Universidade de São Paulo
Instituto de Física de São Carlos
Centro de Biotecnologia Molecular Estrutural

Determinantes estruturais da interação entre PPAR γ e o ácido ajulêmico e bases do reconhecimento molecular entre HIV-1 Integrase e o coativador transcricional p75

Andre Luis Berteli Ambrosio

Tese apresentada ao programa de pós-graduação do Instituto de Física de São Carlos, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Física Aplicada - área de concentração: Física Biomolecular.

OK

Orientador: Prof. Dr. Richard Charles Garratt

USP/IFSC/SBI

8-2-001742

Maio – 2006
São Carlos – SP

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA
INFORMAÇÃO

Ambrosio, André Luis Berteli

“Determinantes estruturais da interação entre PPAR γ e o ácido ajulêmico e bases do reconhecimento molecular entre HIV-1 Integrase e o coativador transcricional p75”

André Luis Berteli Ambrosio – São Carlos, 2006

Tese (Doutorado) – Área de Física Aplicada- opção Biomolecular do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo

2006 - Páginas: 79

Orientador: Prof. Dr. Richard Charles Garratt

1. HIV-1 2. Coativador Transcricional p75

I. Título

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

Av. Trabalhador São-carlense, 400 - CEP 13566-590
Caixa Postal 369 - CEP 13560-970
São Carlos - SP - BRASIL

MEMBROS DA COMISSÃO JULGADORA DA TESE DE DOUTORADO
DE **ANDRÉ LUIS BERTELI AMBRÓSIO**, APRESENTADA AO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS, UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO, EM 11/05/2006.

COMISSÃO JULGADORA:

Prof. Dr. Richard Charles Garratt (Orientador e Presidente)

Prof. Dr. Glaucius Oliva (IFSC/ USP)

Prof. Dr. Francisco de Assis Rocha Neves (UNB)

Dra. Paula Regina Kuser Falcão (EMBRAPA)

Dr. Mário Sanches Matilde Júnior (LNLS)

à minha mãe Sueli,
ao meu pai José Renato (*in memoriam* †),
à minha irmã Cintia
e à Sandra xuxu, meu amor

... qualquer semelhança com a sua realidade, é mera coincidência...

* histórias retiradas de <http://www.phdcomics.com>

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Richard Charles Garratt pela indubitável orientação, liberdade de trabalho, amizade, respeito, etc...

À Sandra xuxu, que além de ser minha paixão e minha companheira na vida é minha colaboradora científica (pacote completo).

À todos aqueles que se tornarem meus grandes amigos pra toda vida (você sabem quem são). O que a distância separa, o Skype une.

Aos Doutores Igor Polikarpov, Peter Cherepanov, Tom Ellenberger, Sumner Burstein e Robert Zurier por acreditarem e confiarem parte dos seus projetos a mim.

À todo o pessoal do grupo de Cristalografia de Proteínas do Centro de Biotecnologia Molecular Estrutural (professores, alunos e funcionários), pela agradável convivência.

À minha família e em especial aos parentes mais próximos.

À todos os meus amigos dentro e fora da USP.

À todo o pessoal do Instituto de Física de São Carlos/USP.

E àqueles que de maneira direta ou indireta contribuíram para o bom andamento deste projeto.

À FAPESP pelo auxílio financeiro (processo # 03/00231-0).

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS..... I
LISTA DE TABELAS II
ABREVIACES II
RESUMO III
ABSTRACT IV

PARTE I - Estrutura cristalográfica do complexo PPARγ-LBD:AJA

CAPÍTULO 1
INTRODUÇÃO..... 2
 RECEPTORES NUCLEARES..... 2
 O receptor nuclear PPARγ..... 7
 Canabinóides e o ácido ajulêmico 11
 Referências do capítulo 15
CAPÍTULO 2
DA CLONAGEM DO GENE  DETERMINACO ESTRUTURAL DA PROTEÍNA 19
 Referências do capítulo 33
CAPÍTULO 3
ANÁLISE ESTRUTURAL E DISCUSSES..... 36
 Descrio do modelo cristalográfico 36
 O modo de interao de AJA e sua consequência na seletividade pelo tipo γ 39
 Contatos intermoleculares no cristal e as moléculas de AJA presentes na interface 41
 Comparao estrutural com outros PPAR-LBD..... 46
 Mais sobre o sítio externo de ligao de AJA 50
 Se PPARγ liga AJA, porque não ligaria Δ⁹-THC e cido THC-11-ico?..... 51
 Referências do capítulo 52
CAPÍTULO 4
CONSIDERAES FINAIS 54

PARTE II - Estrutura cristalográfica do complexo HIV-1 IN-CCD: LEDGF-IBD

CAPÍTULO 1
INTRODUÇÃO..... 58
 HIV-1 IN e o problema biológico associado 58
 A importância da integrase na replicao do HIV 60
 Inibidores de HIV IN: mais de dez anos de tentativas 62
 Referências do capítulo 63
CAPÍTULO 2
DETERMINACO DA ESTRUTURA CRISTALOGRAFCA..... 64
 Procedimento experimental..... 64
 Referências do capítulo 67
CAPÍTULO 3
RESULTADOS E DISCUSSES..... 69
 A estrutura cristalográfica do complexo protéico IN-CCD: LEDGF-IBD 69
 Bases estruturais para o reconhecimento molecular entre HIV-1 Integrase e LEDGF..... 72
 Implicaes da funo da HIV-1 IN no desenho de inibidores específicos para a interface de
 formao do complexo 75
 Referências do capítulo 76
APÊNDICES
I. Outros trabalhos realizados durante o período de doutoramento..... 79
II. Artigo publicado

LISTA DE FIGURAS

PARTE I - Estrutura cristalográfica do complexo PPARγ-LBD:AJA

Figura 1.1: Organização estrutural e funcional dos receptores nucleares.....4

Figura 1.2: Enovelamento canônico de LBD para PPAR8

Figura 1.3: Mecanismo geral de ação do PPAR9

Figura 1.4: A principal via de metabolização do Δ⁹-THC12

Figura 1.5: Estrutura e propriedades físicas do ácido ajulêmico (AJA).....13

Figura 2.1: Purificação da região LBD21

Figura 2.2: Cristais da região LBD da proteína humana PPARγ na forma *apo*.....22

Figura 2.3: Cristal da região LBD em complexo com o ligante AJA.....25

Figura 2.4: Moléculas de AJA no bolsão de ligação ao ligante27

Figura 2.5: Moléculas de AJA na superfície do monômero27

Figura 2.6: Cristais da região LBD em complexo com o ligante AJA.....28

Figura 2.7: AJA na estrutura determinada a 2,8 Å de resolução30

Figura 2.8: Comparação estatística de R e R_{free}.....31

Figura 2.9: Diagrama de Ramachandran do modelo cristalográfico final.....32

Figura 2.10: Algumas das estatísticas geradas pelo programa PROCHECK.....33

Figura 3.1: Estrutura cristalográfica da região LBD de PPARγ em complexo como ácido ajulêmico37

Figura 3.2: Comparação entre as estruturas dos monômeros na unidade assimétrica38

Figura 3.3: Interação de AJA com os resíduos no bolsão de ligação ao ligante da região LBD41

Figura 3.5: Interface mediada por AJA.....43

Figura 3.6: Contatos realizados por AJA na interface do dímero cristalográfico.....44

Figura 3.7: Mudanças no estado de oligomerização de PPARγ-LBD sob diferentes condições, por
 filtração em gel analítica45

Figura 3.8: Sobreposição estrutural entre as diversas estruturas da região LBD de PPARγ49

Figura 3.9: AJA e n-heptil-β-D-glicopiranosídeo no sítio de ligação de “NR box”.....51

PARTE II - Estrutura cristalográfica do complexo HIV-1 IN-CCD: LEDGF-IBD

Figura 1-1: O ciclo de replicação do HIV e os pontos alvo para o desenho de fármacos61

Figura 2-1: Cristais do complexo IN-CCD:LEDGF-IBD65

Figura 3-1: Representação estereográfica do modelo cristalográfico IN-CCD:LEGDF-IBD.....70

Figura 3-2: Contatos observados na interface de interação de IN-CCD com LEDGF-IBD71

Figura 3-3: Análise das seqüências primárias de HIV-1, HIV-2 e FEV IN.....73

Figura 3- 4: Detalhes da interface de contato entre as duas cadeias de HIV-1 IN-CCD74

Figura 3- 5: Diferenças na interface de dimerização entre HIV-1 IN e RSV IN.....75

LISTA DE TABELAS

PARTE I - Estrutura cristalográfica do complexo PPARγ-LBD:AJA

Tabela 1.1: Alguns do genes cuja expressão é regulada por PPARγ.....10

Tabela 2.1: Parâmetros e estatísticas da coleta e processamento dos dados do cristal PPARγ-LBD na forma *apo*.....23

Tabela 2.2: Parâmetros e estatísticas da coleta e processamento dos dados de difração de raios X para a proteína na em complexo com AJA (cristais crescidos a 18 °C).....25

Tabela 2.3: Parâmetros e estatísticas da coleta e processamento dos dados de difração de raios X coletados a partir dos cristais do complexo crescidos a 10 °C.....29

PARTE II - Estrutura cristalográfica do complexo HIV-1 IN-CCD: LEDGF-IBD

Tabela 2-1: Parâmetros e estatísticas da coleta e processamento dos dados do cristal do complexo HIV-1 IN-CCD: LEDGF-IBD67

