro, computando modelos tridimensionais de objetos geométricos como, esferas, cilindros, elipses, prismas, etc, e comparando-os com os dados experimentais. O primeiro método *ab initio* para determinação de forma foi proposto por Stuhrmann (1970, 1970b). Neste método a partícula é representada por uma função de envelope angular $r = F(\omega)$, que descreve as partículas em coordenadas esféricas (r, ω) . Contudo, a utilização de função de envelope angular, se limita a formas relativamente simples.

Um modelo tridimensional de melhor qualidade, utilizando um modelo de átomos *dummy* do inglês DAM - *dummy atom model* pode ser construído *ab initio* utilizando método de Monte Carlo (Hromkovic, 2001). O método foi primeiramente implementado no programa DALAI_GA (CHACON, 1998, 2000). Um volume, por exemplo uma esfera de diâmetro igual ao $D_{máx}$, a qual é determinada a partir dos dados experimentais é definida e preenchida com empacotamento denso de esferas menores de raio r_0 e k fases (relativas às densidades eletrônicas intra partícula). Assim o número de esferas será $N=(R/r_0)^3$.

Cada átomo é assinado com um índice X_j indicando a fase a qual ele pertence (X_j possui intervalo de zero para o solvente até k). Dando a posição atômica X_j , a forma e estrutura do DAM pode ser descrita.

Cada átomo *dummy* de k_{th} fase é assumido tem contraste $\Delta\rho_k$, e a intensidade de espalhamento para o DAM é dada por:

$$I(q) = \left\langle \left[\sum_{k=1}^K \Delta\rho_k A_k(q) \right] \right\rangle_{\Omega} \quad (51)$$

onde $A_k(q)$ é a amplitude de espalhamento para o volume ocupado pela k_{th} fase. Representando as amplitudes utilizando os harmônicos esféricos $Y_{lm}(\Omega)$.

$$A_k(q) = \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{m=-1}^1 A_{lm}^{(k)}(q) Y_{lm}(\Omega) \quad (52)$$

As amplitudes parciais para o volume ocupado pela k_{th} fase no DAM são dadas por:

$$A_{lm}^{(k)}(q) = i^l \sqrt{2/\pi} f(q) \sum_{j=1}^{N_k} j_1(qr_j) Y_{lm}^*(\omega_j) \quad (53)$$

onde a somatória age sobre todos os átomos *dummy* de k_{th} fase. r_j , ω_j são dados em coordenadas polares, $j_1(x)$ a função de Bessel e $f(q)$ é a função de espalhamento (fator de forma).

Assim a intensidade é dada por:

$$I(q) = 2\pi^2 \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{m=-1}^1 \left[\sum_{k=1}^K [\Delta\rho_k A_{lm}^{(k)}(q)]^2 + 2 \sum_{n>k} \Delta\rho_k A_{lm}^{(k)}(q) \Delta\rho_n [A_{lm}^{(n)}(q)]^* \right] \quad (54)$$

No programa Dammin (SVERGUN, 1999). Para simplificar a solução, uma estrutura homogênea é assumida, tomando como constante a densidade eletrônica interna da partícula, (a influência de não homogeneidade da partícula pode ser corrigida pela subtração da constante de Porod (seção 1.2.3). Esta simplificação é razoável para a determinação de estruturas

tridimensionais com informações de espalhamento concentradas no baixo ângulo. Assim, cada esfera de raio r_0 recebe um índice k igual a 1, ao solvente é atribuído índice igual a 0.

Dando o conjunto de M curvas experimentais $I_{\text{exp}}^{(i)}(q), i = 1, \dots, M$, temos o objetivo de minimizar a discrepância entre a curva de espalhamento gerado a partir do modelo inicial (esfera) e a curva experimental.

$$\chi^2 = \frac{1}{M} \sum_{i=1}^M \sum_{j=1}^{N(i)} [(I_{\text{exp}}^{(i)}(q_j) - I^{(i)}(q_j)) / \sigma(q_j)]^2 \quad (55)$$

em que $N(i)$ é o número de pontos experimentais na i_{th} curva e $\sigma(q)$ denota os erros experimentais. Pretende-se encontrar no fim do processo de minimização (da diferença global entre a curva experimental e a calculada a partir do modelo) a forma tridimensional da macromolécula em solução.

O programa assume empacotamento hexagonal $N_c = 12$, exceto para os átomos de borda. A perda de conectividade entre os átomos é definida por $C(N_e) = 1 - P(N_e) = 1 - [e^{-0.5N_e} - e^{-0.5N_c}]$, em que $C(12) = 1$ para conectividade ideal e a conectividade individual de átomos não solvente é caracterizada pela quantidade de átomos contactantes N_e pertencentes a mesma fase k . A função decai de $C(12) = 1$ para $C(6) = 0.943$ (partículas de borda), seguindo até $C(0) = 0.0002$ para os átomos que não devem aparecer no modelo final. A compacidade de uma configuração X pode ser dada como uma média de conectividade dos átomos os quais não são solvente $\langle C(N_e) \rangle$. A configuração pode ser caracterizada como uma função média $P(X) = 1 - \langle C(N_e) \rangle$.

A tarefa de recuperar um modelo de baixa resolução a partir de uma curva de SAXS pode ser formulada do seguinte modo: a partir de um DAM inicial, encontrar uma configuração X que minimize a função

$$f(X) = \chi^2 + \alpha P(X) \quad (56)$$

em que $\alpha > 0$ é a função peso de penalidade de $P(X)$.

O método de minimização por *simulated annealing* é descrito abaixo:

1. Início em uma configuração randômica X_0 a altas temperaturas T_0 , sendo $T_0 = f(X_0)$.
2. Seleção de um átomo do conjunto, mudança randômica de sua fase (configuração X'), e aplicação da função $\Delta = f(X') - f(X)$.
3. Alteração do valor X' para a opção testada, se $\Delta < 0$, caso contrário, repetição do passo 2.
4. Manutenção de T constante para 100N reconfigurações ou 10N reconfigurações com sucesso (onde N é o número total de esferas que compõe a esfera maior), o resfriamento teórico do sistema ocorre na taxa de $T' = 0.9T$.

No programa Gasbor (SVERGUN, 2001) um modelo de átomos *dummy* do inglês DAM - *dummy atom model* é gerado com uma cadeia aleatória de C_α . O DAM é enovelado de forma a minimizar a discrepância χ com os dados experimentais de SAXS. O programa simula a estrutura interna da proteína, não sendo necessário subtrair o valor de intensidade da constante de Porod (GLATTER; KRATKY, 1982).

1.3.2 Cálculo de intensidade de SAXS a partir das coordenadas atômicas

Comparações entre curvas experimentais de SAXS e curvas teóricas avaliadas a partir de estruturas com resolução atômica, obtidas por cristalografia, têm sido amplamente utilizadas para validar modelos teóricos, verificar diferenças estruturais entre proteínas e ácidos nucleicos no estado cristalino e em solução e prever estruturas quaternárias.

Figura 1.7 – Representação esquemática de uma proteína em solução.

Proteínas em solução podem ser esquematicamente representadas como ilustrado na Figura 1.7. A partícula com densidade eletrônica $\rho_a(\vec{r})$ é cercada por um solvente de densidade eletrônica média ρ_0 . A hidratação da proteína é representada por uma camada de espessura Δ , e densidade ρ_b . A curva de SAXS de uma proteína em uma solução suficientemente diluída é proporcional ao espalhamento de um único objeto espalhador. A intensidade de espalhamento pode ser descrita como:

$$I(q) = \left\langle \left| A_a(q) - \rho_s A_s + \delta\rho A_b(q) \right|^2 \right\rangle_{\Omega} \quad (57)$$

onde $A_a(q)$ é a amplitude espalhada para proteína no vácuo, A_s e A_b são respectivamente, as amplitudes de espalhamento para o volume excluído (solvente) e para a camada de hidratação, ambas com densidade eletrônica respectivamente, ρ_s e ρ_b . A camada de solvatação é modelada contendo espessura de 3.0 Å. A contribuição da amplitude é acrescida por $\delta\rho A_b(q)$, onde $\delta\rho = \rho_b - \rho_s$. O símbolo $\langle \rangle$ significa a promediação da média.

Quando a estrutura cristalográfica da proteína é conhecida, a amplitude $I(q)$, equação 51, pode ser determinada utilizando método de expansão multipolar com o programa Crysol. O único

parâmetro desconhecido que precisa ser ajustado é o volume excluído da proteína, V , e a diferença entre a densidade eletrônica entre o solvente e a camada de hidratação. Esses parâmetros e um fator de escala c , são obtidos num procedimento de ajuste utilizando o programa Crysol (Svergun, 1995). Assim a intensidade de espalhamento obtida experimentalmente por SAXS e a $I(q)$ obtida por simulação a partir de um banco de dados de proteínas podem ser comparadas:

$$\chi^2(r_0, \delta\rho) = \frac{1}{N_p} \sum_{i=1}^{N_p} \left[\frac{I_e(q_i) - cI(q_i, r_0, \delta\rho)}{\sigma(q_i)} \right]^2 \quad (58)$$

onde N_p é o número de pontos experimentais, $\sigma(q_i)$ são os erros da intensidade experimental $I_e(q_i)$ e c é o fator de escala entre os dados experimentais e o modelo cristalográfico.

2 Objetivos do trabalho

Os objetivos deste trabalho estão concentrados na apreciação da teoria envolvida no espalhamento de raios X a baixo ângulo aplicado a um sistema monodisperso de proteínas em solução, em diferentes estudos de SAXS para caracterização de diferentes proteínas, assim como no desenvolvimento de uma metodologia para determinação do estado de oligomerização de proteínas em solução e na implementação de instrumentação para SAXS. Os objetivos específicos desta tese foram:

(1) Instrumentação de SAXS.

Implementação de um equipamento de baixo ângulo no Instituto de Física da USP de São Carlos capaz de obter curvas de SAXS de boa qualidade, para o estudo estrutural de macromoléculas em solução.

(2) Desenvolvimento de metodologia para determinação do estado de oligomerização de proteínas em solução.

Utilizando medidas realizadas na linha de SAXS do LNLS, uma metodologia para determinação da massa molecular de proteínas, a qual não são necessárias medidas de proteína padrão para comparação da massa molecular, foi extensivamente utilizada demonstrando alta confiabilidade.

(3) Caracterização do DBD hTR β .

Clonagem, expressão e purificação foi realizada para o DBD hTR β , com o intuito da caracterização experimental desta proteína. Para isto, anisotropia de fluorescência, crosslink e SAXS foram realizados. Após formação do complexo DNA-proteína, F2-DBD hTR β , o mesmo foi submetido a cristalização e SAXS.

(4) Estudos por SAXS de ferredoxina-FAD e do complexo formado por interleucina-22 e interleucina-22R1.

A proteína ferredoxina redutase de *leptospira interrogans* e o complexo formado por interleucina-22 e o receptor interleucina-22R1 foram submetidos a baixo ângulo com o intuito de determinação do estado de oligomerização, assim como do envelope tridimensional dos complexos.

3 Instrumentação para o espalhamento de raios X a baixo ângulo

3.1 Equipamento de SAXS do Instituto de Física da USP de São Carlos

Resumo

Durante o desenvolvimento deste trabalho dependemos da linha de SAXS do Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS) para realização de experimentos com proteínas em solução. Muitas destas coletas poderiam ter sido feitas no Instituto de Física da USP de São Carlos se possuíssemos um equipamento adequado. Por isso, foi desenvolvida, como parte da tese, uma câmara de SAXS com detecção unidimensional associada a uma fonte de raios X do tipo ânodo rotatório posicionada para obtenção de feixe linha.

3.1.1 Introdução.

Com recursos do projeto temático FAPESP nº 2006/00182-8 do prof. Dr. Igor Polikarpov, intitulado “Biofísica estrutural dos receptores nucleares e proteínas relacionadas”, foram adquiridos uma ótica multicamadas para monocromatização do feixe de raios X, um sistema de colimação e um detector unidimensional sensível a posição. Um porta-amostra, uma caixa de fendas, um caminho de vácuo de distância variável, assim como um dispositivo para posicionamento do bloqueador de feixe direto e os sustentadores do sistema foram desenvolvidos com o apoio da oficina mecânica do IFSC. Acessórios, como micrômetros, e outros dispositivos foram adquiridos com reserva técnica do projeto FAPESP nº 02/14041-6.

Um esquema simplificado do equipamento é mostrado abaixo:

Figura 3.1 - Esquema do equipamento de SAXS do IFSC. 1. Gerador de Raios X; 2. monocromador; 3. Fendas horizontal e vertical, o equipamento possui duas caixas de fendas espaçadas de 1 metro; 4. Tubo evacuado de 1 metro de comprimento; 5 Fenda horizontal (parasita); 6. Porta-amostra; 7. caminho de vácuo; 8. Bloqueador do feixe direto; 9. Detector unidimensional sensível a posição.

3.1.1.1 Descrição detalhada dos componentes do equipamento

Uma descrição detalhada dos componentes do equipamento é mostrada abaixo:

Gerador de Raios X

Anodo rotatório de Cobre (Cu), Rigaku Rotaflex modelo RU 200B. O gerador foi posicionado verticalmente de modo a se obter um feixe de raios X com seção reta, com foco de tamanho 10 x 1 mm a uma inclinação de 6° contra o plano horizontal do foco. A utilização do feixe linha é conveniente com o uso do anodo rotatório, pois permite maior fluxo de fótons de raios X incidentes na amostra.

Monocromador

Uma ótica multicamadas composta de tungstênio e silício otimizada para amplificar um feixe linha de comprimento de onda característico do K_{α} do Cu de 8.04 keV é utilizada (MACRANDER, 1998). O espelho monocromador tem comprimento de 60 mm e fica posicionado dentro de uma câmara constantemente evacuada. Em óticas multicamadas, somente para ângulos rasantes, menores que o ângulo crítico (Θ_c), o feixe de raios X é refletido.

Figura 3.2 - Visão geral do micromaniador.

Sistema de colimação

O sistema de colimação consiste de duas fendas paralelas. Sendo a abertura destas fendas muito menor que a distância entre elas. Este sistema tem a desvantagem que as fendas emitem espalhamento secundário (espalhamento parasita) na região dos ângulos próximos de zero. Contudo uma terceira fenda foi posicionada rente ao feixe, eliminando o o espalhamento parasita causado pelas duas primeiras fendas. Assim, o sistema de colimação é composto de três fendas de tântalo, sendo que as duas primeiras, espaçadas de 1 metro, são responsáveis pela colimação horizontal e vertical do feixe e a terceira, chamada de fenda parasita, foi posicionada de modo a não tocar o feixe. O sistema de colimação do equipamento é evacuado minimizando o contato do feixe colimado com moléculas de ar.

Figura 3.3 - Sistema de colimação. (A) Visão geral do sistema de colimação. (B) Visão frontal da caixa das fendas 1 e 2. (C) Visão frontal da fenda 3 (fenda parasita).

Porta-amostra

O sistema de colimação tem como objetivo um feixe linha vertical, de modo que o feixe não ultrapasse os parâmetros da cela do porta-amostra 12 x 2 mm, que possui espaço para aproximadamente 200 μL de solução entre duas janelas de mica. O porta-amostra é acoplado a um banho térmico, o qual permite que a solução de amostra seja resfriada.

Figura 3.4 – Porta-amostra.

Caminho de vácuo e bloqueador do feixe direto

No equipamento de SAXS do IFSC é possível utilizar diferentes distâncias entre amostra e detector (339 mm e 739 mm), cobrindo assim, diferentes intervalos em q . O caminho entre a amostra e o detector encontra-se em vácuo, de modo a eliminar o espalhamento característico das moléculas presentes no ar. Ao fim do caminho de vácuo, uma placa de chumbo de aproximadamente 3 mm de largura, chamada de bloqueador do feixe direto, impede que o feixe de raios X incida diretamente sobre o detector. O bloqueador do feixe direto foi posicionado sobre uma haste conectada a um micrômetro, o qual permite seu movimento lateral.

Figura 3.5 - Caminho de vácuo e bloqueador do feixe direto. (A) visão geral do caminho de vácuo. (B) O bloqueador do feixe direto encontra-se em frente a janela de saída dos fótons espalhados, o bloqueador pode ser movimentado com a ajuda de um micrômetro.

Sistema de detecção

O sistema de detecção de raios X do equipamento de SAXS do IFSC é do tipo unidimensional sensível a posição e é constituído de um detector de raios X e uma eletrônica associada que fornece um sinal digital para o computador de leitura dos dados, o sistema foi desenvolvido pelo grupo de detectores do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas. O detector de raios X está posicionado sobre uma mesa de posicionamento XYZ a qual permite movimentar o detector verticalmente, em profundidade, e lateralmente (figura 3.6) (BARBOSA, 1996).

Figura 3.6 - Sistema de detecção unidimensional sensível a posição.

O detector possui em seu interior um fio condutor (anodo), frente a uma janela de Berílio (80 mm x 8 mm). O detector é selado e no seu interior há uma mistura de 90% Argônio e 10% Metano. Os fótons de raios X incidentes entram pela janela do detector e ionizam o gás, gerando pulsos elétricos que são capturados pelos respectivos eletrodos (anodo e catodo). A diferença de potencial (aproximadamente 2 kV) entre o catodo e o anodo do detector, faz do fio, um atrator para os elétrons resultantes da interação entre os fótons de raios X e as moléculas do gás. Os correspondentes íons positivos são atraídos em direção ao catodo. Devido à diferença de massa entre elétrons e íons e também à geometria dos eletrodos, o sinal elétrico devido à ionização do gás tem uma forma de evolução temporal específica. O catodo é subdividido em pistas condutoras, cada uma das quais conectadas a uma linha de transmissão que atrasa a propagação. As propriedades da linha de transmissão são tais que o tempo de propagação de um pulso através de toda sua extensão é de aproximadamente 300 ns. Cada evento de ionização é capturado e

amostrado por um pequeno número de pistas condutoras, de modo que o tempo de propagação do sinal elétrico associado está diretamente relacionado com a posição do fóton incidente.

Cada fóton absorvido gera uma distribuição de carga elétrica no interior do detector, pelo processo conhecido como avalanche: o fóton gera um elétron inicial por efeito fotoelétrico, e este provoca outras ionizações, cujos elétrons – submetidos ao campo elétrico da ordem de 10^6 - adquirem energia suficiente para provocar também outras ionizações. Para evitar que o detector entre em regime de descarga contínua, devido ao desencadeamento de avalanches, o gás de operação contém um aditivo cuja função é absorver energia sem emitir de partículas carregadas. No caso presente este gás é o Metano, presente como 10% do volume total de gás.

3.1.1.2 Efeito de deformação da curva de intensidade de SAXS (*smearing*)

O efeito de deformação dos dados, do inglês “smearing”, é caracterizado como uma alteração na forma da curva dos dados coletados, ele se origina de dimensões finitas e policromaticidade do feixe. Assim, ocorre principalmente devido a altura da janela de abertura do detector (o detector utilizado possui uma abertura de 8 mm) e devido a altura do feixe no detector, em menor escala ocorre devido a largura do feixe e resolução do detector. Somente em condições onde o feixe tenha uma secção pontual com raio menor que 1 mm e o detector tenha uma janela suficientemente estreita (0.5 mm), não se observa deformação dos dados, pois pode-se atribuir a um único canal, um único valor de q .

O sistema de colimação utilizado foi otimizado para obter um feixe linha de dimensões finitas, o feixe possui altura muito maior comparada com sua largura. Assumindo-se $I_0(x, t)$ como uma distribuição de intensidade bidimensional do feixe incidente na amostra, onde t é a coordenada do centro do feixe primário na direção da altura do feixe e x é relativa a largura do

feixe, esta coordenada é perpendicular a t . Assim a $I_0(x, t)$ pode ser escrita como uma função de duas variáveis independentes.

$$I_0(x, t) = P(t) \cdot Q(x) \quad (59)$$

Em termos práticos, um efeito de colimação bidimensional pode ser resolvido como dois efeitos unidimensionais independentes.

Efeito de deformação pela altura do feixe

Assumindo momentaneamente que $Q(x)$ é infinitamente estreito (desprezível), o feixe linha com sua distribuição de intensidade $P(t)$ causa uma intensidade espalhada com efeito de deformação $\tilde{I}(m)$. A abscissa experimental m mede a distância entre o feixe espalhado e incidente no plano de detecção (figura 3.7), estando relacionada com o vetor de espalhamento q , onde $q = 4\pi \sin \theta / \lambda$ e $2 \sin \theta \cong m/a$, sendo a a distância entre a amostra e o plano de detecção.

A curva de intensidade com efeito de deformação $\tilde{I}(m)$ é uma integral sobre a $I(m)$ pesada pela função de intensidade $P(t)$, e segue de acordo a figura geométrica apresentada na figura 3.7. (GUINIER ; FOURNET, 1955).

$$\tilde{I}(m) = \int_{-\infty}^{\infty} P(t) I(m^2 + t^2) dt = 2 \int_0^{\infty} P(t) I(m^2 + t^2) dt \quad (60)$$

Figura 3.7 - esquema demonstrando a geometria de feixe linha com detector unidimensional. A altura do feixe, assim como a janela do detector causam deformação na curva de SAXS.

Efeito de deformação pela largura do feixe

Este efeito é causado pelo perfil de intensidade $Q(x)$, isto é, pela largura do feixe primário. Ele pode ser descrito pela integral:

$$\hat{I}(m) = \int_{-\infty}^{\infty} Q(x) \cdot I(m - x) dx \quad (61)$$

Efeito de deformação pela altura da janela do detector

A altura da janela do detector possui o mesmo efeito da altura do feixe incidente $P(t)$. Contudo, não é necessário resolver outra integral de deformação da curva, é possível combinar os dois efeitos de altura do feixe e da janela do detector pela convolução do perfil $P(t)$ com a função

correspondente a altura do detector. Esta convolução é realizada experimentalmente se a medida do perfil $P(t)$ é realizada com a mesma janela do detector.

Efeito de deformação pela largura da janela do detector

Da mesma forma que a altura do detector, o efeito causado pela largura do detector, causa deformação de espalhamento e desde que o perfil do feixe primário $Q(x)$ seja medido no mesmo detector, o sinal relativo à deformação causada pela largura do detector estará implícita na medida, não sendo necessárias correções adicionais.

Efeito de deformação pela policromaticidade do feixe

O efeito de deformação na curva de espalhamento causado pela distribuição do comprimento de onda λ do feixe primário (policromaticidade do feixe) é descrito pela integral:

$$I_{\lambda}(m) = \int_0^{\infty} W(\lambda) I(m/\lambda) d\lambda \quad (62)$$

A constante $W(\lambda)$ é conhecida como função peso obtida experimentalmente relativa a policromaticidade do feixe. De acordo com o fabricante, com a utilização do monocromador, a policromaticidade do feixe torna-se desprezível.

Efeitos de deformação combinados

Os efeitos causados pelas dimensões do feixe primário, e pela janela e resolução do detector podem ser agrupados e resolvidos de uma só vez com a integral abaixo:

$$I_{\text{exp}}(m) = 2 \int_{-\infty}^{\infty} \int_0^{\infty} \int_0^{\infty} Q(x) \cdot P(t) \cdot W(\lambda) \cdot I(\sqrt{((m-x)^2 + t^2)} / \lambda) d\lambda dt dx \quad (63)$$

O tratamento aplicado às equações 59 a 63 são também chamadas integral de primeiro tipo de Fredholm (FREDHOM, 1903).

3.1.2 Metodologia

3.1.2.1 Alinhamento do equipamento

Para o alinhamento do equipamento foi utilizado potência mínima de 200 W (10 kV e 20 mA), durante as medidas uma potência de 5 kW (50 kV e 100 mA) é em geral aplicada. Para o alinhamento, utilizou-se uma câmera para visualização de raios X e um detector do tipo *pin diode*.

Monocromador

O monocromador foi posicionado horizontalmente a 6° em relação à perpendicular a janela do tubo de raios X. A multicamada de espelhos monocromadores é fixada lateralmente ao feixe de raios X. Ajuste no parafuso de Bragg faz com que o raio-X incida a ângulos rasantes nos espelhos, refletindo somente o K_α do Cu. O parafuso de ajuste da fenda de saída foi utilizado para eliminar o feixe branco que possui todos os comprimentos de onda característicos de um tubo de raios X.

Figura 3.8 - Monocromador otimizado para o Cobre. (A) visão lateral da caixa do espelho monocromador. (B) visão superior da caixa do espelho monocromador.

Sistema de colimação e porta-amostra

As três fendas foram posicionadas no eixo óptico do sistema, de modo que o feixe passe no centro das 3 fendas. A terceira fenda foi posicionada rente ao porta-amostra de modo a minimizar o espalhamento parasita causado pelas duas primeiras fendas. Uma câmara para exposição de filmes de raios X foi construída. Após o feixe de raios X passar pelo sistema de colimação foi verificado o perfil do feixe na altura do porta-amostra (figura 3.9).

Figura 3.9 - Cella do porta-amostra com câmara para exposição de filmes de raios X para verificação do alinhamento do porta-amostra.

3.1.2.2 Efeito de deformação da curva de intensidade de SAXS (*smearing*)

3.1.2.2.1 Medida dos parâmetros do feixe

A medida da altura do feixe para correção do efeito de deformação na curva de SAXS é realizada varrendo o perfil de altura dos raios X com o detector unidimensional, o movimento foi realizado utilizando uma régua posicionada na mesa XYZ, com exposição de 30 s para cada ponto, em intervalos de 0.1 cm, retirando o bloqueador de feixe direto. Foi necessário para a realização da medida que a tensão e a corrente do anodo rotatório estivessem em potência mínima de trabalho (20 kV, 10 mA), é importante adicionar em frente ao feixe um material atenuador de alumínio para que o feixe direto não danifique o sistema de detecção.

Um perfil trapezoidal é característico de um sistema com feixe linha e detector com abertura de janela considerável (SVERGUN, 1992) (figura 3.10).

Figura 3.10 - Perfil Trapezoidal do feixe de raios X.

em que AH é a altura do feixe de raios X no plano de detecção e LH é a altura da janela do detector.

3.1.2.3 Experimentos para caracterização do equipamento

Como experimentos para caracterização do equipamento foram realizadas medidas utilizando as proteínas BSA - albumina de soro bovino, a distância amostra-detector de 339 mm e Ferredoxina, a distância amostra-detector de 739 mm. Para as medidas utilizamos tampão fosfato pH 8.0 (50 mM fosfato, 300 mM NaCl, 10% Glicerol) às concentrações de 2.5 mg/mL e 5 mg/mL.

As curvas de espalhamento das soluções com as proteínas e os tampões foram coletadas em 4 etapas de 30 minutos para monitoramento dos danos causados pela radiação à amostra, além da estabilidade do feixe. Devido ao sistema estudado apresentar espalhamento isotrópico e a geometria utilizada na colimação do feixe permitir o espalhamento coerente dos raios X a esquerda e a direita do feixe direto, é possível medirmos experimentalmente duas curvas centro simétricas de SAXS, do qual poderemos obter a média para melhor estatística dos dados.

O programa SAXSTRAT1, elaborado no IFSC em colaboração o aluno do ICMC Thiago Bueno, altera o eixo da abcissa de número de canais para q (A^{-1}) e inverte em relação a $q=0$, os dados a esquerda do feixe direto, para posterior média com os dados a direita do feixe direto. Posteriormente, procedimento padrão foi utilizado: o espalhamento da solução tampão foi subtraído da curva de espalhamento da solução de proteína e a diferença foi normalizada pela concentração protéica e pela resposta não homogênea do detector. O método de transformada inversa de Fourier implementado no programa Gnom (SEMENYUK; SVERGUN, 1991) (SVERGUN, 1992), foi utilizado para obtenção da $p(r)$ - função de distribuição de distâncias e do R_g - raio de giro. O efeito de deformação na curva, devido à altura e largura da janela de entrada do detector e aos parâmetros do feixe foram adequadamente corrigidos. Simulações de espalhamento com estruturas do banco de dados de proteínas foram realizadas utilizando o

programa Crysol (SVERGUN; BARBERATO; KOCH, 1995), assim os dados experimentais de SAXS puderam ser comparados com estruturas de alta resolução conhecidas.

3.1.3 Resultados

3.1.3.1 Alinhamento do equipamento

Monocromador

O alinhamento do monocromador foi necessário para que os espelhos tocassem lateralmente o feixe. Desta forma obteve-se dois feixes paralelos, o feixe branco a esquerda, contendo todos os comprimentos de onda do espectro de raios X do Cu e o K_{α} a direita, amplificado pelos espelhos. Após o fechamento da fenda ao fim da câmara do monocromador, permitiu-se que somente o K_{α} seja propagado, sendo este um feixe monocromático. As imagens da figura 3.11 foram capturadas com uma câmera para visualização de raios X.

Figura 3.11 - Imagens do feixe de raios X obtidas durante o alinhamento do equipamento. Na imagem da esquerda verificamos o feixe branco contendo todos os comprimentos de onda de raios X do Cu e o feixe com comprimento de onda do K_{α} do Cu. Na imagem da direita, temos somente o feixe K_{α} do Cu, após o fechamento da fenda de saída da câmara do espelho monocromador.

Sistema de colimação e porta-amostra

O sistema de colimação utilizado produz um feixe linha, o feixe é colimado de modo a não tocar as paredes do porta-amostra, um filme de raios X foi posicionado para verificar o perfil do feixe na altura do porta-amostra.

Figura 3.12 - (A) Cella do porta-amostra, e câmara para exposição de filme. (B) Filme de raios X demonstrando o perfil do feixe na posição do porta-amostra.

Na figura 3.12B pode-se verificar que o porta-amostra está alinhado de modo que o feixe passe livre pelas janelas de mica.

3.1.3.2 Correção da deformação da curva de intensidade de SAXS

Medida do perfil do feixe

O perfil obtido para a altura do feixe no plano de detecção pode ser visto abaixo:

Figura 3.13 - Medida experimental do perfil da altura do feixe de raios X, obtido no plano de detecção.

De acordo com o modelo do trapézio (figura 3.10), para distância de 739 mm $AH + LH = 19.48$ mm e $AH - LH = 2.77$ mm, assim podemos determinar o valor de $AH = 11.12$ mm e $LH = 8.35$ mm.

A janela do detector possui fenda de altura igual a 8 mm. Experimentalmente chegamos a um valor de 8.35 mm, a diferença neste valor se deve a além da altura da janela do detector, ao perfil trapezoidal intrínseco de um feixe de raios X colimado com um sistema de fendas paralelas.

Estes valores, assim como o valor de resolução do detector e largura do feixe serão utilizados para correção da deformação causada na curva por estes parâmetros.

O mesmo procedimento foi realizado para a distância de 339 mm, estando os valores responsáveis pela deformação nas curvas de espalhamento tabelados abaixo:

Tabela 3.1 - Parâmetros responsáveis pelo efeito de deformação nas curvas de SAXS.

Distância/Parâmetros	339 mm	739 mm
Altura do feixe (AH)	9.00 mm	9.19 mm
Altura da janela do detector (LH)	8.05 mm	8.35 mm
Largura do feixe (AW)	0.6 mm	0.6 mm
Resolução do detector (LW)	0.05343 mm	0.05343 mm

3.1.3.3. Experimento padrão para caracterização do equipamento.

A média das curvas de BSA a 2.5 mg/mL e 5 mg/mL à distância amostra-detector de 339 mm, de ferredoxina a 2.5 mg/mL e 5 mg/mL à distância amostra-detector de 739 mm e dos seus tampões são mostradas na figura 3.14.

Figura 3.14 - Intensidade de espalhamento em função do vetor de espalhamento q . (A) BSA medida a distância de 339 mm. (B) ferredoxina medida a distância de 739 mm.

Os intervalos em q para as medidas nas distâncias de 339 mm e 739 mm, foram respectivamente $0.023 \text{ \AA}^{-1} < q < 0.5 \text{ \AA}^{-1}$ e $0.01 \text{ \AA}^{-1} < q < 0.25 \text{ \AA}^{-1}$.

Na figura 3.15(A) são mostradas as curvas de espalhamento de ferredoxina a 5 mg/mL corrigida pelo efeito de deformação e a curva originada da simulação da estrutura cristalográfica do monômero de ferredoxina pdb id: 2RC5 utilizando o programa Crysol. Na figura 3.15(B) são mostradas suas $p(r)$.

Figura 3.15 - (A) Curvas de espalhamento corrigidas pelo efeito de deformação de ferredoxina a 5 mg/mL (B) Função de distribuição de distâncias para ferredoxina obtidas no IFSC. Pontos com barras de erros são os dados experimentais corrigidos pelo efeito de deformação da curva e a linha azul é o espalhamento simulado para o monômero de ferredoxina pdb id:2RC5.

Os parâmetros estruturais obtidos experimentalmente no IFSC e a comparação com a estrutura do banco de dados de proteínas podem ser vistos na tabela abaixo:

Tabela 3.2 - parâmetros estruturais da ferredoxina obtidos por SAXS em comparação com Ferredoxina cristalográfico.

Parâmetros/Amostra	ferredoxina 5 mg/mL*	ferredoxina Cristalográfico†
Dmax (Å)	65.00 ± 5.00	61.59
Rg (Å)	20.95 ± 0.11	19.27
Discrepância (chi)	-	1.33¶
Resolução (Å) ‡	24.93	-

* calculado a partir dos dados experimentais.

† parâmetros obtidos do modelo cristalográfico de ferredoxina pdb id :2RC5 (Nascimento et al, 2007)

¶ Parâmetro de discrepância entre as curvas do modelo cristalográfico e da proteína a 5 mg/mL

‡ Resolução = $2\pi/q_{\text{máx}}$

3.2 Linha de SAXS do Laboratório Nacional de Luz Sincrotron

Com exceção dos resultados apresentados na figura 5.17 para o DBD hTR β , que foram medidos na atual SAXS 2 com detector bidimensional, os resultados apresentados nesta tese foram medidos na linha de SAXS do LNLS (SAXS1) (KELLERMAN et al, 1997).

A instrumentação de SAXS utilizada é descrita resumidamente abaixo:

Figura 3.16 - Principais componentes da linha de SAXS do LNLS. (1) espelho para focalização vertical do feixe; (2) cristal de silício para monocromatização e focalização horizontal do feixe; (3) sistema de colimação; (4) porta-amostra; (5) detector de raios X. Uma visão lateral do equipamento é mostrada na parte superior da figura e outra visão superior do equipamento é mostrada na parte inferior da figura (KELLERMAN et al, 1997).

Os principais componentes da linha de SAXS do LNLS são:

(1) um espelho cilíndrico banhado a ouro para focalização vertical do feixe;

(2) um cristal de silício (reflexão 111) para monocromatização e focalização horizontal do feixe, a ótica monocromadora permite um feixe monocromático num espectro de raios X que

pode variar de 1 Å a 2 Å. Foram utilizados para os experimentos com proteínas em solução, $\lambda=1.488$ Å;

(3) um sistema de colimação composto de 3 fendas de tungstênio, sendo as duas primeiras fendas responsáveis pela colimação horizontal e vertical do feixe e a terceira (fenda parasita) responsável por minimizar o espalhamento causado pelas duas primeiras;

(4) porta-amostra para solução de proteínas com micas paralelas;

(5) detector unidimensional sensível a posição.

4 Procedimento e resultados de determinação do estado oligomérico de proteínas em solução utilizando SAXS em escala relativa

Resumo

A metodologia apresentada neste capítulo permite obter informação acerca do estado oligomérico de proteínas em solução, desde que o sistema seja monodisperso e diluído. A ferramenta possui precisão de 90% no cálculo da massa molecular, sem a necessidade de se obter as curvas de SAXS em escala absoluta.

4.1 Introdução

Até o momento, para se obter a *MM* – massa molecular, utilizando dados de SAXS em escala relativa, era necessário medir uma proteína padrão para comparação de $I(0)$, e somente assim determinar o *MM* da proteína em estudo e conseqüentemente seu estado de oligomerização. (MYLONAS; SVERGUN, 2007). Os estudos apresentados neste capítulo contribuem para a base teórica de SAXS de proteínas em solução. Nossa contribuição está na determinação do volume em unidades absolutas ($\text{\AA}^3$, nm^3 , etc.) de proteínas em solução e conseqüentemente seu estado de oligomerização, utilizando somente a curva de espalhamento da proteína em unidades relativas. As simulações teóricas utilizando esferas de mesmo tamanho e 1148 proteínas do pdb foram realizadas durante o doutoramento de Hannes Fischer (FISCHER, 2005). Durante o presente estudo, 25 proteínas foram medidas experimentalmente, estas medidas foram utilizadas para validação do modelo. Os resultados aqui apresentados estão organizados no trabalho “Molecular weight of proteins in solution derived from SAXS measured on relative scale” a ser publicado.

4.2 Metodologia

Como apresentado na seção 1.2.2, temos um termo relativo à intensidade presente tanto no numerador como no denominador na equação 48 ($I(0)/Q = V/2\pi^2$), dessa forma, todas as características associadas a estas intensidades serão canceladas, permitindo o cálculo do volume em unidades absolutas. Assim, para um sistema monodisperso e diluído, o volume da macromolécula espalhadora pode ser determinado somente com uma curva de SAXS. No caso de uma mistura de partículas, um valor médio de V será obtido.

Uma vez que o volume é obtido, podemos determinar a massa molecular. Para isto, foi utilizado um valor para densidade de proteínas de 1.37 g/cm^3 , de acordo com os dados experimentais realizados por Squire e Himmel (1979) e Gekko e Noguchi (1979). O valor atribuído à densidade de proteínas é discutido em (FISCHER et al., 2004). Desta forma a MM pode ser obtida conforme a equação abaixo:

$$MW = 2\pi^2 \frac{I(0)}{Q} \rho \quad (64)$$

Contudo, a determinação de MM não é trivial, é necessário extrapolar a curva de intensidade a ângulo zero, para isto o método de Guinier é utilizado (GUINIER; FOURNET, 1955).