ABREVIACÕES

- PPAR – *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*
AJA – ácido ajulêmico
DBD – *DNA Binding Domain*
LBD – *Ligand Binding Domain*
THC – Tetrahidrocanabinol
PDB – *Protein Data Bank*
PPRE – *Peroxisome Proliferator Responsive Element*
DR-1 – *Direct Repeat-1*
RXR – *Retinoid X Receptor*
NIDDM – *Non-insulin dependent diabetes mellitus*
TZD – *thiazolidinedione*
CB1 – receptor de canabinóides 1
CB2 – receptor de canabinóides 2
FDA – *Food and Drug Administration*
PCR – *Polimerase Chain Reaction*
cDNA – *Complementary DNA*
NCS – *Non-crystallographic Symmetry*
AIDS – *Acquired Immunodeficiency Syndrome*
HIV – *Human Immunodeficiency Virus*
EMA – *European Medicine Agency*
Anvisa – Agência Nacional Vigilância Sanitária
HAART – *Highly Active Antiretroviral Therapy*
HIV-1 IN – *HIV-1 Integrase*
CCD – *Catalytic Core Domain*
LEDGF – *Lens-Epithelium Derived Growth Factor*
IBD – *Integrase Binding Domain*

RESUMO

Ácido ajulêmico (AJA) é um análogo sintético do ácido THC-11-óico, um metabólito do composto tetraidrocanabinol (THC), principal ingrediente ativo da maconha, uma droga derivada da planta *cannabis sativa*. A principal característica do composto AJA é que este apresenta potentes efeitos analgésico e antiinflamatório, sem a ação psicotrópica do THC. AJA não é ulcerogênico em doses terapêuticas e encontra-se atualmente na fase I de testes clínicos, apesar de seu mecanismo de ação não ser completamente entendido. Vários estudos têm reportado que AJA se liga de maneira direta à isoforma γ da família PPAR de receptores nucleares, induzindo sua atividade transcricional em modelos humanos e em ratos, quando administrado em concentrações farmacológicas. Atualmente AJA se encontra em fase I de testes clínicos, sob aprovação do FDA (*Food and Drug Administration*, E.U.A.). Neste trabalho, é determinada e analisada a estrutura cristalográfica do complexo PPAR γ -LBD:AJA, mostrando que de fato este receptor pode ser o (ou um) mediador da ação terapêutica de AJA *in vivo*. Na segunda parte da tese é apresentada a estrutura cristalográfica do complexo entre o domínio catalítico da integrase de HIV e parte do coativador transcricional p75 (também conhecido como LEDGF), mostrando as bases estruturais do reconhecimento molecular no hospedeiro por enzimas retrovirais, passo esse crucial para a replicação viral. Tal importância tem sido explorada no desenvolvimento de fármacos anti-retrovirais, que possam inibir o passo de integração do cDNA viral no genoma humano, atacando o sítio ativo da enzima. Devido a características da interface observada no modelo cristalográfico, sugerimos tal região pode vir a ser um novo alvo no desenho de pequenas moléculas que interfiram no reconhecimento molecular.

ABSTRACT

Ajulemic acid (AJA) is a synthetic analog of the tetrahydrocannabinol (THC) metabolite THC-11-oic acid. THC is a major active ingredient of the drug marijuana derived from the plant *cannabis sativa*. It has been shown that AJA has potent analgesic and anti-inflammatory activity without the psychotropic action of THC. At therapeutic doses AJA is not ulcerogenic, making it a promising anti-inflammatory drug. Furthermore, AJA is currently under phase I of clinical tests by Indevus Pharmaceuticals (USA). However, the mechanism of AJA action remains unknown. It has been shown by biochemical assays that AJA binds directly and specifically to the peroxisome proliferators-activated receptor γ (PPAR γ) indicating that this may be a potential target for drug-development in the treatment of pain and inflammation. In this work we describe the crystal structure of the ligand binding region of this receptor in complex with ajulêmico acid, showing that in fact they may be partners *in vivo*, also providing structure-based answers for current questions, for example, the specificity for the isoform γ . The binding mode of AJA gives clues about modifications on its structure that might lead to development of more specific and potent molecules. In the second half, it is presented the crystal structure of macromolecular complex between the catalytic core domain of HIV-1 Integrase and the integrase-binding domain of LEDGF (also known as *p75*). Inspection of the crystallographic model suggests the presence of a specific interface, sharing a high number of tight contacts, apparent lentiviral tropism of LEDGF. Also, our results, along with *in vitro* assays previously reported, encourage efforts to exploit virus-host protein interactions for the development of novel antiretroviral drugs.

PARTE I
ESTRUTURA CRISTALOGRÁFICA DO
COMPLEXO
PPAR γ -LBD:AJA

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

No capítulo introdutório é feito um rápido resumo sobre algumas características funcionais e estruturais de receptores nucleares. Em seguida, é introduzido o receptor PPAR γ , que é o tema central deste trabalho e seu modo de ação em parceria com o receptor RXR α . Provavelmente, estes são os receptores que mediam a ação de um novo agonista sintético, o ácido ajulêmico (AJA), pertencente à família dos canabinóides. AJA foi desenvolvido a partir de modificações de um metabólito ácido do THC, principal componente psicoativo da planta *Cannabis sativa*. AJA apresenta potentes efeitos analgésico e antiinflamatório, mas não induz o componente psicoativo. Estas evidências sugerem que AJA pode vir a ser usado como agente terapêutico para tratamento de inflamações e redução de dor.

RECEPTORES NUCLEARES

Em organismos multicelulares, vias específicas de comunicação intercelular são essenciais para a garantia da organização do sistema durante a embriogênese, bem como para o desenvolvimento, manutenção de suas propriedades e funções durante o ciclo de vida. Essa comunicação ocorre através da secreção de centenas de tipos de moléculas sinalizadoras, incluindo proteínas, pequenos peptídeos, aminoácidos, nucleotídeos, hormônios, vitaminas, ácidos graxos e seus derivados.

As células alvo respondem independentemente da natureza desses sinais, por intermédio de proteínas específicas denominadas receptores. A ligação entre as moléculas sinalizadoras e seus receptores desencadeia vários processos de respostas nas células alvo. As proteínas receptoras são encontradas desde a membrana (receptores transmembrânicos), passando pelo citoplasma, até o núcleo das células (conhecidos como receptores nucleares). Esses últimos requerem a entrada do ligante sinalizador

dentro da célula, a fim de ativar seus componentes. Estes ligantes geralmente são suficientemente pequenos e hidrofóbicos para se difundirem através da membrana plasmática, mas também contam com um sistema de transporte ativo [1].

Os receptores nucleares geralmente agem através da regulação da transcrição de genes-alvo, respondendo a uma grande variedade de hormônios ou sinais metabólicos de maneira direta ou através da associação física com os mesmos. Estas proteínas integram também diversas vias de sinalização podendo ser, elas próprias, alvos de modificação pós-traducional (por exemplo, fosforilação). Por essas e outras razões, os receptores nucleares são uns dos sinalizadores inter/intracelulares mais importantes, pois convergem diferentes sinais internos e externos na regulação de programas genéticos. A programação genética, estabilizada ou modificada por eles, afeta virtualmente todos os aspectos da vida dos organismos multicelulares como, por exemplo, embriogênese, homeostase e reprodução, assim como desenvolvimento e morte celular. A regulação transcricional e a seletividade promovida por estes receptores têm fomentado pesquisas intensas sobre fatores-chave destes processos, no intuito de se tentar decifrar a rede complexa dos eventos moleculares responsáveis pelas suas ações.

Os receptores nucleares exibem também íntima relação com diversas doenças metabólicas e vários tipos de câncer, sendo, por isso, considerados alvos para novas alternativas de tratamento. Os grupos de agonistas (glucocorticóides, estrogênios, vitamina D, retinóides, androgênios, tiroxina, etc.) e antagonistas que atuam nestes receptores constituem hoje uma das classes de fármacos mais procuradas para a prática médica, sendo, portanto, importantes alvos para o desenvolvimento de medicamentos.

Apesar da capacidade de ligar pequenas moléculas hidrofóbicas ser uma das características principais desta família de receptores, ainda existem alguns membros cujo ligante natural ainda não foi identificado, ou que até mesmo não apresentam capacidade de interação com qualquer ligante [2,3]. Estes membros são conhecidos como “receptores órfãos”. Entretanto, essa definição tem se mostrado cada vez menos aplicável, com a identificação de novos ligantes *bona fide* e com o grande e rápido avanço dos estudos na área.

Até hoje, foram identificados aproximadamente 75 diferentes receptores nucleares dentro do reino animal, desde nematódeos até o homem, sendo, portanto, proteínas cujo surgimento na escala evolutiva precedeu a diferenciação entre invertebrados e vertebrados [4]. Esses receptores constituem uma família de fatores de transcrição que apresentam estrutura tridimensional com 5-6 regiões (variando de 40 a 100 KDa) funcionalmente conservados, apesar da grande variação nas seqüências de aminoácidos (para dados atualizados, visite NuReBase, *Nuclear Receptor dataBase*, em <http://www.ens-lyon.fr/LBMC/laudet/nurebase/nurebase.html>). Como representado esquematicamente na figura 1.1, os receptores nucleares são formados por 5 ou 6 regiões (A-F, originalmente definidos por Krust e colaboradores [5]) que podem ser organizadas em três domínios funcionais, caracterizados como se segue.

Figura 1.1: Organização estrutural e funcional dos receptores nucleares. As seis regiões características (A-F) são divididas em três domínios funcionais - N-terminal, regiões A/B, em verde; domínio de ligação ao DNA, região C, em vermelho escuro; domínio de ligação ao ligante, região E, em azul - além de uma porção provavelmente responsável por garantir flexibilidade entre DBD e LBD (funcionando como uma dobradiça; região D em amarelo) e uma extensão na região C-terminal, pouco conservada evolutivamente, dita como responsável por auxiliar no recrutamento e seleção de proteínas coativadoras (região F, em lilás).

Em termos gerais, o domínio N-terminal (em média 120 aminoácidos), que compreende as regiões A/B, diverge completamente em tamanho e composição de aminoácidos entre os diversos membros, mas apresenta uma propriedade comum de transativação denominada de AF-1 (*Activation Function 1*), a qual promove a ativação da transcrição gênica de maneira constitutiva. Ainda hoje não existe estrutura tridimensional determinada para essa região e a predição de seu enovelamento não é trivial. Esse domínio tem sido extensivamente descrito como sendo sujeito a modificações pós-traducionais, como fosforilação (revisadas em [6]), com a função de regular a transativação e interagir cooperativa e sinergeticamente com a região H12,

localizada no módulo E (descrito adiante). O entendimento dessas funções tem sido tema de exaustivos estudos em diversos laboratórios. Finalmente, AF-1 apresenta especificidade por diferentes tipos de células, domínios de ligação à DNA e regiões promotoras [7-9].

O segundo domínio, que envolve a região C, é funcionalmente responsável pelo reconhecimento e ligação do receptor ao seu elemento responsivo (*DNA Binding Domain*, DBD), além de propriedades de formação de dímeros [10]. Este domínio possui alta identidade sequencial entre os diversos receptores e é basicamente formado por dois motivos estruturais *zinc-finger* (formados por 4 resíduos de cisteína e um átomo de zinco, cada). Diversas estruturas tridimensionais foram determinadas para esse domínio para diferentes receptores, por diferentes técnicas espectroscópicas, e encontram-se depositadas no banco de dados PDB, em www.rcsb.org [11].

A região D é também conhecida como dobradiça (do inglês *hinge*), devido à sua função de permitir que as regiões C e E (domínio de ligação ao ligante) assumam diferentes conformações sem criar problemas de impedimento estérico, é pouco conservada entre os diferentes membros da família, apresentando geralmente 20 – 30 aminoácidos.

Já a região E é tida como a principal porção estrutural de um receptor nuclear, por ser responsável por uma grande variedade de funções, tais como servir de interface de dimerização com outros receptores, ligação com agentes agonistas ou antagonistas, além de a função de ativação ligante-dependente AF-2 (*Activation Function 2*), que favorece a ligação de complexos de proteínas coativadoras ou correpessoras da transcrição de genes [10, 12-14]. Por essa razão, essa região é denominada domínio de ligação ao ligante (*Ligand Binding Domain*, LBD).

Na ausência de ligantes endógenos ou xenobióticos os receptores são referidos com estando na forma *apo*, enquanto que a ligação de ligantes os coloca na forma *holo*. Análises baseadas em alinhamento sequencial sugerem um enovelamento comum para a região LBD de todos os membros da família dos receptores nucleares [15].

O LBD (~ 280 aminoácidos), como mostrado através de diversas estruturas cristalográficas, é composta de 12 α -hélices antiparalelas, formando um *sandwich* de três camadas e mais quatro pequenas fitas- β (de fato, o número de fitas depende do

receptor), formando pequenos grampos. As hélices são numeradas de 1 a 12, de acordo com nomenclatura padrão [16]. A organização terciária assumida pelas hélices gera uma cavidade hidrofóbica (de volume bastante variável, dependendo também do receptor), dentro da qual os ligantes se ligam.

Com a determinação de diversas estruturas cristalográficas dessa região, foi demonstrado que esta sofre importantes modificações conformacionais quando na ausência ou presença de ligante. Essa transição estrutural é chamada de “mecanismo ratoeira” [12, 17], pois envolve basicamente a abertura e fechamento da hélice C-terminal, chamada de hélice-12, para entrada e acomodação do ligante, respectivamente, em um movimento que lembra o funcionamento de ratoeiras. Ainda, o fechamento da hélice-12 expõe uma cavidade hidrofóbica na superfície da proteína que acomoda a interação intermolecular com proteínas coativadoras [18-20]. Esse mecanismo parece cada vez menos geral, uma vez que em receptores como PPAR, H12 encontra-se fechada sobre o bolsão de ligação ao ligante tanto na forma *apo*, quanto na presença de ligantes. A implicação desta no trabalho descrito nesta tese, será discutida detalhadamente na seção de análise e discussão dos dados experimentais (capítulo 3). Essa região é também responsável pela formação de dímeros funcionais (tanto hétero como homodímeros), de maneira cooperativa com a porção DBD. Estes dímeros são responsáveis pelo reconhecimento dos elementos responsivos e regulados por ligantes dos dois parceiros, em um arranjo essencial para regulação da transcrição gênica.

E por último, a região F (em lilás, na figura 1) ainda é alvo de intensa pesquisa, pois sua função ainda não é bem entendida, uma vez que esta se encontra presente em poucos membros da família e apresenta pequena conservação evolucionária. A literatura recente aponta para funções de seleção no recrutamento de coativadores através de mudanças na superfície da proteína [21, 22].

Até hoje, não existem estruturas cristalográficas determinadas para duas ou mais regiões juntas (por exemplo, DBD + LBD), sendo este um objetivo procurado exaustivamente por laboratórios no mundo inteiro.

Detalhes revisados sobre mecanismos de reconhecimento de elementos responsivos, ligação a ligantes (agonistas e antagonistas) e de regulação da transcrição podem ser encontrados em livro texto de Laudet & Gronemeyer [10].

O receptor nuclear PPAR γ

A família PPAR (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*) de receptores nucleares foi inicialmente denominada devido à habilidade do primeiro membro descoberto de induzir a proliferação de peroxissomos hepáticos em ratos, em resposta a estímulos xenobióticos [23]. Contudo, recentes estudos sobre a ação e a estrutura das três isoformas (PPAR α , PPAR γ e PPAR δ) sugerem que essas não são capazes de induzir uma proliferação significativa de peroxissomos em fígado humano, nem mesmo sob a ação de potentes agonistas.

Nos últimos tempos, uma variedade enorme de diferentes processos metabólicos, nos quais PPAR tem influência direta ou secundária, têm sido reportados. Para se ter uma idéia, apenas nos primeiros três meses do ano de 2006, 106 novos trabalhos foram publicados, e podem ser encontrados no banco de dados PUBMED (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed>).

Em termos estruturais, PPARs, como a maioria dos outros receptores, possuem uma estrutura modular composta pelos domínios A/B, C, D e E, como descritos na seção anterior. Os domínios de ligação ao DNA (DBD) e ao ligante (LBD) são altamente conservados dentro das isoformas. Já a porção N-terminal é altamente divergente, sendo que existe uma variação na sequência desta, mesmo dentro do tipo γ , produzindo as isoformas γ -1 e γ -2 (este último apresenta uma adição de 28 aminoácidos na extremidade N-terminal).

A região LBD (273 aminoácidos) também possui o enovelamento canônico para esta região, conforme citado acima e mostrado na figura 1.2. O bolsão hidrofóbico de ligação ao ligante, em PPAR γ , possui um volume aproximado entre 1300 a 1400 Å³, sendo o maior já descrito para um receptor nuclear [24]. Atualmente dezenas de estruturas cristalográficas, tanto para DBD (na ausência ou presença do elemento responsivo), como para LBD (na forma *apo* ou em complexo com vários ligantes), das três isoformas de PPAR estão depositadas no banco de dados PDB.

Figura 1.2: Enovelamento canônico de LBD para PPAR. Representação *cartoon* da estrutura tridimensional canônica do domínio de ligação ao ligante de receptores nucleares. Coloração do tipo arco-íris, com N-terminal (H1) mostrado em azul-escuro e C-terminal (H12) em vermelho. Nomenclatura padrão para estruturas secundárias, conforme [15]. A região entre H1 e H3 é chamada de ω -loop, e consiste de H2, β 1, H2' e o grande loop, até o início de H3.

O processo no qual PPAR se liga ao seu elemento responsivo (DNA) e regula a transcrição tem sido extensivamente revisado [25, 26]. Basicamente, a ligação de um ligante ao PPAR causa um pequeno reajuste conformacional na região AF2, fazendo com que essa se feche sobre o domínio de ligação ao ligante, LBD (uma vez que a estrutura apo de PPAR mostra que H12 encontra fechada sobre o bolsão de ligação ao ligante). Em seguida, ocorre a formação de um complexo heterodimérico com outros fatores de transcrição (como por exemplo, o receptor do ácido 9-*cis*-retinóico, RXR), caracterizando-se a unidade funcional de regulação da transcrição, que se liga aos elementos responsivos específicos do PPAR (PPRE).

Os PPRE são constituídos por duas repetições diretas com seqüências baseadas em cima do hexanucleotídeo consenso AGGTCA, com um nucleotídeo espaçador. Esses elementos são chamados de DR-1 (*Direct repeat 1*). Além da seqüência do hexanucleotídeo, o número de bases espaçadoras (suas respectivas seqüências) são as chaves para o reconhecimento e especificidade dos receptores nucleares. A interação do complexo PPAR γ :RXR α :ligante estimula o recrutamento de proteínas coativadoras que remodelam a cromatina, onde na seqüência a transcrição é ativada. A figura 1.3 ilustra tal esquema.

Figura 1.3: Mecanismo geral de ação do PPAR. Esquema da organização estrutural necessária para a regulação da transcrição gênica por PPAR. Quando ocorre ligação com um ligante (endógeno ou xenobiótico), PPAR γ forma heterodímero com o receptor RXR α e ocorre a ligação ao elemento responsivo (PPRE). Em seguida são recrutados coativadores que modificam a estrutura da cromatina, em processo induzido, por exemplo, através da acetilação de histonas, iniciando o processo da transcrição do gene alvo.

Geralmente, o mau funcionamento de uma das três isoformas do PPAR leva ao desenvolvimento de distúrbios metabólicos graves, como por exemplo, resistência a insulina (diabetes do tipo II), hipertensão, dislipidemia, lipodistrofia, arteroesclerose, inflamação e diversos tipos de câncer [23, 27].