A primeira simulação teórica foi realizada para esferas rígidas de R_g no intervalo de $4.81 \text{ Å} \leq R_g \leq 48.05 \text{ Å}$. A intensidade de espalhamento foi teoricamente calculada para estas esferas pela equação a seguir (GLATTER; KRATKY, 1982).

$$I(q) = (\Delta\rho)^2 V^2 \left(3 \frac{\sin qR_g - qR_g \cos qR_g}{(qR_g)^3} \right)^2 \quad (65)$$

A partir das curvas de espalhamento simuladas, os valores de $I(0)$ e Q foram calculados, o último foi obtido com $q_{\text{máx}}$ de integração no intervalo de $0.2 \leq q_{\text{máx}} \leq 0.9 \text{ Å}^{-1}$. Foi realizado o cálculo de volume utilizando a equação 48. Os dados foram expressos em função do volume da esfera ($V = 4/3\pi r^3$), num intervalo de volume de $10^3 \text{ Å}^3 \leq V \leq 10^6 \text{ Å}^3$.

Uma segunda simulação foi realizada utilizando um conjunto de 1148 proteínas que foram selecionadas a partir de um banco de dados de proteínas (PDB - *protein data bank*) (BERMAN et al., 2000), utilizando um filtro otimizado para selecionar proteínas com $MM \geq 10 \text{ kDa}$, resolução $\geq 2.0 \text{ Å}$ e excluindo as proteínas com identidade sequencial $> 50\%$. Esta última restrição foi feita para evitar redundância estrutural. As curvas teóricas de SAXS foram

calculadas para todas as proteínas utilizando o programa Crysol (SVERGUN et al., 1995). Diversos parâmetros como diâmetro máximo $D_{\text{máx}}$, R_g , V e MM foram obtidos após o cálculo das curvas de espalhamento. As curvas foram integradas para diferentes valores de $q_{\text{máx}}$ num intervalo de $0.2 \leq q_{\text{máx}} \leq 0.4 \text{ \AA}^{-1}$, estes $q_{\text{máx}}$ são os comumente medidos em dados experimentais de SAXS. A partir das curvas simuladas de SAXS foi calculado o volume utilizando a equação 48. Os dados foram inseridos em um gráfico em função do volume calculado pelo Crysol. Foi possível realizar um ajuste linear nos dados, conforme a equação abaixo:

$$V = A(q_{\text{máx}}) + B(q_{\text{máx}}) \cdot (2\pi^2 \frac{I(0)}{Q}) \quad (66)$$

As constantes, linear A e angular B foram extraídas em diferentes intervalos de q . Desta forma para o cálculo experimental de volume a partir de $I(0)/Q$, é necessário uma correção pelas constantes A e B no valor do $q_{\text{máx}}$ medido.

Para verificação experimental da metodologia, 25 diferentes proteínas em estudo foram selecionadas. Utilizando a relação $I(0)/Q$ e as constantes $A(q_{\text{máx}})$ e $B(q_{\text{máx}})$ determinadas pela simulação teórica, e de acordo com a equação 66, pode-se determinar o volume da proteína. Utilizando 1.37 g/cm^3 para densidade de proteínas, obtém-se MM . A precisão da medida foi tomada como a razão entre o MM de referência (MM_{real}) do oligômero da proteína em estudo e o MM calculado a partir da curva de SAXS ($MM_{\text{calculado}}$), comprovando a eficiência experimental da metodologia apresentada.

4.3 Resultados

Primeiramente foi realizada simulação teórica com esferas rígidas. A figura 4.1 mostra a relação entre o volume calculado pela relação $2\pi^2 I(0)/Q$ e o volume da esfera ($V = 4/3\pi r^3$).

Para $q_{\text{máx}} \geq 0.2 \text{ \AA}^{-1}$ e $V \geq 10^4 \text{ \AA}^3$ pode-se verificar um comportamento linear, é importante ressaltar que o raio de giro das esferas utilizadas vai de $4.81 \text{ \AA} \leq R_g \leq 48.05 \text{ \AA}$, o qual corresponde a esferas com volumes comuns a maioria das proteínas. Contudo se o $q_{\text{máx}} \leq 0.2 \text{ \AA}^{-1}$ há uma discrepância significativa entre os volumes. Esferas com $V \geq 10^5 \text{ \AA}^3$ apresentam comportamento linear mesmo para $q_{\text{máx}} \leq 0.2 \text{ \AA}^{-1}$ devido ao espalhamento estar concentrados em ângulos mais baixos.

Figura 4.1 - Volume calculado para esferas de diferentes R_g ($V = 4/3\pi R^3$) contra o volume calculado pela relação $2\pi^2 I(0)/Q$ a partir das curvas de $I(q)$ calculadas para estas esferas. A equação 45 foi calculada para diferentes $q_{\text{máx}}$. Os intervalos mostrados vão de $1 \times 10^3 \text{ \AA}^3 \leq V \leq 10^6 \text{ \AA}^3$ e $0.1 \text{ \AA}^{-1} \leq q_{\text{máx}} \leq 0.9 \text{ \AA}^{-1}$.

Uma segunda simulação teórica foi realizada com a integração das intensidades a partir das estruturas das proteínas do PDB, utilizando diferentes $q_{\text{máx}}$ na simulação. O volume calculado pelo método foi colocado em função do volume calculado pelo programa Crysol. Ajuste linear foi realizado nos dados.

Figura 4.2 - Volume calculado com o programa Crysol para as 1148 proteínas do PDB em função do volume calculado a partir das curvas simuladas de SAXS para as mesmas 1148 proteínas utilizando a relação $2\pi^2 I(0)/Q$ para diferentes valores de $q_{\text{máx}}$. Os valores são mostrados em intervalos de $q_{\text{máx}}$. 0.2, 0.3 e $0.4\text{\AA}^{-1}$. A linha tracejada representa o volume esperado para as proteínas.

A partir da figura 4.2, as constantes linear $A(q_{\text{máx}})$ e angular $B(q_{\text{máx}})$ foram extraídas para diferentes intervalos de $q_{\text{máx}}$. Estas constantes são funções de $q_{\text{máx}}$ e serão utilizadas como parâmetros de correção para o volume calculado a partir de (48) (figura 4.3).

Figura 4.3 - Coeficientes obtidos a partir da reta obtida na figura 4.2 (A) coeficiente linear contra o valor de $q_{\text{máx}}$ (B) coeficiente angular contra o valor de $q_{\text{máx}}$.

Após a determinação das constantes A e B , foi necessário validar experimentalmente o método. Como exemplo, será apresentado como determinar o estado de oligomerização da ferredoxina (CECARELLI, et al, 2004), utilizando somente os dados de SAXS em escala relativa. O mesmo procedimento foi realizado para as outras proteínas estudadas.

O primeiro passo trata-se da extrapolação dos dados de ferredoxina a $q_{\min} = 0 \text{ \AA}^{-1}$ utilizando o programa Gnom (SEMENYUK; SVERGUN, 1991) (SVERGUN, 1992). Correção da deformação dos dados, o qual foi discutido na seção 3.1.1.2. é muito importante para validarmos a função de forma medida experimentalmente. A figura 4.4(A) mostra a curva de SAXS de ferredoxina medida experimentalmente em escala relativa com o ajuste extrapolado a q igual a zero e normalizado para satisfazer a condição $I(0)$ igual a um. A figura 4.4(B) mostra $I(q)q^2$ em função de q , o qual pode ser calculado o Q a partir da equação (45).

Para se obter o valor de V seria necessário obter Q num intervalo $0 \leq q \rightarrow \infty$, como isso é impossível visto que as informações experimentais vão somente a $q \leq 0.3 \text{ \AA}^{-1}$, a integração de Q foi realizada nos intervalos $0 < q \leq 0.2 \text{ \AA}^{-1}$ e $0 < q \leq 0.3 \text{ \AA}^{-1}$.

Figura 4.4 - (A) Intensidade de espalhamento para Ferredoxina. (B) Intensidade vezes (q^2) para Ferredoxina. Os dados experimentais são dados em pontos e o ajuste do Gnom extrapolado a $q=0$ em linha preta.

A tabela 4.1 mostra o valor de Q , V , MM e a precisão dos valores obtidos. O valor calculado para MM da Ferredoxina pela integração (45), utilizando $q_{\max} = 0.3 \text{ \AA}^{-1}$ possui um erro menor que 10%. O valor de 1.37 g/cm^3 , em outras unidades $0.82 \text{ kDa/ \AA}^3$ foi utilizado para o cálculo de MM (FISCHER et al., 2004).

Tabela 4.1 - Volume, MM calculados e razão entre MM calculado e esperado (34.4 kDa) utilizando vários valores de $q_{\max}$ para ferredoxina.

$q_{\max} (\text{\AA}^{-1})$	$Q (\times 10^{-4})$	$2\pi^2 I(0)/Q$	Volume ($\text{\AA}^3$)	MM (kDa)	razão
0.2	2.38	82937.85	42952	35.7	0.96
0.3	2.76	71518.87	42684	35.4	0.97

A tabela 4.2 mostra o MM obtido e sua respectiva precisão para um conjunto de 25 proteínas utilizando diferentes valores de $q_{\max}$.

Tabela 4.2 - Volume, MM calculados e razão utilizando vários valores de $q_{\max}$ para as 25 proteínas estudadas. Os resultados são mostrados em ordem crescente de MM .

Proteína	MM (kDa) esperado		MM calculado por SAXS (kDa) para diferentes $q_{\max}$			Razão		
	Monomero	Oligomero	0.2	0.3	0.4	0.2	0.3	0.4
Lisozima	14.60	14.60	13.8			1.06		
Prot2	17.50	17.50	16.6	16.8	16.9	1.05	1.04	1.03
Integrina	21.60	21.60	25.5	23.0		0.85	0.94	
Interleucina (OLIVEIRA NETO et al, 2008)	16.84	33.68	46.3	32.1		0.73	1.05	
Ferredoxina (NASCIMENTO et al, 2007)	34.40	34.40	35.7	35.4		0.96	0.97	
eFI5A (HANAWA-SUETSUGU, 2004)	20.22	40.44	43.80	37.64		0.92	1.07	
PPAR γ DBD-LBD	42.02	42.02	44.5			0.94		
Alfa Gal	48.76	48.76	52.5			0.93		
hisNGFIB LBD (CALGARO et al, 2007)	24.50	49.00	52.7			0.93		

Continua

Continuação

Prot1	50.00	50.00	50.1			1.00		
HNL	27.10	54.20	50.8	51.5		1.07	1.05	
hisRXR α hisPPAR γ LBD	30.18/32.08	62.26	65.8			0.95		
DM43	32.39	64.78	78.3	63.9		0.83	1.01	
BSA	66.00	66.00	68.5	61.6		0.96	1.07	
Interleucina-22 (OLIVEIRA NETO et al, 2008)	16.84	67.36	85.6	64.3		0.79	1.05	
RXR α PPAR γ DBD-LBD	37.45/42.02	79.47	87.1			0.91		
IL-22/IL-22R1 (OLIVEIRA NETO et al, 2008)	39.95	79.90	97.6	84.2	75.5	0.82	0.95	1.06
TR β DBD-LBD with T3 (FIGUEIRA et al, 2007)	41.20	82.40	85.4	75.2		0.96	1.10	
Jararhagin	46.85	93.70	110.0	99.8	102.6	0.85	0.94	0.91
Camptosemin	25.97	103.88	100.4	95.1		1.03	1.09	
PEPCK	58.00	116.00	114.9			1.01		
PFK-2 com ATP	34.00	136.00	131.2	134.1	130.0	1.04	1.01	1.05
Prot3	41.00	164.00	157.2	163.1	167.8	1.04	1.01	0.98
TR β DBD-LBD	41.20	164.80	159.2			1.04		
Prot4	26.70	213.60	222.3	218.2		0.96	0.98	

A figura 4.5 mostra a precisão das MMs obtidas para as proteínas estudadas utilizando a metodologia apresentada. De acordo com os resultados, a *MM* pode ser determinada com um erro menor que 10%.

Figura 4.5 - Razão entre a massa molecular real (MM_{real}) e calculada ($MM_{calculado}$) contra a massa molecular do oligômero (MM_{real}) para 25 proteínas estudadas.

4.4 Conclusão

Os resultados apresentados dão suporte experimental a ferramenta, a determinação do estado oligomérico de proteínas em solução pode ser realizada e a MM calculada com erro de 10%. É importante lembrar que é necessário que o sistema em estudo seja monodisperso e diluído, sistemas concentrados acrescentariam efeitos de interferência no fator de forma alterando o valor de $I(0)$ e de Q . A formação de agregados em solução também pode ser detectada com a ferramenta, visto que este efeito alteraria consideravelmente a função de forma.

5 Caracterização do domínio de ligação ao DNA da isoforma β do receptor tireoideano (DBD hTR β)

Resumo

A sequência codificadora para o DBD hTR β - domínio de ligação ao DNA da isoforma β do receptor tireoideano humano foi sub-clonada no vetor de expressão pET28a(+). A expressão de His₆-DBD hTR β foi feita a 22° C em meio LB. O lisado límpido contendo a proteína recombinante solúvel foi submetido a purificação por afinidade e gel filtração, o que resultou em uma preparação de His₆-DBD hTR β com pureza acima de 90%. Após clivagem da cauda de His₆ com a protease trombina bovina, DBD hTR β foi submetido aos experimentos de crosslink, fluorescência e SAXS. Após incubação com o elemento responsivo F2, o complexo foi submetido à cristalização. Embora os experimentos de cristalização não tenham gerado cristais que permitissem difração, os estudos em solução mostraram que na presença do F2, ocorre a formação do complexo F2-DBD hTR β com equivalência estequiométrica de dois monômeros de hDBD TR β para cada fita dupla do F2 (2:1). Este trabalho foi realizado com extensa colaboração da Dra. Maria Auxiliadora dos Santos, Dr. Marcos Calgaro e Dra. Ana Carolina M. Figueira, ambos do IFSC.

5.1 Introdução

5.1.1 Os receptores nucleares

Os receptores nucleares são proteínas reguladoras responsáveis pela transcrição de genes-alvo, mediando os efeitos pleiotrópicos dos seus respectivos ligantes. Estes receptores agem como fatores de transcrição, agindo diretamente através da associação física com uma grande variedade de reguladores hormonais ou de outros tipos, assim como sinais metabólicos, estando intimamente relacionados a diversas doenças, principalmente a vários tipos de câncer, sendo, por isso, considerados “alvos” para novas terapias. Os grupos de agonistas (glucocorticóides, estrogênios, antiestrogênios, vitamina D, retinóides, androgênios, antiandrogênios e tiroxina) e antagonistas que atuam nestes receptores, constituem hoje a classe de fármacos mais procurada para a prática médica, sendo, portanto, um dos importantes alvos para o desenvolvimento de medicamentos. Estes receptores são proteínas modulares, possuindo três domínios principais, o domínio amino-terminal, que não é conservado entre os membros da superfamília, é isoforma-específico e desempenha a função de trans-ativação (AF-1 – função de ativação 1), a qual é específica para região promotora, região DBD e tipo celular; o DBD - domínio de ligação ao DNA, que possui alta identidade sequencial entre os diversos receptores e é o responsável tanto pela ligação específica do receptor a sequência de DNA alvo, assim como possui fraca capacidade de dimerização; e o LBD - domínio de ligação ao ligante (GRONEMEYER; LAUDET, 1995).

5.1.1.1 Detalhes da ligação do DBD aos elementos responsivos do DNA

O domínio de ligação ao DNA (varia entre 70 a 80 resíduos de aminoácidos) é o domínio mais conservado entre os membros da superfamília dos receptores nucleares. Este domínio é rico em resíduos de cisteína, as quais coordenam a formação de dois dedos de zinco. Ele possui diversos elementos sequenciais chamados caixas-P, -D, -T e -A, que são caracterizados por: (1) especificidade de ligação ao DNA, (2) interface de dimerização e (3) contatos com esqueleto do DNA e resíduos flanqueando a sequência de reconhecimento do DNA (GRONEMEYER; LAUDET, 1995) (LAUDET; GRONEMEYER, 2002), (CHAMBON, 1996).

Figura 5.1 - Ilustração esquemática do RXR DBD. As caixas ilustram regiões envolvidas no processo de seleção do elemento responsivo. A caixa-P é parte da hélice de reconhecimento (hélice a, formada por linha tracejada), trocando os resíduos EGA do ER com os correspondentes resíduos GSV do GR muda a especificidade de reconhecimento ERE/GRE. A caixa-D é responsável pela seleção Pal3/Pal0 para os receptores Estrógeno e Tireoideano e contribuem para a interface de homodimerização do ER e GR DBD. A caixa-T forma α hélice (hélice c) e corresponde a superfície de dimerização do RXR homodímero. A caixa-A em solução CI e CII são dois motivos dedos de zinco. PRF, região pré “finger”. Figura extraída de (RASTINEJAD et al, 1995).

Em adição a função de ligação ao DNA, no ER – receptor do estrogênio (SCHWABE et al, 1993) e no GR –receptor de glucocorticoide (LUIZI, 1991), este domínio também possui uma interface de dimerização (D-box) entre os resíduos 38-45, (região menos conservada do DBD).

Enquanto alguns membros da superfamília dos receptores nucleares se ligam ao DNA como monômeros (MEINKE; SIGLER, 1999), a maioria dos membros age como dímeros, incluindo o receptor tireoideano, o receptor do ácido retinóico e o receptor de vitamina D, que são aptos de se ligar como homo ou heterodímeros. Outros receptores ligam-se ao elemento responsivo somente como homodímeros, dentre os quais estão o ER e o GR, mas na ausência do elemento responsivo estes receptores são monoméricos em solução (HARD et al, 1990).

O controle da transcrição dos genes ocorre por ligação efetiva de proteínas reguladoras em sítios específicos do DNA. O reconhecimento de sítios regulatórios é efetuado por complementariedade estrutural entre o DNA e proteína por contatos específicos estabelecidos por interações eletrostáticas, pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas (MANDEL-GUTFREUND et al, 1995). Estudos estruturais de complexos DNA-proteína indicam que o reconhecimento específico é realizado por motivos estruturais distintos. Baseado nestes motivos estruturais as proteínas podem ser classificadas em famílias (PABO; SAUER, 1992).

Os receptores nucleares agem basicamente como fatores de transcrição regulados pelo hormônio e se ligam no promotor dos genes-alvo influenciando diretamente a taxa de transcrição. No promotor dos genes regulados por estes hormônios encontram-se seqüências de bases que são responsáveis pelo reconhecimento específico do receptor, as quais compõem os chamados elementos responsivos ao hormônio (HREs – elementos responsivos dos hormônios). Estes HREs são formados pelo motivo hexamérico 5'-PuGGTCA-3' (Pu = A ou G). O processo de dimerização destes receptores é um mecanismo geral que objetiva o aumento da afinidade e especificidade de ligação ao HRE, além de aumentar a diversidade de elementos de resposta. O aumento em afinidade e especificidade se dá porque a dimerização promove ligação cooperativa ao DNA, além de que há uma menor freqüência de HREs contendo hexâmeros duplicados separados por um espaçamento determinado, em relação aos meio-sítios. Desta forma, Os

hexâmeros HREs podem estar organizados em diferentes orientações (direta, palindrômica ou palindrômica invertida) e separados por um número variável de nucleotídeos (GLASS, 1994). O TR – receptor do hormônio tireoidiano, RAR – receptor do ácido retinóico, VDR – receptor da vitamina D; e o PPAR - receptor ativador da proliferação de peroxissomos, formam preferencialmente heterodímeros com o receptor RXR – receptor do ácido retinóico X e se ligam aos HREs em DR - repetições diretas, com espaçamentos que estão relacionados com a especificidade da interação; homodímeros de RXR se ligam à DR com espaçamento de 1 nucleotídeo (ARANDA; PASCUAL, 2001). Os receptores de esteróides e dos hormônios tireoidianos se ligam como homodímeros em repetições do tipo palíndromo com espaçamentos diversos (GLASS, 1994). O homodímero do receptor TR também é capaz de reconhecer um motivo organizado como palíndromo invertido separado por 6 nucleotídeos (F2) (ARANDA; PASCUAL, 2001). Alguns receptores órfãos reconhecem elementos de resposta compostos de meio-sítio ligando-se, desta maneira, como monômeros. O receptor órfão NGFI-B –proteína B induzida pelo fator de crescimento neural pode também se heterodimerizar com RXR e se ligar ao elemento do tipo DR5 (PERLMANN; JANSSON, 1995) (FORMAN et al, 1995) (Figura 5.2).

Figura 5.2 - Elementos de resposta a receptores nucleares.

A sequência de reconhecimento conservada é 5' - PuGGTCA - 3' (setas indicam a direção 5' para 3'), a qual, juntamente com dois As na posição 5', é o elemento de resposta para o receptor órfão NGFI-B. Eventos de mutação e duplicação geraram PALx - palíndromos simétricos e IPx - palíndromos invertidos, assim como DRx - repetições diretas polares, com x pares de bases separando os dois meios sítios. PAL3 é o elemento de resposta ao estrógeno (ERE), enquanto que PAL0 corresponde ao elemento de resposta ao hormônio tireoidiano (TRE). Uma única mutação na posição 4 da sequência conservada, mudando T para A, forma elementos PAL3 de resposta a glucocorticóides (GRE), elemento o qual também é reconhecido pelos receptores de andrógeno, progesterona e mineralocorticóide. É importante ressaltar que muitos elementos de resposta estão longe do ideal e frequentemente um dos meios sítios contém uma ou mais mutações. Enquanto que os elementos PAL são reconhecidos por homodímeros, os elementos DRs podem se ligar tanto a homodímeros quanto heterodímeros com a especificidade dada, entre outros, pela sequência espaçadora. Os receptores posicionados na porção 3' fazem contatos com a cavidade menor do DNA na região espaçadora. Alguns elementos do tipo IP são elementos de resposta para homodímeros de TR IP6 (F2) e heterodímeros de TR-RXR. Figura extraída de (LAUDET; GRONEMEYER, 2002),

5.1.1.2 Os Receptores Tireoideanos

Os hormônios tireoideanos, em particular o T_3 - triiodotironina regulam um grande número de processos biológicos em vertebrados, incluindo metamorfose, desenvolvimento, crescimento, metabolismo e homeostase. O maior mediador do sinalizador T_3 são os receptores tireoideanos. Em mamíferos TRs são codificados por dois genes, $TR\alpha$ e $TR\beta$, estes que sofrem processamento alternativo gerando os subtipos: $TR\alpha_1$, $TR\alpha_2$, $TR\beta_1$ e $TR\beta_2$. Para função de reguladores

transcricionais, TR α e TR β ligam-se aos TREs – elementos responsivos do T₃, na região promotora dos genes suscetíveis contendo o sítio AGGTCA. Alta afinidade de TRs por estes sítios de ligação requer a heterodimerização com RXRs - receptores do ácido retinóico X, o qual torna a transcrição ativa. Em adição, a função de ativação da transcrição, TRs tem sido reportados como repressores transcricionais quando ligados ao elemento responsivo palíndromo invertido espaçado por 6 pb, IR6, também chamado F2 (5'-TGACCTnnnnnnAGGTCA-3') (GLASS, 1994). Isto sugere que *in vivo*, homodímeros de TR, na ausência de RXR, tem função repressora na transcrição gênica (BANIAHMAD et al, 1990), (SAATCLOGLU et al 1993), (PIEDRAFITA et al, 1995).

5.2 Metodologia

5.2.1 Sub-clonagem do fragmento de DNA codificador do DBD hTR β

Existem dois subtipos do hTR β , hTR β 1 e hTR β 2, ambos os subtipos possuem DBD idênticos. Sendo assim, o DBD da isoforma β foi sub-clonado no vetor de expressão de procarioto, pET28a(+) (Novagen), que foi escolhido por permitir a adição de uma sequência de 6 histidinas (His₆) na posição N-terminal da proteína recombinante e, conseqüentemente, facilitar a posterior purificação da mesma.

Amplificação por PCR

Com o objetivo de sub-clonar o fragmento de DNA contendo a sequência do DBD hTR β (aa.102-212, 110 resíduos), realizamos PCR - reação em cadeia da polimerase, utilizando como molde a sequência de nucleotídeos do gene hTR β 1 que codifica uma proteína de 687 aa (número

no banco de genes AK096628). Para a amplificação, foram empregados iniciadores internos 5' (senso) e 3' (anti-senso) com sítios de digestão para as enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI*, respectivamente. As seqüências dos iniciadores sintetizados pela empresa Imprint® estão listadas na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 - oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação ds gene DBD hTRβ.

Fragmento	Oligos	Seqüência dos iniciadores
DBD hTR β	hTRβ senso	5' GAATTC <u>CATATG</u> GACAAGGACGAGCTCTGTG 3' <i>NdeI</i>
	hTRβ anti-senso	3' GGTAGCCCGTGTTCGGT <u>ATTGAGCTC</u> CGG 5' STOP <i>XhoI</i>

Os reagentes utilizados na amplificação estão listados na Tabela 5.2, juntamente com a enzima utilizada “Platinum *Taq* Polymerase High Fidelity” Invitrogen®.

Tabela 5.2 - Reagentes utilizados na reação de PCR.

Mistura da reação de amplificação	Volume (μl)	Concentração final
Tampão PCR [10X] sem Mg	5,0	1X
dNTPs 10mM (A, G, C, T)	1,0	0,2mM cada
MgSO ₄ 50mM	2,0	2,0mM
Oligonucleotídeo <i>sense</i> 100pmol/ul	1,0	2μM
Oligonucleotídeo <i>antisense</i> 100pmol/ul	1,0	2μM
DNA molde	1,0	100ng
Platinum <i>Taq</i> DNA polimerase (5U/μl)	0,5	2,5U
H ₂ O milliQ autoclavada q.s.p.	38,5	
Volume final da reação	50,0	

O fragmento contendo o DBD hTR β foi amplificado de acordo com o programa estabelecido na Tabela 5.3, utilizando-se o termociclador PTC-100TM - controle de temperatura programável (MJ Research Inc.).

Tabela 5.3 - Protocolo do programa de PCR (com “Platinum *Taq* DNA Polymerase High Fidelity”) utilizado pelo termociclador PTC-100TM *Programable Thermal Controller*.

Programa de PCR						
Número de						
ciclos	1x	30x				
T ^o C	94	94	55	68	68	4
Tempo	3min	30seg	30seg	90seg	5min	infinito

Primeiramente a dupla fita de DNA é desanelada a 94°C, em seguida a temperatura foi a 55°C para anelamento dos iniciadores, e para finalizar o ciclo a temperatura foi a 68°C para polimerização das dNTPs, os ciclos foram repetidos até o repouso da reação em 4°C. Os produtos da reação de amplificação contendo 330 pb foram analisados por eletroforese em 1% gel de agarose (BioRad[®]), em tampão TAE 1X (Tris-acetato 40mM e EDTA 1mM, pH 8,0), as bandas de interesse foram excisadas e purificadas do gel preparativo utilizando-se o “kit Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System” Promega[®], conforme protocolo estabelecido pelo fabricante.

Adição de dATPs aos amplicons do DBD hTR β , e subclonagem no vetor pGEM-T.

A construção que continha a sequência do DBD hTR β foi inserida no vetor de propagação pGEM[®]-T (Promega). Pelo fato do vetor pGEM[®]-T possuir terminais 3'-T coesivos se fez necessário a adição de desoxiadenosinas nas extremidades do inserto. Para isto, o DBD hTR β amplificado foi incubado no termociclador PTC-100TM *Programable Thermal Controller* (MJ

Research Inc.) durante 15 minutos a 70 °C na presença de dATPs e da enzima Taq DNA polimerase. Tabela 5.4.

Tabela 5.4 - Reagentes usados na reação de adição de dATP no gene DBD hTR β .

Reagentes	Volume (μ l)	Concentração final
DBD hTR β	5,0	-
MgCl ₂	1,0	-
Tampão recombinante [10X]	1,0	1X
dATP	2,0	0,2 μ M
Taq DNA Polimerase	1,0	2,5U

Após a adição de desoxiadenosinas ao fragmento amplificado do DBD hTR β , foi feita a reação de ligação do inserto adenilado no vetor pGEM[®]-T (Promega), utilizando-se a enzima T₄ Ligase (Invitrogen). Tabela 5.5. A ligação foi feita por 16 horas à temperatura de 4° C.

Tabela 5.5 - Reagentes usados na reação de ligação do fragmento do DBD hTR β adenilado no vetor pGEM[®]-T (Promega).

Reagentes	Volume (μ l)	Concentração final
DBD hTR β com dATP	3,0	-
pGEM [®] -T (Promega)	1,0	-
Tampão recombinante [2X]	5,0	1X
T ₄ Ligase (Invitrogen)	1,0	1U

Transformação do vetor pGEM®-T-DBD hTR β em células competentes de *Escherichia coli* DH5 α

O DNA recombinante pGEM®-T-DBD hTR β foi utilizado para transformar através de choque térmico células competentes *E. coli* DH5 α . Na transformação empregou-se 50 μ l de células competentes e 10,0 μ l do produto da reação de ligação, que continha o plasmídeo recombinante pGEM®-T-DBD hTR β . A reação foi incubada por 30 minutos no gelo e em seguida submetida a 42°C por 90 segundos, seguidos de 5 minutos novamente no gelo. Após este período, acrescentou-se as células 250 μ l de meio SOC (2% de bactotripton, 0,5% de extrato de levedura, NaCl 10mM, KCl 2,5mM, MgCl₂ 10mM, MgSO₄ 10mM, glicose 20mM, pH 6,8-7,0.), previamente aquecido para 37°C. O material foi então incubado por 1 hora a 37°C sob 200rpm de agitação e depois plaqueado em placa de Petri contendo meio de cultura LB - Luria-Bertani sólido (1% de bactotripton, 0,5% de extrato de levedura, 1% de NaCl, 1,5% de Agar, pH 7,5), antibiótico de seleção adequado para o vetor (ampicilina numa concentração final de 100 μ g/ml), 80 μ g/ml de XGAL e 0,5 M do indutor IPTG - isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo. A placa de Petri foi incubada por 16 horas a 37°C para se obter as colônias de bactérias transformadas. Foram detectadas visualmente dois padrões de coloração nas colônias, colônias azuis e colônias brancas. A coloração azul de algumas colônias, ocorre devido a expressão da β -Galactose, pela ligação das extremidades do vetor pGEM®-T com ausência de inserto.

Determinação das colônias recombinantes positivas.

Para a determinação das colônias recombinantes positivas foram escolhidas randômicamente cinco colônias brancas. As colônias foram crescidas em meio LB e respectivo antibiótico. Os plamídeos foram extraídos das células através de minipreparação plasmidial por lise alcalina. Os vetores recombinantes extraídos das cinco colônias foram então clivados com as

enzimas de restrição *Nde* I e *Xho*I (Invitrogen) para serem ligados no vetor de expressão pET28a(+). A reação de clivagem foi realizada por 4 horas a 37° C.

Tabela 5.6 - Reagentes utilizados nas reações de clivagem.

Reagentes	Volume (μl)	Concentração
Vetor (produto de mini-prep)	5,0	3,0μg/μL
Enzimas <i>Nde</i> I e <i>Xho</i> I	1,5 de c/ enzima	5U/μl
Tampão React 2 [10X]	2,0	-
H ₂ O	13,0	-

Digestão do vetor plasmidial de expressão pET28a(+) e ligação com o gene DBD hTRβ.

O vetor de expressão pET28a(+) (Novagen) foi digerido com as enzimas de restrição *Nde*I e *Xho*I (Tabela 5.7) durante quatro horas em estufa a 37° C.

Tabela 5.7 - Reagentes usados nas reações de clivagem (*Nde*I e *Xho*I).

Reagentes	Volume (μl)	Concentração
inserto ou vetor	20,0	3,0
enzimas (<i>Nde</i> I e <i>Xho</i> I)	1,5 de c/ enzima	7,5U <i>Nde</i> I e 15U <i>Xho</i> I
tampão React 2	3,0	
H ₂ O	4,0	

O produto foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1% (BioRad). A banda de interesse referente ao pET28a(+) (Novagen) foi purificada do gel preparativo utilizando-se o “kit

Concert™ Rapid Gel Extraction System” (Invitrogen). Uma vez concluída a reação de purificação, procedeu-se uma reação de ligação do inserto hDBD hTR β , previamente purificado no vetor pET28a(+) como descrito anteriormente.

Tabela 5.8 - Reagentes utilizados na reação de ligação com T₄ DNA Ligase (Invitrogen).

Reagentes	Volume (μ l)	Concentração
DNA plasmidial	2,0	100 ng/ μ l
inserto	5,0	50 ng/ μ l
tampão para Ligase	2,0	
enzima Ligase	1,0	1U

Transformação em células competentes de *Escherichia coli* DH5 α

Para a clonagem do vetor pET28a(+)-DBD hTR β , o DNA recombinante foi transformado em células competentes DH5 α utilizando-se 50 μ l de células competentes e 5,0 μ l do produto da reação de ligação, como descrito anteriormente. Placa de Petri foi montada com o material, colônias isoladas que cresceram, foram inoculadas em 5ml de meio LB líquido (1% de bactotripton, 0,5% de extrato de levedura, 1% de NaCl, pH 7,5), contendo o antibiótico kanamicina 30 μ g/ml. Estes inóculos foram deixados a 37°C, sob 250rpm de agitação por 16 horas e a identificação dos vetores recombinantes foi verificada utilizando-se a reação de PCR em nove colônias escolhidas ao acaso, das quais três das nove colônias escolhidas foram recombinantes positivos.

As colônias que continham plasmídeos recombinantes positivos foram inoculadas em LB e, em seguida, acrescidas de glicerol na proporção 4:1 (glicerol 65%, Tris-HCl 0,025M, pH 8,0 e MgSO₄ 0,1M) para serem estocadas a -80°C. Para determinação da sequência nucleotídica, foi realizada a extração do DNA plasmidial e posterior purificação com o *kit Wizard Plus SV*

Miniprep DNA Purification System (Promega). A sequência nucleotídica foi feita utilizando-se o *Kit BigDye-terminator* e o seqüenciador automático de DNA ABI377 (Perkin-Elmer). Os eletroferogramas resultantes foram analisados por alinhamentos feitos pelo programa “SEQMAN”, pertencente ao software “DNASTAR” (Lasergene Sequence Analysis Software – DNASTar). Estes alinhamentos possibilitaram a obtenção de uma única sequência consenso do gene, que foi submetida à comparação com as seqüências nucleotídicas depositadas no banco de dados NCBI. Para tanto, utilizou-se o programa “BLAST Sequences” (BLASTn - Basic Local Alignment Search Tool) (ALTSCHUL et al, 1997) para verificar a identidade entre a sequência recombinante (SeqMan) e as seqüências de genes depositadas no NCBI.

Transformação em células competentes de *Escherichia coli* BL21(DE3)

E. coli BL21(DE3) competentes foram transformadas com o DNA recombinante pET28a(+)-DBD hTR β como descrito acima. A designação DE3 indica que esta linhagem bacteriana, usada para expressão, contém o lisógeno do lambda DE3 que carrega o gene *lac I*, uma pequena porção do gene *lac Z* e o gene codificador da enzima T7 RNA polimerase sob controle do promotor *lacUV5*. Este promotor encontra-se constitutivamente reprimido pela proteína LAC I. Para sua ativação, adiciona-se IPTG, o qual, sendo análogo da lactose, se liga ao LAC I, promovendo mudanças conformacionais na estrutura desta proteína, que então se desprende do promotor, permitindo a transcrição da T7 RNA polimerase e consequentemente alta expressão da proteína recombinante.

5.2.2 Expressão do DBD hTR β em células competentes de *Escherichia coli* BL21(DE3)

Para os testes de expressão das células de *E. coli* BL21 contendo os plasmídeos recombinantes, pré-inóculos de 10,0 ml de meio LB líquido adicionados de kanamicina 50 $\mu\text{g/ml}$ foram incubados a 37°C, sob 250 rpm de agitação por 16 horas. Após o crescimento celular cada um destes pré-inóculos foi utilizado para inocular 1 L de meio LB pH 7,5 (10 g Triptona + 5 g Extrato de Levedura + 10 g NaCl) contendo Kanamicina 50 $\mu\text{g/ml}$, e em seguida, os inóculos foram mantidos sob 250 rpm de agitação a 37°C até as culturas atingirem uma densidade ótica de aproximadamente 0.6 quando medidas no comprimento de onda de 600nm. Neste momento, induziu-se o material com 1mM de IPTG e adicionou-se ZnSO_4 10 μM (para a formação do motivo estrutural dedo de zinco) mantendo-se as culturas sob 250 rpm de agitação e a 22°C. Aliquotas de 100 μl foram coletadas de hora em hora, durante 5 horas, após a indução. As alíquotas foram misturadas com 50 μl de tampão de amostra (TA 3X- Tris/HCl 2M, pH 6,8; SDS 6%; glicerol 30%; β -mercaptoetanol 15% e azul de bromofenol 0,01%) e fervidas por 5 minutos. Submeteu-se 15 μl das alíquotas à eletroforese em gel de poliacrilamida 15%, em condições desnaturantes (1), utilizando-se um sistema vertical Mini V 8.10 da Gibco-BRL. Como padrões de pesos moleculares foram utilizadas as seguintes proteínas (Sigma): albumina sérica bovina (66kDa), ovalbumina (45kDa), anidrase carbônica (29kDa), inibidor de tripsina de soja (20,1kDa) e citocromo c (12,4kDa). Ao final das corridas eletroforéticas os géis foram corados com “Coomassie blue” e descorados com ácido acético 10%.

Após as 5 horas de expressão todas as amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 6.000 rpm e os sobrenadantes descartados. Na proporção de 20 ml de tampão por litro de expressão, todos os precipitados foram ressuspenso em tampão fosfato pH 8,0 (50 mM tampão fosfato de potássio, 300 mM NaCl, 10% glicerol, 10 mM imidazol e 2 mM β -mercaptoetanol),

seguidos da adição de PMSF (1 mM) e lisozima (0.01 mg/ml). A completa lise celular foi alcançada por sonicação em um “550 Sonic Dismembrator- Fisher Scientific” e as amostras foram centrifugadas por 1 hora a 14.000 rpm a 4°C, a fim de separar a fração solúvel da insolúvel.

5.2.3 Purificação do domínio de ligação ao DNA do Receptor Tireoideano Isoforma β

5.2.3.1 Cromatografia por afinidade do domínio DBD do hTR β

Devido ao DBD hTR β estar sub-clonado no vetor pET28a(+), a proteína é expressa com uma cauda N-terminal de 6 histidinas. A presença desta cauda confere à proteína alta afinidade de ligação em resinas de cromatografia contendo íons de metal (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{3+}) quelados.