Especificamente, o papel dos PPAR γ na regulação da diferenciação e proliferação celular tem levado um grande número de pesquisadores a explorar o uso dos agonistas desse receptor como agentes quimioterapêuticos [28-30]. O PPAR γ é altamente expresso em lipocarcinomas humanos [31] e em vários outros tumores incluindo câncer de mama [32, 33], pulmão [34, 35], cólon [36, 37], próstata [38], bexiga [39] e estômago [40]. A diabetes do tipo II (também conhecida como *Non-insulin dependent diabetes mellitus*, NIDDM) é caracterizada por defeitos na captura e utilização de glicose externa, na produção de glicose hepática e disfunção nas células β -

pancreáticas. Alguns ligantes farmacêuticos do PPAR γ , incluindo a classe de drogas *thiazolidinedione* (TZD) [41, 42] são potentes sensibilizadores de insulina, agindo sobre a distribuição e utilização de glicose em todo o corpo. Dados atuais têm mostrado que vários TZDs aumentam a ação da insulina em NIDDM, incluído estimulação na captura de glicose em músculos e tecidos adiposos [43, 44].

O receptor PPAR γ também é expresso em todo o sistema imune em humanos, roedores e porcos [45-48] durante a diferenciação de monócito para macrófago *in vitro* [49] entre outras várias funções no sistema imune, como regulação da produção de citocinas [48, 50].

Alguns exemplos de genes, cuja expressão é regulada por PPAR γ , são mostrados na tabela abaixo (tabela 1.1), adaptada de [51].

Tabela 1.1: Alguns dos genes cuja expressão é regulada por PPAR γ

Gene	Função
aP2	Ligação intracelular de ácidos graxos
Acyl-CoA sintetase	Lipogênese e/ou catabolismo
PEPCK	Síntese de glicerol (para triglicerídeos)
LPL	Hidrólise de partículas que contém triglicerídeos
CD36	Transportador de ácidos graxos na superfície da célula
FATP-1	Transportador de ácidos graxos na superfície da célula
UCP1	Respiração mitocondrial
UCP3	Respiração mitocondrial
Carnitina palmitoil transferase	Translocação de ácidos graxos para mitocôndria
CPT-1	Sinalização de insulina para o transporte de glicose
IRS-2	Sinalização de insulina
PDK4	Inibição da oxidação de glicose
Acrp30	Proteína secretada especificamente em células de gordura
TNF- α (fator- α de necrose)	Citocina pró-inflamatória
Leptina	Hormônio que regula o metabolismo de gordura
11 β -HSD-1	Controle intracelular dos níveis de cortisol

Dada a importância deste receptor na regulação do metabolismo celular, acredita-se que a elucidação do mecanismo de ação do PPAR γ e seus ligantes podem levar a uma nova direção terapêutica para o tratamento de diabetes tipo II, doenças envolvidas na disfunção do sistema imune e vários tipos de câncer.

Canabinóides e o ácido ajulêmico

Durante milênios, diferentes preparações das plantas do gênero *Cannabis* (*sativa*, *indica* e *ruderalis*) e seus derivados (maconha, haxixe e óleo de haxixe) têm sido descritas por civilizações distintas, tanto para fins terapêuticos como recreativos [52, 53]. A caracterização química destas plantas indicou uma constituição ricamente variada, contendo açúcares, esteróides, flavonóides, compostos nitrogenados, aminoácidos, entre outros inúmeros compostos. Mas a classe de moléculas mais específica e característica é a dos canabinóides, sendo o tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC, figura 1.4) descrito como membro mais ativo [54]. Além deste, descoberto em 1964, foram identificados 70 outros análogos ou produtos de transformação de canabinóides em *Cannabis sativa* [55].

Ao longo das últimas décadas, um grande esforço, partindo tanto da área acadêmica, como de indústrias, tem sido direcionado ao entendimento do mecanismo de ação resultante do uso da planta e seus derivados, principalmente da maconha (produzida a partir da *Cannabis sativa*). Tal droga, quando administrada causa alteração de humor, devido ao seu efeito psicotrópico, além das sensações de analgesia e relaxamento. Hoje, sabe-se que esses efeitos são induzidos principalmente pelo Δ^9 -THC. Contudo, este se encontra disponível no mercado de fármacos em alguns países e é prescrito sob o nome genérico de Dronabinol (Marinol ® Solvay Pharmaceuticals), indicado no controle de vômitos (perda de peso associada à anorexia) e controle de apetite em paciente portadores do vírus da AIDS. Mas seu uso ainda é muito limitado devido ao resultante psicoativo indesejado (alucinações, alterações no humor).

A via pela qual o Δ^9 -THC e outros canabinóides induzem respostas no organismo envolve a interação destes com duas proteínas-G transmembranas, chamadas CB1 e CB2 (receptores de canabinóides 1 e 2), identificados há aproximadamente 10 anos (revisados em [56, 57]). CB1 é expresso principalmente no cérebro, mas também

encontrado no pulmão, fígado e rins, enquanto CB2 é majoritariamente encontrado em células-T do sistema imune. CB1 e CB2 compartilham 45 % de identidade sequencial entre si. Esses receptores são ativados não só por canabinóides introduzidos no organismo na forma de fármacos ou drogas (naturais ou sintéticos), mas também por canabinóides endógenos, como por exemplo, anandamida e 2-arachdonylglicerol (2-AG). Sabe-se também que existe estéreo-seletividade na ligação dos canabinóides em cada receptor.

Uma vez no organismo, Δ^9 -THC é rapidamente metabolizado para um grande variedade de derivados oxigenados [58-60]. As oxidações podem ocorrer em praticamente qualquer lugar na molécula, resultando em metabólitos com as mais diversas funções. Entretanto, a via mais importante na maioria das espécies envolve oxidação do grupo metil alílico, como ilustrado na figura 1.4, resultando na formação do ácido THC-11-óico [61].

Figura 1.4: A principal via de metabolização do Δ^9 -THC. O grupamento metil alílico é oxidado, resultando na formação de um álcool alílico, que por sua vez, quando oxidado, gera o ácido THC-11-óico.

Um grande número de metabólitos ácidos é gerado a partir da degradação do Δ^9 -THC, os quais se fazem presentes nos mais diversos tecidos, como observado em humanos [62, 63]. Cada um possui atividades biológicas distintas, que acompanham o curso do metabolismo. Essa característica é explorada de maneiras diversas como, por exemplo, na detecção do uso de maconha por indivíduos através da urina.

Também, essa variedade de compostos oriundos das vias metabólicas é tema de estudos voltados para o desenvolvimento de moléculas sintéticas com efeitos benéficos e específicos e principalmente ausentes de efeitos psicotrópicos. Desde o início da década de 70 é sabido que alterações na cadeia pentil do Δ^9 -THC produzem moléculas com potência alterada [64]. Particularmente com o aumento de seu comprimento para sete carbonos e a introdução de ramificações próximas ao anel aromático, são gerados compostos com potência de 50 a 100 vezes maior que a observada para Δ^9 -THC.

O ácido ajulêmico (AJA, também conhecido como CT-3 ou IP-751 ou ácido 1',1'-dimetilheptil- Δ^8 -THC-11-óico), mostrado na figura 1.5, é um exemplo dessa aproximação. AJA foi desenhado utilizando-se como molde o metabólito ácido THC-11-óico, devido ao fato deste não induzir mudanças comportamentais em humanos e modelos animais, e apresentar, mesmo que com baixa potência, atividade analgésica e antiinflamatória [65].

Figura 1.5: Estrutura e propriedades físicas do ácido ajulêmico (AJA). $C_{25}H_{36}O_4$ (PM 400,4) é solúvel na maioria dos solventes orgânicos, exceto hexano, e também em solução aquosa em condições de pH > 8,0. Também é conhecido como CT-3 ou IP-751 ou ácido 1',1'-dimetilheptil- Δ^8 -THC-11-óico.

O AJA é desenvolvido através da adição de dois grupamentos metil e mais dois carbonos na extensão da cadeia alifática do ácido THC-11-óico. Este composto apresenta maior potência analgésica e antiinflamatória, com efeitos mais prolongados, em níveis comparáveis àqueles observados para morfina [65-67]. Ainda, em contraste com os fármacos antiinflamatórios não-esteróides (*Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs* - NSAIDs), o AJA não é ulcerogênico em doses terapêuticas, não causa reações

de intolerância no organismo e não causa mutagênese [67, 68]. Principalmente, este composto não induz efeitos psicotrópicos em modelos animais [65, 69].

Baseado nesses dados AJA foi recentemente aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*, EUA) para uso em fase II de testes clínicos, em andamento sob responsabilidade da Indevus Pharmaceutical, Inc. (EUA - <http://www.indevus.com>). A síntese de AJA, e o próprio composto, estão protegidos por patente.

Apesar de todos os resultados citados acima, ainda não foi determinada com precisão a via de ação do ácido ajulêmico dentro do organismo. Contudo, possíveis receptores candidatos têm sido apontados, ao longo de aproximadamente 12 anos de busca.

O AJA, assim como a maioria dos outros ácidos canabinóides produzidos através do metabolismo do Δ^9 -THC, não apresentam atividade psicoativa, e se ligam fracamente (ou muitas vezes não se ligam) aos receptores de CB1 e CB2 [70-72]. Em ensaios de inibição da adenilato ciclase, mediados supostamente por CB1 e CB2, AJA se mostra fracamente potente, quando comparado com o análogo dimetil heptil do Δ^9 -THC (DMH-THC). Além disto, a administração do antagonista SR141716A de CB1 não altera os efeitos biológicos de AJA [73]. De acordo com essas e outras evidências, supõe-se que deva existir outros receptores mediados pelo ácido ajulêmico, quando este é administrado em doses terapêuticas.

Uma alternativa surgiu analisando-se as similaridades funcionais entre a atividade antiinflamatória de AJA e o ligantes já conhecidos da família de receptores PPAR, mais especificamente do membro PPAR γ . É atribuído a este receptor uma participação direta na resposta imune do organismo, através da regulação da expressão do receptor CD36, onde este por sua vez, regula a produção de citocinas (Interleucina-1, IL-1; fator- α de necrose de tumor, TNF- α) nas células do sistema imune. Também, PPARs possuem o maior bolsão de ligação ao ligante entre os receptores nucleares, com um volume aproximado de 1400 Å³ [49].