O primeiro passo de purificação empregado foi a cromatografia de afinidade por Ni^{2+} , utilizando-se a resina *TALON Superflow* (Clontech). A fração solúvel da lise celular (extrato) foi aplicada à resina de afinidade, previamente equilibrada com tampão fosfato pH 8,0 (50 mM tampão fosfato, 300 mM NaCl, 10% glicerol e 2 mM β -mercaptoetanol). A mistura foi incubada por 1 hora a 4°C sob agitação. Em seguida, a resina foi exaustivamente lavada com o tampão fosfato pH 8,0 (50 mM tampão fosfato, 300 mM NaCl, 10% glicerol, 10 mM Imidazol e 2 mM β -mercaptoetanol) e a resina centrifugada a 500 rpm por 5 min. a 4°C para retirada das proteínas que se ligaram fracamente à resina. Ao final deste processo, uma coluna de 20 mL foi montada com a resina e a proteína recombinante eluída com 9 volumes de coluna no tampão fosfato pH 8,0 mais 250 mM e 500 mM de imidazol, respectivamente.

5.2.3.2 Cromatografia por exclusão molecular

Um volume de 15 ml proveniente da eluição da coluna de afinidade foi concentrado num volume final de 2 mL, utilizando concentrador Amicon com corte de 10 kDa e aplicado na coluna de gel filtração previamente equilibrada com tampão 20 mM Hepes-Na pH 8,0 (20 mM Hepes-Na, 3mM DTT, 300mM NaCl e 5% Glicerol)., empregou-se uma coluna de gel filtração Superdex 75 HR 26/60 (Amersham-Bioscience), previamente calibrada com os kits de calibração de coluna de gel filtração para altos e baixos pesos moleculares (Amersham-Bioscience). Realizou-se eluição isocrática com 1,0 volume total de coluna em taxa de fluxo de 2 ml/min. com monitoramento à 280nm.

5.2.4 Digestão com trombina bovina

A Trombina é uma serino protease endolítica que seletivamente cliva ligações Arg-Gly do fibrinogênio para formar fibrina, resultando nos fibrinopeptídeos A e B. Os melhores sítios para clivagem de Trombina tem sido determinados como 1) A-B-Pro-Arg-||-X-Y onde A e B são aminoácidos hidrofóbicos e X e Y são aminoácidos não ácidos e 2) Gly-Arg-||-Gly.

O vetor pET28a(+), utilizado neste trabalho, possui o sítio Leu Val Pro Arg || Gly Ser de clivagem para Trombina. His₆DBD hTR β foi concentrado a 1 mg/ml (65,3 μ M, com base no monômero DBD TR β de 15.3 kDa) e clivado com trombina bovina na concentração de 1U trombina para cada 0.1 mg de proteína, a 18°C durante 4 horas. Os produtos da reação de clivagem, his₆ e DBD hTR β , foram submetidos a coluna de afinidade para separação.

5.2.5 Anisotropia de Fluorescência

O DBD hTR β possui em sua estrutura apenas 4 Tirosinas e nenhum Triptofano como fluoróforo natural. Sendo assim, para estudos de fluorescência foi utilizado DBD hTR β marcado com FITC – Isotiocianato de fluoresceína, a reação foi incubada a 18° C por 3 horas, com um excesso de três vezes de FITC em relação a proteína. A proteína marcada foi submetida à coluna “*Desalting HiTrap*” (GE healthcare) para retirar o excesso de FITC não ligado, com monitoramento de 495 nm para FITC e 280 nm para o DBD hTR β marcado. Um espectrofluorímetro ISS-PC1 (ISS, champaign, IL), montado em geometria "L". A excitação foi ajustada a 475 nm, e a emissão foi analisada com um filtro alaranjado WG3-69 de interrupção de onda curta (interrupção 50% em 520 nm). Os valores de anisotropia foram calculados pelo programa Vinci (ISS) de acordo com a equação

$$A = (I_{par} - I_{per}) / (I_{par} + 2I_{per}) \quad (67)$$

em que I_{par} e I_{per} são os valores de intensidade com os polarizadores de excitação e emissão orientados em paralelo ou perpendicular, respectivamente. A medida de anisotropia foi realizada a partir de DBD hTR β marcado em concentrações nM com adição de DBD hTR β em concentrações μ M. Para cada amostra, a anisotropia foi medida até que os erros absolutos fossem menores que 0.005. Os dados foram corrigidos por contribuições fracionárias da fluorescência sobre a anisotropia.

5.2.6 Crosslink Químico

Crosslink envolve a reação química de um reagente bifuncional com dois resíduos de aminoácidos dentro de uma mesma proteína, em subunidades adjacentes, ou entre duas proteínas que se associam entre si. O tamanho do braço espaçador entre os dois grupos funcionais pode ser

ajustado de maneira a favorecer ligações intramoleculares (espaçadores curtos, em geral 5Å) ou produtos intermoleculares (espaçadores longos, tipicamente 11 a 16Å). Os grupos funcionais em cada extremidade podem ser o mesmo (homobifuncional) ou diferentes (heterobifuncional). Os grupos funcionais do reagente de ligação podem ser designados a reagir com grupamentos aminas (Lys, Arg), sulfidrilas (Cys), carboxilas (Asp, Glu), entre outros. Apesar de haver muitas opções de agentes para *crosslinking* disponíveis, um ponto de partida freqüentemente usado é testar a reatividade de grupamentos aminas das proteínas com agentes direcionados para cadeias laterais de lisina e/ou arginina. Para estes resíduos, o grupo reativo reside na extremidade da cadeia lateral, uma posição um tanto quanto remota em relação à cadeia principal da proteína, sendo, portanto, mais acessível a reagentes extrínsecos. Reagentes do tipo DSS - succinimidil, por exemplo, oferecem bons resultados na ligação de proteínas. Pelos motivos citados acima, escolheu-se o reagente homobifuncional DSS – succinimidil (Sigma Aldrich) para os ensaios. Os grupos reativos deste composto são ésteres de NHS os quais são reativos através de aminas primárias.

Primeiramente para os experimentos de *crosslink*, a concentração de DSS necessária foi determinada. Para o experimento, 1µl do reagente DSS diluído em diversas concentrações de DMSO - sulfoxido de dimetil, foram adicionados em 9µl de DBD hTRβ a concentração de 130 µM. As concentrações finais de DSS utilizadas foram 0,05 mM, 0,2 mM, 0,5 mM, 1 mM e 2,5 mM. As reações foram incubadas a temperatura ambiente por 15 min. sendo encerradas com 3µl de Etanolamina a 1M cada. Alíquotas das reações com DSS foram submetidas à SDS-PAGE com 15% de poliacrilamida e as bandas visualizadas com Coomassie Blue. Para padrão de peso molecular, as seguintes proteínas (Sigma) foram utilizadas: albumina sérica bovina (66kDa), ovalbumina (45kDa), anidrase carbônica (30kDa), inibidor de tripsina de soja (20,1kDa) e citocromo c (12,4kDa). Para verificação dos estados de oligomerização do DBD hTRβ em

diferentes concentrações, 2,0; 6,5; 20,0; 40,0 e 130,0 μM , os mesmos foram submetidos a *crosslink* químico. As reações foram incubadas a temperatura ambiente (25°C) por 15 min. sendo encerradas com 3 μl de Etanolamina a 1M cada, sendo o gel SDS 15% corado com prata, já que esse reagente permite uma maior resolução em baixas concentrações de proteína.

5.2.7 SAXS do DBD hTR β

Os dados de SAXS do DBD hTR β a concentração de 40 μM foram coletados na linha de SAS do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas, Brasil) utilizando comprimento de onda $\lambda=1.488$ Å, detector bidimensional (2D) e distância amostra-detector de 1101.0 mm, cobrindo uma transferência de momento de $0.1 \text{ nm}^{-1} < q < 2 \text{ nm}^{-1}$. As curvas de espalhamento da solução de proteína e do tampão foram coletadas em 2 etapas de 300 segundos para monitoramento dos danos causados pela radiação à amostra, além da estabilidade do feixe. A análise sistemática dos dados foi realizada normalizando-os pela intensidade do feixe incidente e multiplicando-os pela absorção da amostra. O espalhamento da solução tampão foi subtraído da curva de espalhamento da solução de proteína e a diferença foi normalizada pela concentração protéica. O programa Oligomer (KONAREV et al, 2003) foi utilizado para quantificar a mistura de multicomponentes presentes na solução de DBD hTR β à concentração de 40 μM . Para isto, o programa utiliza o espalhamento simulado dos componentes da mistura, a partir de estruturas cristalográficas conhecidas. A curva de espalhamento experimental para uma mistura de multicomponentes é dada pela combinação linear dos membros das misturas

$$I(q) = \alpha \times I_m(q) + \beta \times I_d(q) \quad (68)$$

em que $I_m(q)$ e $I_d(q)$ são as intensidades de espalhamento para o monômero e dímero, respectivamente e α e β são as frações de cada componente da mistura. Para simular o

espalhamento independente das estruturas de alta resolução, utilizamos o monômero DBD hTR β (pdb id 2NLL) (RASTINEJAD et al, 1995). Um dímero desta estrutura foi elaborado utilizando como molde o dímero de ER (pdb id 1HCQ) (SCHWABE et al, 1993), baseado ser esta a interface de dimerização mais forte para os DBDs descritos na literatura.

5.2.8 Ligação do DBD hTR β no elemento responsivo F2

A afinidade de ligação do homodímero DBD hTR β ao elemento responsivo palíndromo invertido F2 (5'-TGACCTnnnnnnAGGTCA-3') foi previamente descrita na literatura (GLASS, 1994) (RIBEIRO, KUSHNER; BAXTER, 1995). A reação de ligação do DBD hTR β em tampão 20 mM Hepes- pH 8,0 (20 mM Hepes-Na, 3mM DTT, 300mM NaCl e 5% Glicerol) com o elemento responsivo F2 foi realizada em estequiometria respectivamente de 2:1, visto que duas moléculas de DBD hTR β se ligam ao F2. A reação foi incubada por 1 hora a 4°C, e 5 mM de MgCl₂ foi utilizado para o aumento da afinidade entre DNA e proteína. Em seguida a reação foi aplicada em gel nativo. Para este experimento foi utilizado um gel com gradiente 8 - 25%.

Os géis foram colocados primeiramente em solução contendo Brometo de Etídio, para que no transluminador de UV fosse possível verificar a posição do DNA no gel, depois foi realizada coloração com *Coomassie*, conforme descreve o fabricante.

5.2.9 Ensaio de cristalização do DBD hTR β

A cristalografia de proteínas tem se mostrado uma poderosa ferramenta para elucidação detalhada da estrutura das proteínas e vem assumindo um papel importante no estudo de vários problemas biológicos. A determinação da estrutura tridimensional de uma proteína por difração

de raios X é um processo que possui como uma das etapas críticas, a obtenção de um mono cristal de proteína. Um cristal de proteína é formado por moléculas idênticas que se repetem num arranjo tridimensional ordenado e periódico. A formação de cristais é dependente de vários parâmetros, como pH, temperatura, concentração de proteína e a natureza do tampão e do agente precipitante. A cristalização ocorre em soluções supersaturadas, nas quais não há água suficiente para manter a solvatação das moléculas entre si, e, qualquer mudança abrupta no processo de supersaturação pode levar à precipitação de um sólido amorfo, ao invés de cristais. Uma das metodologias utilizadas para a cristalização de proteínas é a Difusão de Vapor. Neste método, a técnica mais usada é a da Gota Suspensa, na qual a gota contendo solução de proteína mais o agente precipitante é exposta gradualmente à saturação pela perda de água da gota para o reservatório que contém o agente precipitante. Se esta difusão de vapor ocorre lentamente, possibilitando o arranjo das moléculas de forma ordenada, resultará então na formação do cristal e não numa precipitação (Branden e Tooze, 1991).

Ensaio de cristalização foram realizados com o complexo F2 DBD hTR β em tampão 20 mM Hepes-pH 8,0 (20 mM Hepes-Na, 3mM DTT, 300mM NaCl e 5% Glicerol) à concentração inicial de 10 mg/mL (653 μ M). Variação na concentração do complexo, assim como na temperatura da câmara de cristalização (4° e 18° C) foram utilizadas. As condições iniciais foram baseadas nas proteínas homólogas cristalizadas previamente com seus elementos responsivos, que são descritos na literatura dos receptores nucleares.

5.2.10 SAXS do complexo F2-DBD hTR β

Os dados de SAXS do complexo DBD hTR β ligado ao elemento responsivo F2 a concentração de 45 μ M e 90 μ M foram coletados na linha de SAS do Laboratório Nacional de

Luz Síncrotron (LNLS, Campinas, Brasil) utilizando comprimento de onda $\lambda=1.488 \text{ \AA}$, detector unidimensional (1D) sensível à posição e distância amostra-detector de 733.1 mm. Desta maneira foi possível cobrir um momento de transferência entre $0.1 \text{ nm}^{-1} < q < 4 \text{ nm}^{-1}$

As curvas de espalhamento da solução de proteína e do tampão foram coletadas em 20 etapas de 100 segundos para monitoramento dos danos causados pela radiação à amostra, além da estabilidade do feixe. A análise sistemática dos dados foi realizada normalizando-os pela intensidade do feixe incidente e multiplicando-os pela absorção da amostra. O espalhamento da solução tampão foi subtraído da curva de espalhamento da solução de proteína e a diferença foi normalizada pela concentração protéica e pela resposta não homogênea do detector. O R_g do complexo foi obtido por dois métodos distintos, utilizando a equação de Guinier (POROD, 1982) e pelo método de Transformada Inversa de Fourier implementado pelo programa Gnom (SEMENYUK; SVERGUN, 1991) (SVERGUN, 1992), onde também obtivemos a função de distribuição de distâncias $p(r)$ e o D_{max} do complexo. O efeito de deformação na curva devido a altura de 8 mm da janela de entrada do detector também foi corrigido utilizando o programa.

Determinação do modelo de baixa resolução a partir dos dados de SAXS. O modelo de baixa resolução foi gerado utilizando procedimento *ab initio* implementado no programa Gasbor (SVERGUN; PETOUKHOV; KOCH, 2001). Diversos parâmetros iniciais para a determinação de envelope *ab initio* levaram a consistentes resultados, com similaridades estruturais entre os modelos finais. Para análise automática de cada modelo, o pacote de programas Damaver (KONAREV; PETOUKHOV; SVERGUN, 2001) foi utilizado.

Determinação do complexo de alta resolução e ajuste com os dados experimentais. Visto que até o momento não há estrutura resolvida para o complexo F2 DBD hTR β 2, assim como para nenhum outro complexo receptor-DNA nesta disposição, hTR β DBD foi isolado do

complexo heterodimérico formado por DBD hTR β DBD hXR α ligados ao elemento responsivo DR4 (pdb id 2NLL) (RASTINEJAD et al, 1995). O modelo de DNA F2 foi gerado pelo programa 3DNA (OLSON et al, 2001), o DBD hTR β foi posicionado como homodímero palíndromico sobre o o modelo do complexo de DBD ER (pdb id: 1HCQ), respeitando as interações específicas entre DNA e proteína, o complexo foi transladado e sobreposto sobre o F2, esta modelagem foi realizada em colaboração com Ana Carolina M. Figueira. Desta forma, obtivemos um modelo de alta resolução do complexo F2-DBD hTR β para comparação com os dados de SAXS. Os valores de R_g , D_{max} , e a curva de espalhamento simulado das coordenadas atômicas do complexo F2-DBD hTR β foram calculados utilizando o programa Crysol (SVERGUN; BARBERATO; KOCH, 1995). As discrepâncias entre o modelo proposto e os dados experimentais foram calculadas também por este programa.

5.3 Resultados

5.3.1 Sub-clonagem do fragmento de DNA codificador do DBD hTR β

5.3.1.1 Sub-clonagem do fragmento de DNA codificador do DBD hTR β no vetor pGEM[®]-T

Os produtos das reações de digestão dos vetores pGEM-T recombinantes com as enzimas de restrição *Nde*I e *Xho*I, foram analisados por eletroforese em 1% gel de agarose para a determinação de colônias recombinantes que possuísem o inserto esperado de 330 pb, ou seja, o fragmento codificador do DBD hTR β , como está mostrado na Figura 5.3.

Figura 5.3 - Eletroforese em 1% gel de agarose (BioRad) para visualização do produto da reação de digestão com as enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI*.

5.3.1.2 Sequenciamento do fragmento DBD hTRβ

Os resultados dos seqüenciamentos foram submetidos a alinhamento utilizando o programa BLAST que trabalha com as seqüências contidas no GenBank+EMBL+DDBJ+PDB. Com o alinhamento verificamos que o clone contém a seqüência do DBD do hTRβ. Além disso, o resultado do alinhamento com ambos iniciadores foi capaz de mostrar que o inserto não apresentava nenhuma mutação.

5.3.1.3 Transformação em células competentes de *Escherichia coli* BL21(DE3)

Como podemos ver na figura 5.4, as três colônias *Escherichia coli* BL21(DE3) escolhidas ao acaso possuem o DNA recombinante pET28a(+) DBD hTRβ de aproximadamente 300 pb correspondente ao fragmento amplificado por PCR. Estas colônias foram armazenadas em glicerinas a -80°C

Figura 5.4 - Eletroforese em 1% gel de agarose (BioRad) para visualização do produto da reação de PCR.

5.3.2 Expressão do DBD hTR β em células competentes de *Escherichia coli* BL21(DE3)

Foi realizada expressão do His₆-DBD hTR β em células de *E. Coli* BL21 DE3, conforme descrito na seção 5.2.3, amostras foram coletadas após o tempo de indução com IPTG (figura 5.5).

Figura 5.5 - SDS PAGE, expressão em função do tempo de indução. (1) MM, (2) T₀ Indução, (3) 1 hora (4) 2 horas (5) 3 horas (6) 4 horas (7) 5 horas.

É possível verificar um aumento gradativo da expressão da proteína que alcança um expressão substancial cerca de 5 horas após indução. Lise celular foi reralizada, onde pudemos

verificar em SDS PAGE que quantidade significativa da proteína está em corpo de inclusão, mas uma quantidade maior da proteína está solúvel no sobrenadante, sendo esta parcela utilizada para purificação. (figura 5.6).

Figura 5.6 - SDS PAGE - Lise celular (1)MM, (2) extrato lisado, (3) pellet. A seta preta indica o His₆DBD hTR β (15.3 KDa).

5.3.3 Purificação do domínio de ligação ao DNA do Receptor Tireoideano Isoforma β

5.3.3.1 Cromatografia por afinidade do DBD hTR β

Após o experimento de purificação por afinidade, as alíquotas resultantes das lavagens foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 15%.

Figura 5.7 - SDS PAGE - cromatografia de afinidade (1) *MM*, (2) extrato, (3) 1ª Lavagem 10 mM Imidazol(4) 2ª Lavagem 10 mM Imidazol (5) 3ª Lavagem 10 mM Imidazol (6) Eluição 3 vc 250 mM Imidazol (7) Eluição 3 vc 500 mM Imidazol (8) Eluição 3 vc 500 mM Imidazol. A seta preta indica o His₆DBD-hTR β (15.3 KDa).

Verificamos na figura 5.7 que no poço 2 (extrato), as proteínas intrínsecas da *E. Coli* são eluídas, não verificamos a eluição do His₆-DBD hTR β , visto que a proteína aderiu a resina de afinidade; nos poços 3, 4 e 5, as proteínas da *E. Coli* continuam a eluir, sendo que em 5, o gel tem uma aparência mais limpa; em 6 a proteína His₆-DBD hTR β é eluída por competitividade com 250 mM de Imidazol; em 7 e 8, a proteína His₆-DBD hTR β é completamente eluída da resina de afinidade. As Aliquotas 6, 7 e 8, foram agrupadas para serem utilizadas no próximo passo de purificação.

5.3.3.2 Cromatografia por exclusão molecular

Visto que a afinidade não foi suficiente para obtermos grandes quantidades de His₆-DBD hTR β com pureza aceitável para os ensaios de cristalização, fizemos um segundo passo de purificação utilizando desta vez a cromatografia por exclusão molecular. Os resultados da curva de calibração da coluna Superdex 75 26/60 podem ser vistos abaixo:

Figura 5.8 - Curva de calibração da Superdex 75 HL 26/60.

O perfil de eluição do His₆-DBD hTR β monitorado a 280 nm pode ser visto na figura 5.9.

Figura 5.9 - Eluição isocrática do His₆-DBD hTR β , perfil medido a 280 nm.

O raio hidrodinâmico foi calculado através da equação de calibração da coluna foi de 2,13 nm. As amostras referentes ao centro do primeiro e segundo pico foram submetidos a SDS PAGE, a fração eluída do primeiro pico apresenta contaminantes de peso molecular diferentes do His₆-DBD hTR β , a fração referente ao centro do segundo pico possui peso molecular esperado para o His₆-DBD hTR β (figura 5.10).

Figura 5.10 - SDS PAGE do his₆ DBD-hTR β após purificação por exclusão molecular: (1) padrão de MM (2) his₆ DBD-hTR β .

A metodologia empregada para a produção e purificação do His₆-DBD-hTR β foi eficiente. Produziu amostras de proteína com grau de pureza acima de 90 % e rendimento final de 3 mg de proteína por litro meio de cultura expresso.

5.3.4 Digestão com trombina bovina

Após a purificação, o His₆-DBD hTR β foi submetido a reação de digestão com trombina bovina. A Figura 5.11 mostra que após 4 horas de reação toda a proteína foi clivada. Esta proteína pura e livre da cauda de histidina foi utilizada nos ensaios bioquímicos e estruturais que se seguiram.

Figura 5.11 - SDS PAGE - Digestão com trombina bovina (1) padrão de *MM* (2) T_0 (3) 1 hora (4) 2 horas (5) 3 horas (6) 4 horas.

5.3.5 Anisotropia de Fluorescência

No experimento de anisotropia de fluorescência foi verificado um aumento no valor de anisotropia com o incremento na concentração de DBD hTR β , demonstrando a formação de complexos oligoméricos. Contudo, não foi possível a visualização de um platô bem definido. Isto sugere a formação de complexos inespecíficos.

Figura 5.12 - Anisotropia de fluorescência do DBD hTR β . A anisotropia é visualizada em função da concentração da proteína.

5.3.6 Crosslink Químico

Diferentes concentrações de DSS foram adicionados ao DBD hTR β à concentração de 130 μ M para determinarmos a melhor concentração de DSS nas reações de *crosslink*. Nas concentrações de 0.05 a 0.5 mM de DSS, verificamos duas bandas relativas à monômero e dímero. Às concentrações mais altas do reagente 1 e 2.5 mM verificamos além das duas bandas, uma terceira banda com peso relativo maior (figura 5.13). Sendo, portanto, conveniente o uso de DSS a concentrações acima de 1 mM. Corroborando os resultados de anisotropia de fluorescência que sugerem a presença de interações não específicas a altas concentrações.

Figura 5.13 – Determinação da concentração de DSS utilizado na reação de crosslinking. 130 μ M de DBD hTR β reagiram com diferentes concentrações de DSS e as amostras foram resolvidas por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 15%. As concentrações finais de DSS, em mM, estão indicadas nas figuras. O gel foi corado com Coomassie blue.

Para confirmar a composição dos estados oligoméricos visualizados com fluorescência, DBD hTR β foi covalentemente ligado e analisados por eletroforese do tipo SDSPAGE. Verificamos uma banda relativa à massa esperada para monômero (15.3 kDa) nas mais baixas concentrações de 2-20 μ M (não sendo clara a banda a 2 μ M devido a resolução em concentração

do gel de Prata), havendo com o aumento da concentração da proteína, um deslocamento para a presença de dímero (30.6 kDa) e após a formação de oligômero com massa molecular maior (45.0 kDa) (Figura 5.14). Segundo estes estudos de *crosslinking*, o domínio DBD do TR está em solução como monômero, podendo-se observar dímeros em concentrações acima de 40 μ M, possuindo interações não bem determinadas em altas concentrações.

Figura 5.14 - *Crosslink* químico de DBD hTR β em concentrações de 2 – 130 μ M com 2.5 mM de DSS e as amostras foram resolvidas por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 15%. As concentrações finais de DBD hTR β em μ M, estão indicadas nas figura. O gel foi corado com Prata.

5.3.7 SAXS do DBD hTR β

Para caracterizarmos a quantidade de monômeros e dímeros presentes na solução de hDBDTR β , utilizamos o programa Oligomer (KONAREV et al, 2003). A curva de fator de forma para o monômero e dímero foi obtida simulando o espalhamento dos oligômeros separadamente. A combinação linear destas curvas foi calculada de modo a minimizar a discrepância com os dados experimentais. Desta forma verificamos a presença de aproximadamente 76 % de monômeros e 24 % de dímeros em solução. (figura 5.15).

Figura 5.15 - Curva experimental de SAXS do DBD hTR β a 40 μ M com ajuste do programa Oligomer (KONAREV et al, 2003).

5.3.8 Ligação do DBD hTR β no elemento responsivo F2

Após incubação por 1 hora a 4°C, o complexo F2 DBD hTR β foi submetido a eletroforese em gel nativo. O gel do complexo foi corado primeiramente com *comassie blue* para visualização da proteína e em seguida com brometo de etídio para visualização do DNA.

Figura 5.16 - Gel Nativo da reação de ligação com DNA (1) padrão de pesos moleculares, (2) DBD-hTR β (3) DNA F2 (3) DBD-hTR β . Após eletrofores, proteína e DNA podem ser visualizados no mesmo ponto no gel, o DNA em excesso pode ser visualizado mais abaixo no gel.

Este padrão de migração é condizente com o esperado para um complexo DNA-proteína.

5.3.9 Estudos de cristalização do complexo DBD hTR β ligado ao elemento responsivo F2

O domínio de ligação ao DNA dos receptores nucleares é o domínio mais conservado entre os membros da superfamília (identidade de aproximadamente 90%). Devido a esta similaridade estrutural, pesquisamos as condições de cristalização dos complexos formados entre os DBDs dos receptores nucleares e seus elementos responsivos resolvidos até o momento (tabela 5.9).

Tabela 5.9 - condição de cristalização dos complexos de DBDs dos receptores nucleares e seus elementos responsivos.

Complexo	Conc. proteína	Gota	Poço	Temperatura	Gota/PoçoVol/	Cristal
hTRβ-hRXRα DBD DR4 (RASTINEJAD et al 1995)	0.6 mM (cada espécie)	25 mM Imidazol, pH 7.0 400 mM NH4Cl 1mM DTT 5mM MgCl2	40 % w/v PEG -3350 25 mM Imidazol, pH 7.0 400 mM NH4Cl 10 mM DTT 5 mM MgCl2	17° C	5µL/5µL	7 dias
hRXRα DBD DR1 (ZHAO et al 2000)	0.9 mM proteína 0.45 mM DNA	25 mM Tris, pH 7.5	18-23 % w/v PEG -3350 25 mM Tris, pH 7.5 400 mM NH4Cl 5 mM MgCl2	8° C	2µL/2µL	-
hRXRα-hRARα DBD DR1 (RASTINEJAD et al 2000)	0.9 mM proteína 0.45 mM DNA	25 mM Tris, pH 7.5	18-23 % w/v PEG -3350 25 mM Tris, pH 7.5 400 mM NH4Cl 5 mM MgCl2	8° C	2µL/2µL	-
hRXRα-hVDR DR3 (SHAFFER et al 2004)	0.33 mM (cada espécie)	5 mM Tris pH 7.6 50 mM NaCl 2 mM DTT	4-6 % w/v PEG -4000 50mM MES, pH 5.6 10 % glycerol 10 mM DTT 5 mM MgCl2	18° C	2µL/2µL	-
hNGFIβ monômero (MEINKE; SIGLER, 1999)	0.6 mM (cada espécie)	10 mM Tris pH 7.5 50 mM NaCl 1 mM DTT	29-30 % w/v PEG -4000 50mM MOPS, pH 7.0 250 mM NH4Cl 5 mM DTT	27° C	8µL/8µL	5-10 dias
VDR DR3 (SHAFFER; GEWIRTH, 2002)	0.66 mM proteína, 0.33 mM DNA	5 mM Tris pH 7.6 50 mM NaCl 2 mM DTT	4-6 % w/v PEG -4000 50mM MES, pH 5.6 10% glycerol 10 mM DTT 5 mM MgCl2	18° C	2µL/2µL	1-3 semanas
RevErb DR2 (ZHAO et al 1998)	1.2 mM proteína 0.6 mM DNA	-	20-25 % w/v PEG -8000 25 mM Tris, pH 7.5 400 mM NaCl 5 mM MgCl2	17° C	4µL/4µL	6-8 semanas
hER Pal3 (SCHWABE et al 1993)	0.7 mM complexo	20 mM MES, pH 6.0 2 µM ZnCl2 10 % MPD 2-8 mM CaCl2 30-80 mM NaCl 1.8 mM spermina	-	20° C	-	1 mês
						Continua

Continuação

Complexo	Conc. proteína	Gota	Poço	Temperatura	Gota/PoçoVol/	Cristal
hLRH-1 monômero (Solomon et al 2005)	0.6 mM (cada espécie)	20 mM Tris, pH 7.4 400mM NaCl 5 %Glicerol	21% w/v PEG -8000 13% Glicerol 50 mM Cacodilato de Sódio, pH 6.0 200 mM NH4Ac 10 mM Mg(Ac)2	22° C	-	-
EcR-hRXRα Pal1 (Devarakonda et al 2003)	0.5 mM (cada espécie)	-	12-14 % w/v PEG -3350 100 mM MES, pH 5.6 50 mM MgSO4 50 mM LiSO4 5 mM DTT 10 mM MgCl2	9° C	2µL/2µL	-
EcR-USP Pal1 (Devarakonda et al 2003)	0.5 mM (cada espécie)	-	4-8 % w/v PEG -3350 100 mM MES, pH 5.6 100 mM NaCl 10 mM MgSO4 5 mM DTT 10 mM MgCl2	9° C	2µL/2µL	-
hPR Pal3 (Roemer et al 2006)	140 µM proteína, 70 µM DNA	20 mM Tris, pH 7.5 100mM NaCl 10 %Glicerol 1 mM EDTA 1 mM DTT	100 mM MOPS, pH 6.0 10 mM NaCl 2.5 mM espermina 5% hexanediol	4° C	1µL/1µL	1 semana
hAR Pal3 (Shaffer et al 2004b)	0.3 mM proteína, 0.15 µM DNA	5 mM Tris, pH 7.6 150 mM LiCl 10 mM DTT	0-2 % w/v PEG-400 5 mM MES, pH 5.6 0 – 20 mM MgCl2	18° C	2µL/2µL	2-6 semanas

Com exceção de hPR Pal3, todos os complexos tabelados tiveram PEG - polietilenoglicol como principal agente precipitante. Sendo em sua maioria PEGs de peso molecular em torno de 3350, MgCl_2 em concentrações de 5 e 10 mM também foram frequentemente usados. Estes estudos foram o ponto de partida para os ensaios de cristalização. Primeiramente, utilizamos para solução do poço, 20 mM Hepes, PEG 3350 w/v 15-50% (tabela 5.10).

Tabela 5.10 - condição do poço - 20 mM Hepes, PEG 3350 w/v 15-50%, pHs 6.5 – 8.0

w/v PEG-3350/pH	15 %	20 %	25 %	30 %	35 %	40 %	45 %	50 %
pH 8.0						X	X	X
pH 7.5						X	X	X
pH 7.0						X	X	X
pH 6.5								

Nas condições marcadas com um X, as quais, tínhamos altas concentrações de PEG, entre os pHs 8.0 – 6.5, obtivemos micro cristais.

Utilizamos em seguida, o fatorial de cristalização para ácidos nucleicos, proteínas que se ligam a ácidos nucleicos e complexo proteína/acido nucleico (*Hampton Research HR2-116*), onde em duas condições A.(0.05 M de Cacodilato de Sódio, pH 6.5, 0.08 M Acetato de Magnésio, 30% w/v PEG-4000) e B.(50 mM MES, pH 5.6, 0.1 M Sulfato de Amônio, 0.01 M MgCl_2 , 20% w/v PEG-8000), obtivemos micro cristais (figura 5.17).

(A)

(B)

Figura 5.17 - Micro cristais obtidos em condições de cristalização (Hampton Research HR2-116). a.(0.05 M de Cacodilato de Sódio, pH 6.5, 0.08 M Acetato de Magnésio, 30% w/v PEG-4000) b.(0.05 MES, pH 5.6, 0.1 M Sulfato de Amônio, 0.01 M MgCl_2 , 20% w/v PEG-8000).

Apesar da formação dos micro-cristais (figura 5.17B), os mesmos não apresentaram padrão de difração na linha de Cristalografia de Proteínas do Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS) em Campinas. Cristais maiores não foram obtidos após várias tentativas.

Outros fatoriais como: I.(0.1 M Hepes, pH 7.5, 0 - 5 - 10 mM MgCl_2 , 35% w/v PEG-4000), II.(0.1 M Hepes, pH 7.5, 400 mM NH_4Cl 0 - 5 - 10 mM MgCl_2 , 35% w/v PEG-4000), III.(0.1 M Hepes, pH 7.5, 400 mM NH_4Cl 0 - 5 - 10 mM MgCl_2 , 10 % Glicerol, 35% w/v PEG-4000), assim como os Kits The PEGs and PEGs II Suites (Qiagen) e o Kit MD1-16 para receptores nucleares foram testados, mas sem sucesso.

5.3.10 SAXS do F2 DBD hTR β

Após a análise sistemática dos dados de SAXS, o momento de transferência da curva de espalhamento foi de $0.2 \text{ nm}^{-1} < q < 2.5 \text{ nm}^{-1}$, possibilitando uma resolução de 2.4 nm. A curva de SAXS do complexo DBD hTR β ligado ao elemento responsivo F2, juntamente com a curva teórica dos modelos de alta resolução do complexo e com DAM é mostrada na figura 5.18.

Figura 5.18 - Curva de espalhamento em solução do hTR β DBD ligado ao elemento responsivo F2 e resultados de procedimento de ajuste. Curva experimental (pontos com barras de erro); intensidade de espalhamento para os DAMs (Gasbor) (linha azul clara); intensidade de espalhamento para o complexo em alta resolução (linha amarela). O inserto contém o gráfico de Guinier ($\ln I$ versus q^2).

Os parâmetros estruturais derivados destas curvas são mostrados na Tabela 5.11. O R_g obtido a partir da curva de Guinier ($\ln I(q) \propto q^2$) foi 2.49 nm.

Tabela 5.11 - Parâmetros estruturais do complexo F2 DBD hTR β .

Parâmetros/Amostra	F2 DBD hTR β		
	Exp. *	Mod.†	DAM.‡
Dmáx (nm)	8.0 ± 0.5	8.3	8.2
Rg (nm)	2.5 ± 0.1	2.4	2.5
Discrepância χ	-	1.1	1.1¶
Resolução (nm) €	2.4	-	-

* Exp., calculado a partir dos dados experimentais.

† Mod., parâmetros do modelo de alta resolução do complexo hTR β DBD F2.

‡ DAM, parâmetros do modelo de átomos *Dummy* (DAM)

¶ Simetria de ordem 2 imposta.

€ Resolução $2\pi/q_{\text{máx}}$

A função de distribuição de distâncias não contém parte negativa no eixo das abcissas, o qual indica ausência de efeitos de interferência produzidas por correlações espaciais interpartículas. A dimensão máxima do complexo ($D_{máx}$) e o raio de giração (R_g) são respectivamente 8.0 ± 0.5 e 2.5 ± 0.1 , condizentes com os valores obtidos para o modelo dimérico de alta resolução (Figura 5.19).

Figura 5.19 - Função de distribuição de distância evoluída a partir da curva de espalhamento do complexo hTR β DBD ligado ao F2.

Determinação do modelo de átomos *Dummy* (DAM) O DAM do complexo F2 DBD hTR β foi gerado utilizando 446 resíduos *dummy* e 378 resíduos de água, assumindo simetria de ordem 2, possuindo o mesmo uma resolução de 2.4 nm. Para verificar a validade dos modelo, realizaram-se 10 construções independentes. Em todos os casos obtiveram-se envelopes similares. Os parâmetros derivados da estrutura de resíduos *dummy* concordaram bem com os valores experimentais. (Tabela 5.12) O modelo em alta resolução do complexo hTR β DBD ligado a F2 foi posicionado de maneira não ambígua dentro do envelope de baixa resolução

(DAM). Para o alinhamento do modelo de alta resolução com o modelo de baixa resolução, utilizou-se o programa Supcomb (KONAREV; PETOUKHOV; SVERGUN, 2001) (Figura 5.20).

Figura 5.20 - Sobreposição do modelo de átomos dummy (DAM) com o modelo proposto em alta resolução. Os modelos são rotados 90° em relação aos eixos x e y.

5.4 Conclusão

O DBD hTR β foi submetido a experimentos de crosslinking, fluorescência e SAXS, onde foi verificado que a proteína forma oligômeros em concentrações acima de 40 μ m. Após incubação com o elemento responsivo F2, foi verificado um complexo monodisperso. Estudos de SAXS demonstraram que este complexo é formado com equivalência estequiométrica de dois monômeros de hDBD TR β para cada fita dupla do F2 (2:1).

6 Estudos por SAXS de ferredoxina-FAD e do complexo formado por interleucina-22 e interleucina-22R1

Resumo

FNRS - Ferredoxinas-NADP(H) redutases são flavoenzimas que catalizam a transferência de elétrons entre NADP(H) e as ferredoxinas ou flavodoxinas. *Leptospira interrogans* é uma bactéria espiroqueta parasitária capaz de infectar os seres humanos e mamíferos em geral. Modelo de SAXS em solução foi gerado para a proteína LepFNR complexada com o cofator FAD, a proteína se apresentou monomérica em solução, estes resultados foram publicados no trabalho intitulado “*Crystal structures of Leptospira interrogans FAD-containing ferredoxin-NADP⁺ reductase and its complex with NADP⁺*” (Nascimento et al, 2007). IL-22 é uma citocina de classe 2 cuja estrutura primária é semelhante à de IL-10 e IFN- γ , contudo IL 22 possui um único domínio globular, diferentemente das outras duas que possuem dois domínios interconectados. As interações de IL-10 com seu receptor IL-10R1 são conhecidas, os domínios interconectados de IL-10 se ligam independentemente a duas moléculas de IL-10R1. Estes resultados de SAXS mostraram que IL-22/IL-22R1 é um dímero composto por dois monômeros de IL-22/IL-22R1, similar, mas não idêntico a IL-10/IL-10R1. Estes resultados foram publicados no trabalho intitulado “*Interleukin-22 forms dimers which are recognized by two interleukin-22R1 receptor chains*” (OLIVEIRA NETO et al, 2008).