Descobertas recentes reforçaram tal hipótese. Liu e colaboradores [74] reportaram que AJA se liga de maneira direta e específica a PPAR γ . Através de estudos funcionais mostrou-se que AJA serve como agonista para a atividade transcricional desse receptor, quando administrado em concentrações farmacológicas. Aparentemente

a ativação através do ácido ajulêmico requer a função AF2 (atribuída à hélice-12, presente no domínio de ligação ao ligante), além de estimular o recrutamento de proteínas coativadoras. Em adição, o AJA inibiu a atividade promotora da Interleucina-8, reforçando a idéia de que a atividade antiinflamatória da AJA é mediada por PPAR γ . Ainda, é mostrado que a administração de AJA induz a diferenciação de fibroblastos 3T3-L1 em adipócitos, um processo também mediado pelo mesmo receptor.

Na tentativa de auxiliar na elucidação do mecanismo de ação de AJA, em colaboração com os doutores Sumner Burstein (vide informação complementar abaixo) e Robert Zurier (vide informação complementar abaixo), determinamos a estrutura cristalográfica do domínio de ligação ao ligante (LBD) do receptor PPAR γ em complexo com o ácido ajulêmico, reforçando a suposição de que este receptor seja o mediador (ou um dos) da atividade AJA dentro do organismo. O modelo final dá as bases estruturais do modo de interação, sugere explicações para a seletividade pelo tipo γ e viabiliza a proposição da adição ou substituição de grupos químicos do ligante baseados no caráter do bolsão de ligação, visando a síntese de variantes mais específicos e eficientes. Além disto, discutem-se as mudanças conformacionais observadas na cadeia polipeptídica do receptor, através da comparação com diversas estruturas de receptores da mesma família, determinadas na presença de diferentes ligantes (a partir de estruturas disponíveis na literatura), na tentativa de se explicar as consequências destas na regulação das diversas funções da proteína.

Informações complementares

Dr. Sumner H. Burstein, PhD – Department of Biochemistry and Molecular Pharmacology, University of Massachusetts Medical School, 364 Plantation St., Worcester, MA 01605, USA

Dr. Robert B. Zurier, M.D. - Department of Medicine, University of Massachusetts Medical School, 364 Plantation St., Worcester, MA 01605, USA

Referências do capítulo

1. Friesema, E.C.H., Jansen, J. e Visser, T.J. (2005) *Biochemical Society Transactions* 33(1), 228 – 232
2. Law, S. W., Conneely, O. M., DeMayo, F. J. e O'Malley, B. W. (1992) *Mol. Endocrinol.* 6, 2129 – 2135
3. K. Maruyama, T. Tsukada, N. Ohkura, S. Bandoh, T. Hosono e K. Yamaguchi (1998) *Int. J. Oncol.* 12, 1237 – 1243

3. K. Maruyama, T. Tsukada, N. Ohkura, S. Bandoh, T. Hosono e K. Yamaguchi (1998) *Int. J. Oncol.* **12**, 1237 – 1243
4. Hodgkin, J. (1999) *Cell* **98**, 277 – 80
5. Krust, A., Green, S., Argos, P., Kumar, V., Walter, P., Bornert, J.M. e Chambon, P. (1985) *EMBO J.* **5**, 891 – 897
6. Shao, D. e Lazar, M.A. (1999) *J. Clin. Invest.* **103**, 1617 – 1618
7. Bocquel, M.T., Kumar, V., Stricker, C. Chambon, P. e Gronemeyer, H. (1989) *Nucl. Acids Research* **17**, 2581 – 2595
8. Berry, M., Metzger, D. E e Chanbom, P. (1990) *EMBO J.* **9**, 2811 – 2818
9. Sartorius, C.A., Melville, M.Y., Hovlan, A.R., Tung, L., Takimoto, G.S. e Horwitz, K.B. (1994) *Mol. Endocrinology* **8**, 1347 – 1360
10. Laudet, V. and Gronemeyer, H. (2002) *The Nuclear Receptor Facts Book*, 1.ed. New York, Academic Press, 2002
11. Berman, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I.N. e Bourne, P.E. (2000) *Nucleic Acids Research* **28**, 235 – 242
12. Chambon, P. (1996) *FASEB J.* **10**, 940 – 954
13. Moras, D. e Gronemeyer, H (1998) *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**, 384 – 391
14. Tsai, M.J. e O'Malley, B.W. (1994) *Annu. Rev. Biochem.* **63**, 451 – 486
15. Wurtz, J.M., Bourguet, W., Renaud, J.P., Vivat, V., Chambon, P., Moras, D. e Gronemeyer, H. (1996) *Nature Struct. Biol.* **3**, 87 – 94
16. Uppenberg, J., Svensson, C., Jaki, M., Bertilsson, G., Jendeberg, L. e Berskentam, A. (1998) *J. Biol. Chem.* **272**, 31108 – 31112
17. Renaud, J.P., Rochel, N., Ruff, M., Vivat, V. Chanbom, P., Gronemeyer, H. e Morea, D. (1995) *Nature* **378**, 681 – 689
18. Le Douarin, B. Nielsen, A.L., Garnier, J.M., Ichinose, H., Jeanmougin, F., Losson, R. e Chanbom, P. (1996) *EMBO J.* **15**, 6701 – 6715
19. Herry, D.M., Kalkhoven, E., Hoare, S. e Parker, M.G. (1997) *Nature* **387**, 733 – 736
20. Voegel, J.J., Heine, M.J.S., Tini, M., Vivat, V. e Chanbom, P. (1998) *EMBO J.* **17**, 507 – 519
21. Peters, G.A. e Khan, S.A. (1999) *Mol. Endocrinol.* **13**, 286 – 296
22. Sladek, F.M., Ruse-Jr., M.D., Nepomuceno, L., Huang, S.M. e Stallcup, M.R. (1999) *Mol. Cell Biol.* **19**, 6509 – 6522
23. Semple, R.K., Chatterjee, V.K.K. e O'Rahilly, S.O. (2006) *J. Clin. Invest.* **116**, 581 – 589
24. Nolte, R.T., Wisely, G.B., Westin, S., Cobb, J.E., Lambert, M.H., Kurokawa, R., Rosenfeld, M.G., Willson, T.M., Glass, C.K. e Milburn, M.V. (1998) *Nature* **395**, 137 – 143
25. Wilson, T.M., Brown, P.J., Sternbach, D.D. e Henke, B.R. (2000) *J. Med. Chem.* **43**, 527-550
26. Debril, M.B., Renaud, J.P., Fajas, L. e Auwerx, J. (2000) *J. Mol. Med.* **79**, 30 – 47
27. Houseknecht, K.L., Cole, B.M. e Steele, P.J. (2002) *Domestic Animal Endocrinol.* **22**, 1 – 23
28. Roberts-Thomson, S.J. (2000) *Immunol. Cell Biol.* **78**, 436 – 441
29. Murphy, G.J. e Holder, J.C. (2000) *Trends Pharmacol. Sci.* **21**, 469 – 474
30. Fujiwara, T. e Horikoshi, H. (2000) *Life Sciences* **67**, 2405 – 2416
31. Tontonoz, P., Nagy, L., Alvarez, J., Thomazy, V. e Evans, R. (1998) *Cell* **93**, 241 – 252

32. Clay, C.E., Namen, A.M., Atsumi, G.-I., Willingham, M.C., High, K.P., Kute, T.E., Trimboli, A.J., Fonteh, A.N., Dawson, P.A. e Chilton, F.H (1999) *Carcinogenesis* **20**, 1905 – 1911
33. Mueller, E., Sarraf, P., Tontonoz, P., Evans, R.M., Martin, K.J., Zhang, M., Fletcher, C., Singer, S. e Spiegelman, B.M. (1998) *Mol. Cell* **1**, 465 – 470
34. Chang, T.H. e Szabo, E. (2000) *Cancer Res.* **60**, 1129 – 1138
35. Tsubouchi, Y., Sano, H., Kawahito, Y., Mukai, S., Yamada, R., Kohno, M., Inoue, K., Hla, T. e Kondo, M. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **270**, 400 – 405
36. Sarraf, P., Mueller, E., Jones, D., King, F.J., DeAngelo, D.J., Partridge, J.B., Holden, S.A., Chen, L.B., Singer, S., Fletcher, C. e Spiegelman, B.M. (1998) *Nature Med.* **4**, 1046 – 1052
37. Sarraf, P., Mueller, E., Smith, W.M., Wright, H.M., Kum, J.B., Aaltonen, L.A., De la Chapelle, A., Spiegelman, B.M. e Eng, C. (1999) *Mol. Cell* **3**, 799 – 804
38. Kubota, T., Koshizuka, K., Williamson, E.A., Asou, H., Said, J.W., Holden, S., Miyoshi, I. e Koeffler, H.P. (1998) *Cancer Res.* **58**, 3344 – 3352
39. Guan, Y.F., Zhang, Y.H., Breyer, R.M., Davis, L. e Breyer, M.D. (1999), *Neoplasia* **1**, 330 – 339
40. Takahashi, N.G., Okumura, T., Motomura, W., Fujimoto, Y., Kawabata, I. e Kohgo, Y. (1999) *FEBS Lett.* **455**, 135 – 139
41. Kletzein, R.F., Clarke, S.D. e Ulrich, R.G. (1992) *Mol. Pharmacol.* **42**, 393 – 398
42. Wilson, T.M., Cobb, J.E., Cowan, D.J., Wiethe, R.W., Correa, I.D., Prakash, S.R., Beck, K.D., Moore, L.B., Kliewer, S.A. e Lehmann, J.M. (1996) *J. Med. Chem.* **39**, 665 – 668
43. Debril, M.B., Renaud, J.P., Fajas, L. e Auwerx, J. (2001) *J. Mol. Med.* **79**, 30 – 47
44. Willson, T.M., Brown, P.J., Sternbach, D.D. e Henke, B.R. (2000) *J. Med. Chem.* **43**, 527 – 550
45. Greene, M.E., Blumberg, B., McBride, O.W., Yi, H.F., Kronquist, K., Kwan, K., Hseih, L., Greene, G. e Nimer, S.D (1995) *Gene Expression* **4**, 281 – 299
46. Leininger, M.T., Portocarrero, C.P. e Houseknecht, K.L. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **263**, 749 – 753
47. Schoonjans, K., Staels, B. e Auwerx, J. (1996) *Biochem. Biophys. Acta* **1302**, 93 – 109
48. Houseknecht, K.L., Bidwell, C.A., Portocarrero, C.P. e Spurlock, M.E. (1998) *Gene* **225**, 89 – 96
49. Chinetti, G., Fruchart, J.-C. e Staels, B. (2000) *Inflam. Res.* **49**, 497 – 505
50. Gelman, L., Fruchart, J.-C., e Auwerx, J. (1999) *Cell Mol. Life Sci.* **55**, 932 – 943
51. Berger, J. e Moller, D.E. (2002) *Annual Review of Medicine* **53**, 409 – 435
52. Russo, E.B. (2002) *Journal of Cannabis Therapeutics* **2 (3– 4)**, 5 – 34
53. ElSohly, M.A. (2002). Chemical constituents of Cannabis. In: Grotenhermen, F., Russo, E. (Eds.), *Cannabis and Cannabinoids. Pharmacology, Toxicology, and Therapeutic Potential*. The Haworth Press, Inc., Binghamton, NY, 27– 36
54. Mechoulam, R. e Gaoni, Y., (1967) *Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe* **25**, 175 – 213
55. Razdan, R.K. (1987) Structure–activity relationships of the cannabinoids. In: Rapaka, R.S., Makriyannis, A. (Eds.), *National Institute on Drug Abuse Research Monograph, A RAUS Review Report*, vol. 79. US Department of Health and Human Services, Rockville, MD, 3 – 14
56. Pertwee, R.G. e Ross, R.A. (2002) *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* **66**, 101 – 121
57. Di Marzo, V., De Petrocellis, L., Fezza, F., Ligresti, A. e Bisogno, T. (2002) *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* **66**, 377 – 391

58. Agurell, S., Halldin, M., Lindgren, J.-E., Ohlsson, A., Widman, M., Gillespie, H. e Hollister, L. (1986) *Pharmacol. Rev.* **38**, 21 – 40
59. Burstein, S. (1985) Biotransformations of the cannabinoids. In: *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Psychoactive Drugs*, pp. 396–414, Barnett, G. and Chiang, N. (eds.) Biomedical Publications, Foster City, California
60. Harvey, D. e Paton, W. D. M. (1984) *Rev. Biochem. Toxicol.* **6**, 221 – 264
61. Burstein, S., Rosenfeld, J. e Wittstruck, T. (1972) *Science* **176**, 422 – 423
62. Wall, M. e Perez-Reyes, M. (1981) *J. Clin. Pharmacol.* **21**, 178 – 189
63. Widman, M., Halldin, M. M. e Agurell, S. (1985) Metabolism of THC in man. In: *Pharmacokinetics and pharmacodynamics of Psychoactive Drugs*, pp. 415–426, Barnett, G. and Chiang, N. C. (eds.) Biomedical Publishers, Foster City, California
64. Loev, B., Bender, P.E., Dowalo, F., Macko, E. e Fowler, P.J. (1973) *Journal of Medicinal Chemistry* **16**, 1200 – 1206
65. Burstein, S.H., Audette, C.A., Breuer, A., Devane, W.A., Colodner, S., Doyle, S.A. e Mechoulam, R. (1992) *J. Med. Chem.* **35**, 3135 – 3141
66. Burstein, SH, Friderichs, E, Kogel, B, Schneider, J. e Selve, N (1998) *Life Sci.* **63**, 161 – 168
67. Dajani, E.Z., Larsen, K.R., Taylor, J., Dajani, N.E., Shahwan, T.G., Neeleman, S.D., Taylor, M.S., Dayton, M.T. e Mir, G.N. (1999) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **291**, 31 – 38
68. Burstein, S.H. (2000) *Current Pharmaceutical Design* **6**, 1339 – 1345
69. Zurier, R.B., Rossetti, R.G., Lane, J.H., Goldberg, J.M., Hunter, S.A. e Burstein, S.H. (1998) *Arthritis Rheum.* **41**, 163 – 170
70. Compton, D.R., Rice, K.C., De Costa, B.R., Razdan, R.K., Melvin, L.S., Johnson, M.R. e Martin, B.R. (1993) *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **265**, 218 – 226
71. Rhee, M.H., Vogel, Z., Barg, J., Bayewitch, M., Levy, R., Hanus, L., Breuer, A. e Mechoulam, R. (1997) *Journal of Medicinal Chemistry* **40**, 3228 – 3233
72. Yamamoto, I., Kimura, T., Kamei, A., Yoshida, H., Watanabe, K., Ho, I.K. e Yoshimura, H. (1998) *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **21**, 408 – 410
73. Recht, L.D., Salmonsén, R., Rosetti, R., Jang, T., Pipia, G., Kubiowski, T., Karim, P., Ross, A.H., Zurier, R., Litofsky, N.S. e Burstein, S. (2001) *Biochemical Pharmacology* **62**, 755 – 763
74. Liu, J., Li, H., Burstein, S.H., Zurier, R.B. e Chen, J.D. (2003) *Molecular Pharmacology* **63**, 983 – 992

CAPÍTULO 2

DA CLONAGEM DO GENE À DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DA PROTEÍNA

Neste capítulo são descritos os passos envolvidos desde a clonagem da região LBD do gene humano da proteína PPAR γ , até a determinação da estrutura cristalográfica do complexo LBD:AJA por co-cristalização. Em resumo, foram determinadas duas estruturas para tal complexo, a partir de cristais crescidos em diferentes temperaturas. Estes, apesar de aparecerem em condições semelhantes e pertencerem a grupos espaciais diferentes, não apresentaram grandes diferenças entre si, sendo a qualidade do conjunto de dados o fator determinante para a escolha da melhor estrutura. Além da análise do modo de interação de AJA dentro do bolsão de ligação ao ligante, foi observado a presença de moléculas de AJA em regiões não previstas, mas de importância funcional na ação do receptor nuclear. São descritos os detalhes destas estruturas e composição do modelo final, que será utilizado em capítulos posteriores na tentativa de se responder perguntas inerentes ao mecanismo de ação do ligante ácido ajulêmico.

As seqüências genômica e protéica do receptor nuclear PPAR γ (isoforma γ 1) de origem humana [1] encontram-se depositadas no banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) sob os códigos *L40904* e *NP_619726*, respectivamente.

O gene foi inicialmente amplificado pela técnica de PCR (*Polimerase Chain Reaction*), a partir de uma biblioteca de cDNA de cérebro fetal, disponível em nosso laboratório. Tal proteína é descrita como sendo expressa constitutivamente em células cerebrais normais e cancerosas [2], estando envolvida em apoptose neuronal [3] e sendo superexpressa na presença do Mal de Alzheimer [4].

Inicialmente o gene amplificado foi subclonado em vetor pGEM-T (Novagen) após adenilação de suas extremidades não-coesivas. Posteriormente, a região que

codifica para os aminoácidos Leu²⁰⁴ a Tyr⁴⁷⁷ (região LBD, contendo o motivo AF-2, aproximadamente 31 KDa) foi subclonada no vetor de expressão em bactérias pET28a(+) (Novagen), utilizando-se os sítios de restrição *NdeI* e *XhoI*. O gene recombinante foi então transformado em bactéria *Escherichia coli* cepas DH5α e BL21(DE3) para propagação do clone e expressão da proteína, respectivamente.

A expressão em larga escala da porção LBD em células BL21(DE3) quimicamente competentes foi induzida em uma D.O.₆₀₀ = 1, com adição de 1 mM IPTG, a 23 °C por 3 horas. As células foram então coletadas por centrifugação (4000 rpm em rotor SLA-3000, por 15 minutos a 4 °C) e o sedimento então ressuspenso na solução 50 mM TRIS pH 8,0, 100 mM NaCl, 1 mM PMSF.

A lise celular foi feita com adição de lisozima seguida de sonicação. A fração solúvel foi separada por centrifugação a 17000 rpm, por 50 minutos (4 °C) e filtrada. A proteína em fusão com uma cauda de polihistidina proveniente do vetor pET28a(+) foi purificada por cromatografia de afinidade por íons de cobalto imobilizados (TALON – BD Biosciences). Ciclos exaustivos de lavagem da resina (tampão de lavagem contendo 25 mM TRIS pH 8,0, 50 mM NaCl) com um gradiente discreto de concentração de imidazol, possibilitaram a recuperação da proteína em um grau de pureza satisfatório para posteriores experimentos de cristalização (figura 2.1), bem como experimentos de caracterização bioquímica (descritos ao longo da tese).

A cauda de histidina foi removida pela serino-protease trombina, de fonte bovina (Sigma-Aldrich), adicionada na razão de 10 unidades por miligrama de proteína pura, por 12 horas, a 18 °C. A perda desse marcador causa uma diminuição de aproximadamente 1.8 KDa (17 aminoácidos) no produto final.

Figura 2.1: Purificação da região LDB. Gel de poliacrilamida 15% indicando a expressão em larga escala e purificação do domínio LBD do receptor PPAR γ de origem humana. Poço 1 (da esquerda para a direita): marcador de peso molecular; Poço 2: produto não-ligado à matriz (*flow through*); Poço 3: tampão de lavagem + 0 mM imidazol, 30 $\times$ volume de resina; Poço 4: tampão de lavagem + 5 mM imidazol (v/v), 10 $\times$ volume de resina; Poço 5: tampão de lavagem + 10 mM imidazol (v/v), 10 $\times$ volume de resina; Poço 6: tampão de lavagem + 40 mM imidazol (v/v), 10 $\times$ volume de resina; Poço 7: tampão de lavagem + 190 mM imidazol (v/v), 10 $\times$ volume de resina; Poço 8: proteína tratada com trombina.