6.1 Estrutura de baixa resolução de ferredoxina de *Leptospira interrogans*

6.1.1 Introdução

FNRS - Ferredoxinas-NADP(H) redutases são flavoenzimas que catalizam a transferência de eletrões entre NADP(H) e a proteína ferredoxina (Fd). Estas enzimas catalisam a reação descrita na equação (69), utilizando o cofator FAD como grupo prostético.

Dependendo da fonte de energia primária do organismo a reação catalisada por FNRs pode ser conduzida em uma ou outra direção indicadas pela seta dupla na equação (69).

Leptospira interrogans é uma bactéria espiroqueta parasitaria capaz de infectar seres humanos e mamíferos, incluindo bovinos, cães, porcos, cavalos e, roedores. LepFNR possui alta identidade sequencial com FNR de plantas. (CECCARELLI et al, 2004) (CATALANO-DUPUY, 2006).

De acordo com análise filogenética, *Leptospira* FNR (LepFNR), foi recentemente sugerida pertencer à classe de FNRS de plastídios. Apesar da similaridade topológica, a baixa identidade sequencial da LepFNR com os membros destas FNRs, faz da LepFNR um interessante alvo para os estudos estruturais, com o objetivo de compreender melhor a razão elevado rendimento catalítico destes oxidoreductases. (CECARELLI, 2004)

LepFNR consiste de dois domínios: o domínio C-terminal é muito conservado entre os membros das FNRs e é formado por um sanduíche- $\alpha\beta$ com 5 folhas- β sondadas por 6 α -hélices; o domínio N-terminal, o qual possui 6 folhas- β anti paralelas, o qual o cofator FAD se liga. FNRs são conhecidas como proteínas monoméricas em plastídios, bactérias, mitocôndrias, e

apicoplastos de parasitas intracelulares, contudo foi recentemente sugerido que duas isoformas de FNR de *Arabidopsis thaliana* são capazes de dimerizar (LINTALA, 2007). Assim, a proteína LepFNR-complexada com o cofator FAD foi submetido a estudos de SAXS para determinação do seu estado de oligomerização.

6.1.2 Metodologia

Dados para LepFNR nas concentrações de 3 e 10 mg/mL foram coletados na linha de SAXS do LNLS (KELLERMAN et al, 1997). O comprimento de onda dos raios X utilizados foi de 0.148 nm. Um PSD 1D – detector unidimensional sensível a posição foi utilizado para registrar a intensidade de espalhamento como função do vetor q . A distância amostra-detector utilizada foi de 1155.1 mm, de modo a registrar a intensidade variando entre $0.1 < q < 3 \text{ nm}^{-1}$. O raio de giro foi avaliado por dois métodos, Guinier e pelo método de transformada inversa de Fourier com o programa Gnom (SEMENYUK E SVERGUN, 1991) (SVERGUN, 1992). A $p(r)$ também foi avaliada com este programa.

A massa molecular de LepFNR foi avaliada pelo método proposto no capítulo 4. Modelo ab initio foi gerado com o uso do programa Gasbor (SVERGUN; PETOUKHOV; KOCH, 2001). A estrutura de alta resolução (pdb id: 2RC5) (NASCIMENTO et al, 2007) foi superposta sobre o DAM utilizando o programa Subcomp (KONAREV; PETOUKHOV; SVERGUN, 2001). O programa Crysol (SVERGUN; BARBERATO; KOCH, 1995) foi utilizado para evoluir os parâmetros do DAM e do modelo cristalográfico.

6.1.3 Resultados e Discussão

Determinação do estado de oligomerização foi realizada utilizando o invariante de Porod. a massa molecular estimada a partir de $I(0)/Q$ para LepFNR foi de 35.40 kDa, o monômero desta proteína possui MM de 34.40 kDa (figura 4.4 e tabela 4.1).

As curvas de SAXS de LepFNR nas concentrações de 3 e 10 mg/mL possuem basicamente o mesmo perfil de espalhamento, assim os dados da proteína a 10 mg/mL foram utilizados na análise de modo a termos uma maior resolução no DAM gerado. Foi realizada comparação dos dados de SAXS com o modelo cristalográfico do monômero de LepFNR (pdb id: 2RC5) utilizando o programa Crysol (SVERGUN; BARBERATO; KOCH, 1995), revelando que LepFNR é monomérica em solução (Figura 6.1 e Tabela 6.1).

Figura 6.1 - Curva experimental de SAXS de LepFNR e ajuste teórico com modelo cristalográfico. Curva experimental de SAXS (círculos com barra de erros); intensidade de espalhamento simulado a partir da DAM (linha verde); intensidade de espalhamento simulado a partir do monômero cristalográfico de LepFNR (pdb id: 2RC5) (linha azul). O inserto contém o gráfico de guinier, do qual foi calculado o R_g .

Análise da $p(r)$ demonstra um $D_{\text{máx}}$ de 6.50 nm, compatível com FNR monomérico. O valor de 2.13 nm para o R_g calculado a partir da $p(r)$ vai de acordo com as estimativas obtidas a partir da análise de Guinier 2.16 nm. (Figura 6.2.)

Figura 6.2 – Comparação da função de distribuição de distâncias para LepFNR. As $p(r)$ foram calculadas com o programa Gnom a partir dos dados experimentais (círculos com barra de erros); a partir do DAM (linha verde); a partir do monômero cristalográfico de LepFNR (pdb id: 2RC5) (linha azul).

Além disso, a superposição estrutural do modelo *ab initio* com a estrutura monomérica cristalográfica de LepFNR (Figura 6.3) não deixa qualquer dúvida de que a proteína é de fato um monômero em solução.

Figura 6.3 – Visão *stereo* mostrando a superposição do monômero cristalográfico de LepFNR com o modelo obtido *ab initio* por SAXS. A imagem superior foi rotacionada 90 ° em torno dos eixos x (centro) e y (inferior).

Tabela 6.1 – Parâmetros estruturais da LepFNR.

Parâmetros/Amotra	Exp*	LepFNR Mod †	DAM ‡
D _{máx} (nm)	6.50 ± 0.50	6.14	6.00
R _g (nm)	2.13 ± 0.50	1.93	1.97
Parâmetros livres	5.00 [€]	-	263.00 ^π
Discrepância	-	1.18	1.10
Volume (nm ³)	-	47.30	50.70
Resolução (nm) ¶	2.11	-	-
MM (kDa)	35.40	-	-

* Exp., calculado a partir dos dados experimentais a proteína a 10 mg/mL.

† Mod, parâmetros obtidos a partir do modelo cristalográfico LepFNR monômero, pdb id: 2RC5.

‡ DAM, parâmetros obtidos do DAM.

€ Shannon channels number $N_s = [D_{\max}(q_{\max} - q_{\min})]/\pi$.

π Número de resíduos do DAM.

χ Parametro de comparação com dados experimentais.

¶ Resolução = $2 * \pi / q_{\max}$

6.1.4. Conclusão

LepFNR complexada com o cofator FAD é monomérica em solução, de acordo com o cálculo de *MM* pela metodologia apresentada no capítulo 4, a curva de espalhamento simulado do modelo cristatográfico do monômero de LepFNR teve bom ajuste com a curva experimental de SAXS de LepFNR, as *p(r)s*, experimental e simulada para o monômero de FNR, possuem a mesma forma e D_{máx}. Além disso, o modelo cristalográfico se sobrepõe com o modelo de átomos *dummy* gerado por SAXS.

6.2 Estrutura de baixa resolução do complexo IL-22/IL-22R1

6.2.1 Introdução

IL-22 – Interleucina-22, uma citocina de classe 2, possui estrutura primária similar a IL-10 – Interleucina-10 (ZDANOV et al, 1995) e IFN- γ – Interferon- γ (RANDAL; KOSSIAKOFF, 2001), mas é estruturalmente diferente destas, as quais são dímeros em forma de v, interconectados e inseparáveis. IL-22 é expresso como monômero e possui suas seis α -hélices num único domínio relativamente globular. (figura 6.4).

Figura 6.4 – (A) Estrutura cristalográfica de IL-22 (pdb id: 1M4R). (B) Estrutura cristalográfica de IL-10 (pdb id: 1J7V).

A indução de IL-22 durante a fase aguda da resposta imune indica o envolvimento no mecanismo de inflamação. Citocinas de classe 2 se ligam ao domínio extracelular de seus respectivos receptores, como exemplo temos o complexo formado por IL-10/IL10R1 (pdb id: 1J7V) (JOSEPHSON; LOGSDON; WALTER, 2001). (figura 6.5).

Figura 6.5 - Estrutura cristalográfica do complexo IL-10/IL-10R1 (pdb id:1J7V).

O domínio extracelular de ligação às citocinas destes receptores é composto por dois domínios fibronectinas do tipo III, cada um consistindo de sete folhas- β antiparalelas conectadas por *loops*. (HARLOS et al, 1994). Na superfície celular, IL-22 se liga a dois receptores: o IL-22R1, específico para IL-22 e IL10R2, um segundo componente do receptor IL-10R1 (KOTENKO et al, 2001). Análises de SAXS foram realizadas para o complexo formado entre interleucina-22 e pelo domínio extracelular de interleucina-22R1, determinando seu envelope tridimensional em solução em condições próximas às fisiológicas. Os resultados foram publicados no trabalho intitulado *Interleukin-22 forms dimers which are recognized by two interleukin-22R1 receptor chains* (OLIVEIRA NETO et al, 2008).

6.2.2 Metodologia

6.2.2.1 Análise dos dados de SAXS

Amostras de IL-22/IL-22R1 a concentrações de 3.5 e 7.0 mg/mL foram preparadas em tampão 25mMBicina, 150mMNaCl, and 1 mMCHAPS (pH 9.5) .

Os dados de SAXS das amostras foram coletados na linha de SAS do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas, Brasil) (KELLERMAN, 1997) utilizando comprimento de onda $\lambda=1.488 \text{ \AA}$, detector unidimensional (1D) sensível à posição e distância amostra-detector de 1330.5 e 1634.5 mm. Desta maneira foi possível cobrir um momento de transferência entre $0.2 \text{ nm}^{-1} < q < 2.3 \text{ nm}^{-1}$.

A pré-análise padrão de SAXS foi realizada e análises posteriores foram realizadas com o pacote de programas Atsas (KONAREV et al, 2006). A $p(r)$ e o R_g foram evoluídos pelo programa Gnom (SEMENYUK; SVERGUN, 1991) (SVERGUN, 1992). Estruturas de baixa resolução foram obtidas a partir dos dados experimentais do complexo IL-22/IL-22R1 utilizando o programa Dammin (SVERGUN, 1999).

6.2.2.2 Modelagem de corpo rígido do complexo IL-22/IL-22R1.

Um monômero de IL-22 pdb id:14MR (NAGEN et al, 2002) foi superposto sobre cada domínio do dímero IL-10 na estrutura IL-10/IL-10R1 (pdb id:1J7V) (JOSEPHSON; LOGSDON; WALTER, 2001) utilizando o CCP4 para superposição de estruturas (KRISSINELE HENRICK, 2004). IL-22R1 foi obtido por modelagem por homologia utilizando IL-10R1 do mesmo pdb id:1J7V. Este modelo gerado de IL-22/IL-22R1, assim como IL-10/IL-10R1 não se ajustou bem aos dados experimentais. Desta forma, a estrutura foi separada em duas subunidades iguais contendo cada uma um IL-22 e um IL-22R1, as orientações dos domínios foram minimizadas com os dados experimentais utilizando o programa Sasref (KONAREV et al, 2006). Os contatos entre os loops DE dos domínios foram mantidos durante a modelagem de corpo rígido. O programa Crysol (SVERGUN; BARBERATO; KOCH, 1995) foi utilizado para evoluir os parâmetros do modelo de corpo rígido e Supcomb (KONAREV; PETOUKHOV; SVERGUN,

2001) foi utilizado para sobreposição com o DAM. As figuras de IL-22/IL-22R1 foram geradas com o programa PyMol (DELANO, 2002).

6.2.3 Resultados e discussão

Determinação do estado de oligomerização foi realizada utilizando o invariante de Porod (capítulo 4). A *MM* estimada à partir desta metodologia para foi de 75.5 kDa para IL-22/IL22R1. O dímero do complexo IL-22/IL22R1, gerado a partir da estrutura de IL-10/IL-10R1 (pdb id:1J7V) possui *MM* de 79.90 kDa. O conjunto destes dados permite concluir que IL-22/IL-22R1 é dimérico em solução. A curva de SAXS do complexo IL-22/IL-22R1 e os ajustes com os espalhamentos simulados para as estruturas de IL-10/IL-10R1, modelo de rígido do complexo IL-22/IL-22R1e DAM são mostrados na figura 6.6.

Figura 6.6 - Curva de espalhamento experimental de IL-22/IL-22R1 ($\log I$ contra q) e resultados de procedimento de ajuste. O inserto contém o gráfico de Guinier ($\log I$ versus q^2). Curva experimental após a subtração da constante de Porod (círculo com barra de erros); intensidade de espalhamento simulado para o DAM (Dammin) (linha verde); intensidade de espalhamento simulado para o modelo de corpo rígido (linha azul); intensidade de espalhamento simulado para o IL-10/IL-10R1 (pdb id: 1J7V) (linha vermelha).

O R_g obtido pelo método de Guinier foi de 3.53 nm, este valor concorda com o resultado obtido com o programa Gnom, 3.56 nm (SEMENYUK; SVERGUN, 1991) (SVERGUN, 1992) (tabela 6.2). As $p(r)_s$ evoluídas a partir dos dados experimentais e a partir das intensidades simuladas a partir do complexo IL-10/IL-10R1 do modelo de corpo rígido, e do DAM são mostradas abaixo.

Figura 6.7 - Função de distribuição de distâncias para os dados experimentais de IL-22/IL-22R1 (círculos com barras de erros); para o modelo de corpo rígido (linha azul); e para IL-10/IL-10R1 (linha vermelha).

Modelo tridimensional foi gerado utilizando o programa Dammin. Para verificar a unicidade do modelo, simulações independentes partindo de diferentes parâmetros foram realizadas, chegando a resultados consistentes. O modelo final foi gerado sem imposição de simetria. (figura 6.8).

Figura 6.8 – Sobreposição da média de 20 DAM do complexo IL-22/IL-22R1 com o modelo de corpo rígido do complexo IL-22/IL-22R1. A partir do modelo da esquerda, os modelos do centro e da direita são rotacionados 90° em relação aos eixos x e y, respectivamente.

O envelope molecular do complexo IL-22/IL-22R1 é prolato e alongado. A estrutura de baixa resolução obtida não deixa dúvida quanto ao estado de oligomerização de IL-22/IL-22R1, sendo o complexo composto de um dímero de IL-22 e dois receptores IL-22R1, cada qual interagindo com um monômero de IL-22. Assim, as interfaces intramoleculares do complexo são compostas pelos *loops* DE dos monômeros de IL-22 e pelas interfaces dos IL-22R1s interagindo com seus respectivos monômeros de IL-22. A arquitetura molecular de IL-22/IL-22R1 é similar, mas não idêntica à observada em IL-10/IL-10R1 (JOSEPHSON; LOGSDON; WALTER, 2001). O ângulo entre os dímeros de IL-22 é diferente devido ao *loop* DE ser o mais flexível da IL-22 (NAGEN et al, 2002) e a uma possível interação das regiões N-terminais das IL-22R1s.

Tabela 6.2 – Parâmetros estruturais da IL-22/IL-22R1.

Parâmetros/Amostra	IL-22/IL-22R1		
	Exp*	Mod [†]	DAM [‡]
D _{máx} (nm)	11.50 ± 0.50	13.00	11.90
R _g (nm)	3.56 ± 0.02	3.34	3.48
Discrepância ^χ	-	1.31	1.20
Resolução (nm) [¶]	3.10	-	-
MM (kDa)	75.50	-	-

* Exp., calculado a partir dos dados experimentais.

† Mod, parâmetros obtidos a partir do modelo de corpo rígido.

‡ DAM, parâmetros obtidos do DAM.

χ Parametro de comparação com dados experimentais.

¶ Resolução = $2 * \pi / q_{máx}$

6.2.4 Conclusão

Resultados de SAXS mostraram que IL-22/IL-22R1 é um dímero composto por dois monômeros de IL-22/IL-22R1, semelhante, mas não idêntico a IL-10/IL-10R1. O complexo dimérico vai de acordo com aqueles conhecidos para IL-10/IL-10R1 e IFN- γ /IFN- γ R1, mas possui ângulo entre os monômeros de IL-22 diferente daqueles observados em IL-10 e IFN- γ . O conjunto desses resultados podem sugerir que as citocinas de classe 2 possuem um mecanismo conservado para interação com seus receptores, que constitui na formação de uma estrutura dimérica em forma de “v”.

Referências

ALTSCHUL, S.F. et al. Gapped blast and psi-blast: a new generation of protein database search programs **Nucleic Acids Research**, v. 25, n.17, .p. 3389–3402, 1997.

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

BANIAHMAD, A. et al. R.. Modular structure of a chicken lysozyme silencer: involvement of an unusual thyroid hormone receptor binding. **Cell**, v. 61, n. 3 , p. 505-514, 1990.

BARBOSA, A.F. One dimension gas position sensitive x-ray detector. **Revista de Física Aplicada e Instrumentação**, vol.10, n.1, p.29 , 1996.

BERMAN, H. M. et al. The protein data bank. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 235-242, 2000.

BRAGG, W. L.; The diffraction of short electromagnetic waves by a crystal. **Proceedings of the Cambridge Philosophical Society**, v. 17, n.1 , p. 43–57, 1914.

BRANDEN, C.; TOOZE, J. **Introduction to Protein Structure** :prediction, engineering, and design of protein structures. Nova York: Garland Publishing,1991. p. 247-266.

CALGARO, M.R et al. Nuclear receptor NGFI-B forms dimers with nonclassical interface. **Protein Science.**, v. 16, p. 1762-1772, 2007.

CATALANO-DUPUY D. L. et al. Reduction of the pea ferredoxin-NADP(H) reductase catalytic efficiency by the structuring of a carboxyl-terminal artificial metal binding site. **Biochemistry**, v. 45, p. 13899–13909, 2006 DOI: 10.1021/bi061152v.

CECCARELLI, E. A. et al. Functional plasticity and catalytic efficiency in plant and bacterial ferredoxin-NADP(H) reductases. **Biochimica Biophysica Acta.**,v. 1968, p. 155–165, 2004.

CRAIEVICH, A. F. Handbook of sol-gel science and technology: small-angle X-ray scattering. In: SAKKA, A., ALMEDIDA, R.,ed. **Nanostructured Materials**. Norwell:, Kluwer Academic, 2005. p.161-189. ISBN 978-1402079696.