Logo após a clivagem da cauda de histidina, a amostra foi concentrada para aproximadamente 10 mg/ml e usada em experimentos de cristalização utilizando-se o método de difusão de vapor com gotas suspensas [5].

Foram realizadas triagens utilizando-se o *kit* de cristalização de domínios LBD de receptores nucleares (NR-LBD, Molecular Dimensions), contendo 48 soluções diversas, que exploram condições idênticas, similares e variantes àquelas em que tais domínios já foram cristalizados para diferentes receptores nucleares. Outros *kits* também foram testados, como os de matriz esparsa *Crystal Screen I* e *II* (Hampton Research), além de tentativas de reprodução de resultados disponíveis na literatura [6-15]. Todos os testes foram feitos a temperaturas de 4 °C e 18 °C.

A análise dos resultados, após 24 horas, indicou o aparecimento de cristais em duas condições distintas (a 18 °C): a primeira contendo 1.4 M citrato de sódio e 0.1 M HEPES pH 7.5, presente no *kit* NR-LBD e a segunda contendo 1.6 M sulfato de amônio e 0.1 M HEPES pH 7.6, encontrada no *kit Crystal Screen I*. Fotos dos cristais se

encontram na figura 2.2. Estes se mostraram em tamanho adequado para experimentos de difração de raios X.

Figura 2.2: Cristais da região LBD da proteína humana PPAR γ na forma *apo*. Cristais obtidos nas seguintes condições: (a) 1,4 M citrato de sódio, 0,1 M HEPES pH 7,5; (b) 1,6 M sulfato de amônio, 0,1 M HEPES pH 7,6. Proteína concentrada aproximadamente a 10 mg/ml.

Cristais de ambas as condições foram submetidos a difração de raios X, utilizando uma fonte caseira, disponível em nosso laboratório, modelo ultraX 18 (RIGAKU/MSU) com detector do tipo placa de imagem, modelo Mar345dtb (MAR Research).

Testes iniciais de caracterização mostraram que os cristais das duas condições pertenciam ao mesmo grupo espacial e possuíam os mesmos parâmetros de rede, apesar do fato de a condição que contém sulfato de amônio como agente precipitante ser inédita na literatura. Entretanto, a qualidade da difração dos cristais crescidos em citrato de sódio foi bem menor, com limite máximo de 3,5 Å de resolução, enquanto que os cristais da outra condição difrataram até 2,6 Å.

Vários cristais foram testados, sempre em temperatura criogênica (100 K, crioprotetidos com adição de etilenoglicol 15% (v/v) ao líquido-mãe), e alguns conjuntos de dados foram coletados, utilizando o anodo rotatório. Mas o conjunto de mais alta resolução, utilizado posteriormente para resolução estrutural, foi coletado na linha CPR, no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS/Campinas [16]).

Para integração das imagens foi utilizado o programa MOSFLM [17]. O escalonamento e a redução dos dados foram feitos pelo programa SCALA [18], que inclui o programa TRUNCATE [19], ambos partes do pacote de programas

cristalográficos CCP4 [20]. Parâmetros e estatísticas desse conjunto são mostrados na tabela a seguir (tabela 2.1).

Tabela 2.1: Parâmetros e estatísticas da coleta e processamento dos dados do cristal PPARLBD na forma *apo*.

Valores em parênteses são referentes à camada mais externa de resolução	
Grupo espacial	C2
Parâmetros da rede	a= 91.7 Å, b= 61.1 Å, c= 116.9 Å, β = 101.5 °
Limites de resolução (Å)	40.0 - 2.20 (2.32 - 2.20)
Número de imagens	253
$\Delta\phi$ (°)	1
Mosaicidade (°)	0,4
Reflexões únicas	30326 (4345)
Multiplicidade	3,5 (3,5)
R_{sym} (%)	5,0 (49,6)
$\langle I \rangle / \sigma(I)$	13,5 (2,3)
Completeza (%)	93,9 (93,0)

O número de moléculas presentes na unidade assimétrica foi estimado utilizando-se o programa Matthews_coeff (parte do pacote CCP4) que faz uso da metodologia proposta por Matthews [21]. Considerando-se a massa molecular do monômero da região LBD (resíduos Leu²⁰⁴ a Tyr⁴⁷⁷) como sendo aproximadamente 31 KDa, estimou-se duas moléculas deste constituindo a unidade assimétrica do cristal, com volume de Matthews equivalente a 2,6 Å³/Da e conteúdo de solvente no cristal de 52,5 %.

Com esse resultado, o fator de temperatura (B) do cristal foi encontrado por regressão linear no gráfico Wilson, utilizando-se apenas dados de resolução maiores que 4,0 Å [22], obtendo-se B = 54,9 Å².

O primeiro conjunto de fases para tais dados foi obtido pelo método de Substituição Molecular [23], implementado no software MOLREP [24]. Outra estrutura da mesma porção, depositada no banco de dados PDB [25] também de origem humana (PDBID 1PRG [26]) foi usada como modelo. Após escolha da solução correta, o empacotamento cristalino das moléculas foi manualmente inspecionado e o modelo foi

subseqüentemente sujeito ao refinamento de corpo rígido e anelamento simulado, pelo pacote de programas CNS [27].

A análise do modelo parcial, usando o programa gráfico Coot [28], indicou que de fato este era idêntico à estrutura cristalográfica utilizada com o modelo para a substituição molecular (PDBID 1PRG), em todos os aspectos (parâmetros e empacotamento cristalino e conformação estrutural), mesmo tendo sido cristalizado em condições até então não descritas na literatura. Mas pelo fato de a estrutura modelo depositada no banco de dados ter sido determinada na mesma resolução, o refinamento foi descontinuado.

Esses cristais foram, no entanto, usados em ensaios exaustivos de *soaking* com o ligante AJA, na tentativa de obtenção do complexo. Mas tais tentativas também foram descontinuadas, após observar-se que os cristais sempre quebravam, mesmo quando submetidos as mais diferentes quantidades de ligante. Foram então iniciados experimentos de co-cristalização.

A formação do complexo em solução foi feita com a adição do ligante à proteína pura (após a clivagem da cauda de histidina), em uma razão molar de 10:1 (ligante:proteína), incubando-se por 60 minutos em gelo. Devido ao caráter hidrofóbico do ligante ácido ajulêmico, este foi solubilizado em etanol puro, a uma concentração final de 100 mM.

Novas tentativas de cristalização foram então realizadas seguindo a mesma metodologia aplicada para a proteína na forma *apo*, mas agora se utilizando apenas o kit de matriz esparsa *The Classics* (Nextal Biotechnologies), com temperatura controlada a 18 °C. Após 24 horas, observou-se o aparecimento de cristais em uma única condição, contendo apenas 4 M formato de sódio (figura 2.3).

Figura 2.3: Cristal da região LBD em complexo com o ligante AJA. Cristal crescido a 18 °C. Excesso molar 10:1, obtido em condição contendo 4 M formato de sódio, com proteína concentrada a 13 mg/ml. Dimensões aproximadas: 0,7 × 0,2 × 0,2 mm.

Os cristais foram então submetidos à difração em nossa fonte caseira de raios X (detalhes na página 22). Dezenas foram testados e todos se mostraram de baixa qualidade, com poder de difração entre 3,5 e 4 Å de resolução e padrões altamente anisotrópicos. Ainda assim, um conjunto de dados foi coletado e processado, com parâmetros e estatísticas mostrados na tabela 2.2. Foram usados os programas MOSFLM e SCALA/TRUNCATE para processamento dos dados.

Tabela 2.2: Parâmetros e estatísticas da coleta e processamento dos dados de difração de raios X para a proteína na em complexo com AJA (cristais crescidos a 18 °C).

Valores em parênteses são referentes à camada mais externa de resolução	
Grupo espacial	P4 ₃ 2 ₁ 2
Parâmetros da rede	a= 99.2 Å, b= 99.2 Å, c= 182.1 Å
Limites de resolução (Å)	40,0 - 3,65 (3,73 – 3,65)
Número de imagens	159
Δφ (°)	1
Mosaicidade (°)	0,7
Reflexões únicas	10863 (681)
Multiplicidade	9,5 (7,3)
R _{sym} (%)	13,0 (61,5)
⟨ I/σ(I) ⟩	16,7 (2,2)
Completeza (%)	99,5 (93,4)

Apesar de a predição do coeficiente de Matthews sugerir a presença de três monômeros da região LBD na unidade assimétrica para o novo cristal ($V_M = 2,4 \text{ \AA}^3/\text{Da}$, 48,9 % de solvente, com probabilidade de 84 %), foram encontradas apenas duas moléculas por substituição molecular ($V_M = 3,6 \text{ \AA}^3/\text{Da}$, 66,0 % de solvente, com probabilidade de 13 %). O fator de temperatura médio do cristal, estimado pelo gráfico de Wilson foi de $86 \text{ \AA}^2$. O processo de substituição foi feito com o programa PHASER [29], utilizando-se como modelo a estrutura parcialmente refinada, previamente determinada para a forma *apo* (descrita anteriormente).

Após aplicação da solução da substituição molecular, foram feitos refinamento de corpo rígido e anelamento simulado, com o pacote de programas CNS. Ciclos de refinamento no espaço real (modificações manuais do modelo, através da inspeção dos mapas de densidade eletrônica usando o programa gráfico Coot), alternados com cálculos intermediários no espaço recíproco para refinamento de posições atômicas, restrições geométricas e de contato, refinamento de fator de temperatura individual para todos os átomos, além de minimização de funções de energia, foram feitos utilizando-se o programa Refmac [30]. O monitoramento do acordo do modelo com os dados experimentais foi conduzido através da análise da variação do fator R, juntamente com o fator R_{free} [Validação Cruzada, 31].