CHACON, P. et al. Low-resolution structures of proteins in solution retrieved from X-ray scattering with a genetic algorithm. **Biophysical Journal**, v. 74, n. 6, p. 2760-2775. 1998.

CHACON, P. et al. Reconstruction of protein form with X-ray solution scattering and a genetic algorithm. **Journal Molecular Biology**, v. 299, n. 5, p. 1289-1302. 2000.

CHAMBON, P. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. **FASEB Journal.**, v. 10, n.9, p. 940-54, 1996.

DELANO, W. L. **The pymol molecular graphics system**. San Carlos, CA: DeLano Scientific, 2002.

DEVARAKONDA, S.et al. Structure of the heterodimeric ecdysone receptor DNA-binding cmplex. **EMBO Journal**, v. 22, p. 5827-5840, 2003.

FEIGIN, L. A.; SVERGUN, D. I. **Structure analysis by small-angle x-ray and neutron scattering**. New York: Plenum Press, 1987. ISBN 978-0306426292.

FIGUEIRA, A. C. M; et al. Low-resolution structures of thyroid hormone receptor dimers and tetramers in solution. **Biochemistry**, v. 46, n.5, p. 1273-1283, 2007

FISCHER, H. **Estudos estruturais de proteínas em solução por SAXS utilizando luz síncrotron**, 2005. p. 113. Tese, (Doutorado em Física Aplicada) - Instituto de Física Universidade de São Paulo, São Carlos , 1995.

FISCHER, H.; POLIKARPOV I.; CRAIEVICH, A. F. Average protein density is a molecular-weight-dependent function. **Protein Science.**, v. 13, p. 2825-2828, 2004 .

FORMAN, B. M.et al. Unique response pathways are established by allosteric interactions among nuclear hormone receptors. **Cell**, v. 81, p. 541-50, 1995.

FREDHOLM, E. I., Sur une classe d'equations fonctionnelles. **Acta Mathematica** , v. 27, p. 365–390, 1903.

GEKKO, K.; NOGUCHI, H. Compressibility of globular protein in water at 25°C. **Journal Physical Chemistry**, v. 83, p. 2706–2714, 1979.

GLASS, C.K. Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers. **Endocrine Reviews**, v. 15, p. 391-07, 1994.

GLATTER, O.; KRATKY, O. **Small angle x-ray scattering**. London: Academic Press, 1982. ISBN 978-0122862809.

GRONEMEYER, H.; LAUDET, V. Transcription factors 3: nuclear receptors. **Protein Profile**, v. 2, n. 11, p. 1173-11808, 1995.

GUINIER, A.; FOURNET, G. **Small angle scattering of x-rays**. New York: Wiley, 1955.

HANAWA-SUETSUGU, K.et al. Crystal structure of elongation factor P from thermus thermophilus HB8. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, vol. 101,n.33 , p. 9595–9600, 2004.

HARLOS, K. D. M.et al. Crystal structure of the extracellular region of human tissue factor. **Nature**, v. 370, p. 662–666., 1994.

HROMKOVIC, J. **Algorithms for hard problems**: introduction to combinatorial optimization randomization, approximation, and heuristics. London: Springer-Verlag, 2001.

JOSEPHSON, K.; LOGSDON, N. J.; WALTER, M. R. Crystal structure of the IL-10/IL-10R1 complex reveals a shared receptor binding site. **Immunity**, v. 15, n. 1, p. 35–46, 2001.

KELLERMANN, G. et al. The small angle X-ray scattering beamline at the Brazilian synchrotron light laboratory. **Journal Applied Crystallography**, v. 30, n.2, p. 880-883, 1997.

KONAREV, P. V et al. ATSAS 2.1, a program package for small-angle scattering data analysis. **Journal Applied Crystallography**, v. 39, n. 2, p. 277–286, 2006.

KONAREV, P.V.; PETOUKHOV, M. V.; SVERGUN, D. I. Automated matching of high- and low-resolution structural models. **Journal Applied Crystallography**, v 34. ,p.33-41, 2001.

KONAREV, P.V.et al. PRIMUS: a windows PC-based system for small-angle scattering data analysis. **Journal Applied Crystallograohy**, v. 36, p. 1277-1282, 2003.

KOTENKO, S. V. et al. Identification of the functional interleukin-22 (IL-22) receptor complex: the IL-10R2 chain (IL-10Rb) is a common chain of both the IL-10 and IL-22 (IL-10-related T cell-derived inducible factor, IL-TIF) receptor complexes. **Journal Biological Chemistry** , v. 76, n.4, p. 2725–2732, 2001.

KRISSINEL, E.; HENRICK, K. Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions. **Acta Crystallography D: Biology. Crystallography.**, v. 60, n.1 ,p. 2256–2268, 2004.

LAUDET, V.; GRONEMEYER, H. **The nuclear receptor**. New York: Academic Press, 2002.

LINTALA, M, et al. Structural and functional characterization of ferredoxin-NADP+ oxidoreductase using knock-out mutants of *Arabidopsis*. **Plant Journal** v.49; p. 1041-1052, 2007

LUISI, B.F. et al. Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. **Nature**. v. 352, p. 497, 1991. DOI:10.1038/352497a0

MACRANDER, A.T. et al. Broad energy band techniques for perturbation crystallography in crystal and multilayer optics. **Proceedings SPIE** v.3448, p.166, 1998.

MANDEL-GUTFREUND, Y.; SCHUELER, O.; MARGALIT, M. Comprehensive analysis of hydrogen bonds in regulatory protein dna-complexes: in search of common principles . **Journal Molecular Biology**, v.253, n. 2 , p. 370–382 1995.

MEINKE, G.; SIGLER, P. B. DNA binding mechanism of the monomeric orphan nuclear receptor NGFI-B. **Nature Structural Biology**. v.6, p.471-477, 1999. DOI:10.1038/8276.

MYLONAS, E.; SVERGUN, D. I. Accuracy of molecular mass determination of proteins in solution by small-angle X-ray scattering. **Journal Applied Crystallography**, v. 40, n.1, p. 245–249, 2007.

NAGEM, R. A. et al. Crystal structure of recombinant human interleukin-22. **Structure**, v. 10, n. 8 , p. 1051-1062, 2002.

NASCIMENTO, A. S. et al. Crystal structures of *Leptospira interrogans* FAD-containing ferredoxin-NADP⁺ reductase and its complex with NADP⁺BMC. **Structural Biology**, v. 7, p. 69-81, 2007.

NASCIMENTO, A. S. et al. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of ferredoxin reductase from *Leptospira interrogans*. **Structural Biology Crystallization Communications**, v.62, n.2 ,p.662-64, 2006.

OLIVEIRA NETO, M. et al. Interleukin-22 forms dimers that are recognized by two interleukin-22r1 receptor chains. **Biophysical Journal**,v.94, p. 1754–1765, 2008.

OLSON, W.K.et al. A standard reference frame for the description of nucleic acid base-pair geometry. **Journal Molecular Biology**, v. 313, n.1, p. 229-237. 2001.

PABO, C.O.; SAUER, R.T. Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition. **Annual Review Biochemistry**, v. 61, p. 1053-1095. 1992.

- PATTERSON, A. L. A direct method for the determination of the components of interatomic distances in crystals. **Zeitschrift fur . Kristallographie. A** , vol. 90, p. 517 – 542, 1935.
- PERLMANN, T.; JANSSON, L. A novel pathway for vitamin A signaling mediated by RXR heterodimerization with NGFI-B and NURR1. **Genes Development**, v. 9, p. 769-82, 1995.
- PIEDRAFITA, F. J. et al. Thyroid hormone receptor homodimers can function as ligand-sensitive repressors. **Molecular Endocrinology**, v.9 , n.5 , p. 563-578, 1995.
- RANDAL, M.; KOSSIAKOFF, A. A. The structure and activity of a monomeric interferon- γ -chain receptor signaling complex. **Structure**, v. .9, n.2 , p. 155–163, 2001.
- RASTINEJAD, F. et al. Structure of the RXR-RAR DNA-binding complex on the retinoic acid response element DR1. **EMBO Journal**, v. 19 , p. 1045-1054, 2000.
- RASTINEJAD, F. et al. Structural determinants of nuclear receptor assembly on DNA direct repeats. **Nature**, v. 375, p. 203-211, 1995. DOI:10.1038/375203a0.
- RIBEIRO, R. C. J.; KUSHNER, P. J.; BAXTER, J. D. The nuclear hormone receptor gene superfamily. **Annual Review Medicine**, v. 46, p. 443-453, 1995.
- ROEMER, S.C. et al. Structure of the progesterone receptor deoxyribonucleic acid complex novel interactions required for binding to half-site response elements. **Molecular Endocrinology**, v. 20, p. 3042-3052, 2006.

SAATCLOGLU, F.; DENG, T.; KARIN, M. A novel cis element mediating ligand-independent activation by c-erbA: implications for hormonal regulation. **Cell**, v. 75, p. 1095-1105, 1993.

SCHWABE, J. W. F. et al. The crystal structure of the estrogen receptor DNA binding domain bound to DNA how receptors discriminate between their response elements. **Cell**, v. 75, p. 567-578, 1993.

SEMENYUK, A.V.; SVERGUN, D. I. *GNOM* – A program package for small angle scattering data processing. **Journal of Applied Crystallography**, v. 24, n.5, p. 537 – 540, 1991.

SHAFFER, P.L.; GEWIRTH, D. T. Structural analysis of RXR–VDR interactions on DR3 DNA. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 89-90, p. 215-219, 2004.

SHAFFER, P.L.; GEWIRTH, D.T. Structural basis of VDR-DNA interactions on direct repeat response elements. **EMBO Journal**, v. 21, p. 2242-2252, 2002.

SHAFFER, P.L. et al. Structural basis of androgen receptor binding to selective androgen response elements. **Proceedings National Academy Science**, v. 101, n.14, p. 4758-4763, 2004.

SOLOMON, I. H. et al. Crystal structure of the human LRH-1 DBD-DNA complex reveals Ftz-F1 domain positioning is required for receptor activity. **Journal Molecular Biology**, v. 354, n.5, p. 1091-1102, 2005.

SQUIRE, P. G.; HIMMEL, M. E. Hydrodynamics and protein hydration. **Archives Biochemistry Biophysics**, v. 196, n.1, p. 165-177, 1979.

STUHRMANN, H. B. Ein neues verfahren zur bestimmung der oberfla chenform und der inneren struktur von gelosten globularen proteinen. **Zeitschrift fur Physikalische Chemie Neue Folge**, v. 72, p. 177–198. 1970.

STUHRMANN, H. B. Interpretation of small-angle scattering of dilute solutions and gases: a representation of the structures related to a one-particle scattering functions. **Acta Crystallographica A**, v.26, n.3, p. 297–306, 1970.

SVERGUN, D. I. Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. **Journal Applied Crystallography**, v. 25, n.4, p. 495–503. 1992.

SVERGUN, D. I. Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing. *Biophysical Journal*, v.76, n.6, p.2879-2866, 1999.

SVERGUN, D. I.; BARBERATO, C.; KOCH, M. H. J., Crysol - a program to evaluate X-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates. **Journal Applied Crystallography**, v. 28, n.6, p. 768 – 773, 1995.

SVERGUN, D. I.; PETOUKHOV, M. V. AND KOCH., M. H. J. Determination of domain structure of proteins from x-ray solution scattering. **Biophysical Journal**, v.80, p. 2946-2953. 2001.

SVERGUN, D.I.; KOCH, M. H. J. Small-angle scattering studies of biological macromolecules in solution. **Reports Progress Physics**, v. 66, p. 1735 – 1782, 2003.

SVERGUN, D.I. et al. New developments in direct shape determination from small-angle scattering. 2. uniqueness. **Acta Crystallographica A**, v. 52, p. 419-426, 1996.

VOLKOVA, V.V.; SVERGUN, D.I. Uniqueness of *ab initio* shape determination in small-angle scattering. **Journal Applied Crystallography**. v. 36, n 3, p. 860-864, 2003.

ZDANOV, A. et al. Crystal structure of interleukin-10 reveals functional dimer with an unexpected topological similarity to interferon gamma. **Structure.**, v. 3, n. 6, p. 591–601, 1995.

ZHAO, Q. et al. Structural basis of RXR -DNA interactions. **Journal Molecular Biology**, v. 296, n.2, p. 509-520, 2000.

ZHAO, Q. et al. Structural elements of an orphan nuclear receptor dna complex. **Molecular Cell**, v. 1, n.6, p. 849-861, 1998.

Anexo 1. Lista de trabalhos publicados durante o período.

“Structural Analysis of an Echinococcus granulosus Actin-Fragmenting Protein by Small-Angle X-Ray Scattering Studies and Molecular Modeling”

Eliana D. Grimm, Rodrigo V. Portugal, Mario de Oliveira Neto, Nadia H. Martins, Igor Polikarpov, Arnaldo Zaha and Henrique B. Ferreira.

Biophysical Journal. 2006, May; 90:3216-3223.

[doi: 10.1529/biophysj.105.067801](https://doi.org/10.1529/biophysj.105.067801)

“Structural Rearrangements in the Thyroid Hormone Receptor Hinge Domain and Their Putative Role in the Receptor Function”

Alessandro S. Nascimento, Sandra Martha Gomes Dias¹, Fábio M. Nunes, Ricardo Aparício, André L. B. Ambrosio, Lucas Bleicher, Ana Carolina M. Figueira, Maria Auxiliadora M. Santos, Mario de Oliveira Neto, Hannes Fischer, Marie Togashi, Aldo F. Craievich, Richard C. Garratt, John D. Baxter, Paul Webb and Igor Polikarpov.

J. Mol. Biol. 2006, Jul; 360:586-98.

[doi:10.1016/j.jmb.2006.05.008](https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.05.008)

“Dissection of a Human Septin: Definition and Characterization of Distinct Domains within Human SEPT4”

Wanius Garcia, Ana Paula Ulian de Araújo, Mario de Oliveira Neto, Michel R. M. Ballesterro, Igor Polikarpov, Manami Tanaka, Tomoo Tanaka, and Richard Charles Garratt

Biochemistry 2006, Oct; 45:13918-13931.

[doi: 10.1021/bi061549z](https://doi.org/10.1021/bi061549z)

“Low-resolution structure and fluorescence anisotropy analysis of protein tyrosine phosphatase η catalytic”

Huita C. Matozo, Maria A. M. Santos, Mario de Oliveira Neto, Lucas Bleicher, Luis Mauricio T. R. Lima, Rodolfo Iuliano, Alfredo Fusco, and Igor Polikarpov.

Biophysical Journal 2007, Jun; 92:4424–4432.

[doi: 10.1529/biophysj.106.094961](https://doi.org/10.1529/biophysj.106.094961)

“Low resolution structures of thyroid hormone receptor dimers and tetramers in solution”

Ana Carolina Migliorini Figueira, Mario de Oliveira Neto, Amanda Bernardes, Sandra Martha Gomes Dias, Aldo F. Craievich, John D. Baxter, Paul Webb, and Igor Polikarpov.

Biochemistry 2007, Nov; 46, 1273-1283.

[doi:10.1021/bi061698h](https://doi.org/10.1021/bi061698h)

“Orphan nuclear receptor NGFI-B forms dimers with nonclassical interface”

Marcos R. Calgaro, Mario de Oliveira Neto, Ana Carolina M. Figueira, Maria A. M. Santos, Rodrigo V. Portugal, Carolina A. Guzzi, Daniel M. Saidenberg, Lucas Bleicher, Javier Vernal, Pablo Fernandez, Hernán Terenzi, Mario Sergio Palma and Igor Polikarpov.

Protein Sci. 2007, Aug; 16:1762-1772.

[doi:10.1110/ps.062692207](https://doi.org/10.1110/ps.062692207)

“Crystal structures of *Leptospira interrogans* FAD-containing ferredoxin-NADP+ reductase and its complex with NADP+”

Alessandro S Nascimento, Daniela L. Catalano-Dupuy, Amanda Bernardes, Mario de Oliveira Neto, Maria Auxiliadora M. Santos, Eduardo A Ceccarelli and Igor Polikarpov.

BMC Structural Biology 2007, Oct; 7:69

[doi:10.1186/1472-6807-7-69](https://doi.org/10.1186/1472-6807-7-69)

“Nanoscale conformational ordering in polyanilines investigated by SAXS and AFM”

Fabio L. Leite, Mario de Oliveira Neto, Leonardo G. Paterno, Michel R.M. Ballesteros, Igor Polikarpov, Yvonne P. Mascarenhas, Paulo S.P. Herrmann, Luiz H.C. Mattoso, Osvaldo N. Oliveira Jr.

Journal of Colloid and Interface Science 2007, Dec; 316:376–387

[doi:10.1016/j.jcis.2007.08.069](https://doi.org/10.1016/j.jcis.2007.08.069)

“Interleukin-22 forms dimers which are recognized by two interleukin-22R1 receptor chains”

Mario de Oliveira Neto, José Ribamar Ferreira Júnior, Hannes Fischer, Alessandro S. Nascimento, Aldo F. Craievich, Didier Colau, Laure Dumoutier, Jean-Christophe Renauld and Igor Polikarpov

Biophysical Journal 2008, Mar; 94:1754–1765.

[doi: 10.1529/biophysj.107.112664](https://doi.org/10.1529/biophysj.107.112664)

“Simulated Annealing of Two Electron Density Solution Systems”

Mario de Oliveira Neto, Ronaldo Luiz Alonso, Fabio Lima Leite, Osvaldo N. Oliveira Jr, Igor Polikarpov and Yvonne Primerano Mascarenhas.

In: I-Tech Education and Publishing KG. (Org.). Global Optimization: Focus on Simulated Annealing. Kirchengasse 43/3: I-Tech Education and Publishing KG, 2008, *no prelo*

Anexo 2 – Publicações descritas na tese

“Simulated Annealing of Two Electron Density Solution Systems”

Mario de Oliveira Neto, Ronaldo Luiz Alonso, Fabio Lima Leite, Osvaldo N. Oliveira Jr, Igor Polikarpov and Yvonne Primerano Mascarenhas.

In: I-Tech Education and Publishing KG. (Org.). Global Optimization: Focus on Simulated Annealing. Kirchengasse 43/3: I-Tech Education and Publishing KG, 2008, *no prelo*

“Crystal structures of Leptospira interrogans FAD-containing ferredoxin-NADP+ reductase and its complex with NADP+”

Alessandro S Nascimento, Daniela L. Catalano-Dupuy, Amanda Bernardes, Mario de Oliveira Neto, Maria Auxiliadora M. Santos, Eduardo A Ceccarelli and Igor Polikarpov.

BMC Structural Biology 2007, Oct; 7:69

[doi:10.1186/1472-6807-7-69](https://doi.org/10.1186/1472-6807-7-69)

“Interleukin-22 forms dimers which are recognized by two interleukin-22R1 receptor chains”

Mario de Oliveira Neto, José Ribamar Ferreira Júnior, Hannes Fischer, Alessandro S. Nascimento, Aldo F. Craievich, Didier Colau, Laure Dumoutier, Jean-Christophe Renauld and Igor Polikarpov

Biophysical Journal 2008, Mar; 94:1754–1765.

[doi: 10.1529/biophysj.107.112664](https://doi.org/10.1529/biophysj.107.112664)