Mesmo com a baixa qualidade dos dados, durante o refinamento da estrutura contra os mapas de densidade eletrônica, foi observada uma forte densidade eletrônica, acima de 3σ , no mapa $F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ (Fourier diferença), na região do sítio ligação ao ligante de cada monômero, e como consequência da forma e da aparente geometria dessa densidade eletrônica, esta foi interpretada como sendo uma molécula do ácido ajulêmico, como mostrado na figura 2.4.

Figura 2.4: Moléculas de AJA no bolsão de ligação ao ligante. Forte densidade eletrônica observada nos mapas Fourier diferença ($F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$, α_{calc}), contornado a 3σ (verde) e $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$, α_{calc} , contornado a 1σ (azul) dentro do sítio de ligação ao ligante na cadeia protéica A (a) e em B (b), logo após a aplicação da solução da substituição molecular. O ligante, em uma conformação já refinada, foi sobreposto aos mapas, para facilitar a compreensão destes.

A análise dos mapas de densidade eletrônica ainda no início do processo de refinamento indicou, de maneira curiosa, a presença de dois outros fortes picos ($>3\sigma$ no mapa Fourier diferença), que novamente, de acordo com suas geometrias foram interpretadas como mais duas moléculas de AJA. Estas moléculas foram encontradas na superfície das cadeias protéicas, muito próximas uma da outra e interagindo de maneira parecida com moléculas da proteína relacionadas por operações de simetria não-cristalográfica (figura 2.5).

Figura 2.5: Moléculas de AJA na superfície do monômero. Densidades eletrônicas observadas nos mapas Fourier diferença ($F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$, α_{calc}), contornado a 3σ (verde) e $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$, α_{calc} , contornado a 1σ (azul) na superfície da molécula em um sítio não-específico, logo após a aplicação da solução da substituição molecular. O ligante, em uma conformação já refinada, foi sobreposto aos mapas, para facilitar a compreensão destes.

Desta maneira, o modelo parcial foi constituído por duas moléculas da região LBD, mais quatro moléculas de AJA e algumas poucas moléculas de solvente, interpretadas como átomos de oxigênio de águas.

Em paralelo com o refinamento do modelo, foram realizados novos experimentos de cristalização, na tentativa de melhorar o conjunto de dados do complexo. Além de se testar novas condições, variou-se a temperatura de montagem, para 10 °C, sempre mantendo um excesso molar de 10:1 na relação ligante:proteína. Após uma semana da montagem, foram observados cristais em condição idêntica à já obtida a 18 °C (descrita acima), mas com morfologia diferente, como mostrado na figura 2.6.

Figura 2.6: Cristais da região LBD em complexo com o ligante AJA. Cristais crescidos a 10 °C em excesso molar 10:1, obtido em condição contendo 4 M formato de sódio, com proteína concentrada a 10 mg/ml. Dimensões aproximadas dos *clusters*: 0,6 × 0,5 × 0,05 mm.

Um conjunto de dados de difração de raios X foi coletado em nosso ânodo rotatório para os novos cristais. A análise inicial do padrão de difração indicou um cristal também muito mosaico e anisotrópico como o anterior, mas com muito mais alto poder de difração, agora até 2,8 Å. A caracterização e o processamento dos dados foram feitos com o pacote de programas HKL2000 [32]. A indexação dos novos cristais mostrou que estes pertenciam ao grupo espacial P1, apesar de terem crescidos nas mesmas condições dos cristais descritos anteriormente (a menos da temperatura). A tabela 2.3 mostra as estatísticas e parâmetros da coleta e processamento dos novos dados.

Tabela 2.3: Parâmetros e estatísticas da coleta e processamento dos dados de difração de raios X coletados a partir dos cristais do complexo crescidos a 10 °C.

Valores em parênteses são referentes à camada mais externa de resolução	
Grupo espacial	P1
Parâmetros da rede	a = 62.3 Å, b = 78.1 Å, c = 104.2 Å $\alpha = 100.1^\circ$, $\beta = 106.4^\circ$, $\gamma = 90.0^\circ$
Limites de resolução (Å)	30.0 – 2.8 (2.9 – 2.8)
Número de imagens	215
$\Delta\varphi$ (°)	1
Mosaicidade (°)	1,5
Reflexões únicas	42.977 (4149)
Multiplicidade	1,8 (1,6)
R_{sym} (%)	9.0 (30.5)
$\langle I \rangle / \sigma(I)$	8,1 (1,9)
Completeza (%)	99.5 (93.4)

Uma nova estimativa do conteúdo da unidade assimétrica através do cálculo do coeficiente de Matthews indicou a presença de seis moléculas ($V_M = 2,57 \text{ Å}^3/\text{Da}$, 52,2 % de solvente, com probabilidade de 35 %), mas na substituição molecular foram encontradas somente quatro ($V_M = 3,86 \text{ Å}^3/\text{Da}$, 68,2 % de solvente, com probabilidade de 3 %). Novamente se observa um grande conteúdo de solvente, em acordo com o que havia sido encontrado anteriormente, para o cristal tetragonal. O fator de temperatura (B) do cristal encontrado por regressão linear no gráfico de Wilson foi de $61,6 \text{ Å}^2$. O processo de substituição molecular foi realizado com o programa PHASER, utilizando-se como modelo a estrutura parcialmente refinada do complexo descrito acima.

A inspeção visual do mapa inicial, logo após a substituição molecular indicou novamente a presença de densidades eletrônicas de natureza não-protéica, que foram atribuídas ao ácido ajulêmico. Os sítios em que estas se encontram também são os mesmos que os observados para a forma tetragonal: uma molécula de AJA dentro do bolsão de ligação ao ligante e outra na superfície da proteína. Foram identificados oito sítios com esse caráter, dois para cada monômero da unidade assimétrica. Um exemplo pode ser encontrado na figura 2.7.

Figura 2.7: AJA na estrutura determinada a 2,8 Å de resolução. $F_{obs}-F_{calc}$ omit map, contornado a 3σ (verde) dentro do sítio de ligação ao ligante (à direita) e na interface entre dois monômeros de LBD. O ligante, em uma conformação já refinada, foi sobreposto aos mapas, para facilitar a compreensão destes.

Refinamento de corpo rígido e anelamento simulado foram feitos com o auxílio do programa CNS. Alternadamente, cálculos intermediários (no espaço recíproco) para refinamento de posições atômicas, restrições geométricas e de contato, refinamento de fator de temperatura isotrópico individual para todos os átomos, além de minimização de funções de energia e TLS, utilizando-se o programa Refmac, sempre com a restrição de simetria não-cristalográfica ao pares, isto é, impondo a cadeia A igual a cadeia C e cadeia B igual a cadeia D, determinada de maneira empírica.

Foram usadas 40298 reflexões no conjunto de trabalho (para cálculo do R_{factor}) e 2146 no conjunto de teste (5,1 % do conjunto total, para cálculo do R_{free}), compreendendo numa faixa de resolução de 12,0 até 2,8 Å. Os valores finais desses índices de discrepância ficaram em 21,5% (R) e 26,6 % (R_{free}). A introdução de moléculas de água foi feita manualmente, com o auxílio do programa Coot, utilizando-se como critério distâncias mínima e máxima de 2,4 a 3,5 Å e fator de temperatura menor que 50 Å². O refinamento foi dado por encerrado quando não foi mais possível melhorar os índices R e R_{free} . O modelo final é constituído por 4 moléculas da região LBD (totalizando 1060 resíduos de aminoácidos), 8 moléculas de AJA e 229 moléculas de água.

Os valores finais dos desvios médios quadráticos para comprimentos e ângulos de ligações interatômicas do modelo foram 0,011 Å e 1,586 °, respectivamente. O fator de temperatura médio (para todos os átomos das cadeias protéicas) foi de 36,3 Å².

Os valores finais de R e R_{free} estão melhores que a média daqueles observados para estruturas refinadas à mesma resolução e depositadas no banco de dados PDB, segundo análise mostrada na figura 2.8. 863, de um total de 1036 estruturas compartilham um valor médio para R de 22,1 % (desvio padrão de 2,6 %) e 833 do mesmo total compartilham R_{free} de 27,5 % (desvio padrão de 2,9 %). As estruturas que não foram incluídas nos cálculos não possuíam tais valores em seus cabeçalhos.

Figura 2.8: Comparação estatística de R e R_{free}. Distribuição de R e R_{free} para as estruturas depositadas no PDB, que foram resolvidas a 2,8 Å de resolução. No total, 863 estruturas foram usadas para se estimar um valor médio de 22,1 % para R e 833 estruturas para se estimar 27,5 % para média de R_{free}. O círculo azul à esquerda marca o valor de R obtido para a estrutura apresentada nesta tese (21,5 %) e o círculo verde, à direita, marca o valor de R_{free} do modelo cristalográfico. Ambos os valores estão melhores que a média.

A validação da estrutura, ou seja, checagem da regularidade estereoquímica e da consistência química do modelo, foi feita através dos programas PROCHECK [33]. A análise do diagrama de Ramachandram, gerado pelo PROCHECK, mostra que 91,5 % (882 resíduos) dos resíduos se encontram nas regiões mais favoráveis, 7,9 % (76

resíduos) estão em regiões adicionais permitidas, 0,6 % (6 resíduos) em regiões generosamente permitidas e nenhuma ocupação na região totalmente desfavorável, excluindo resíduos de glicina (42 no total), cujo C α não possui quiralidade (figura 2.9).

Figura 2.9: Diagrama de Ramachandran do modelo cristalográfico final. É avaliada a qualidade da molécula, através da distribuição (e combinação) dos ângulos torsionais diédricos (Φ e ψ). O resultado indica que 91,5 % dos resíduos se encontram nas regiões mais favoráveis (em vermelho), 7,9 % estão em regiões adicionalmente permitidas (amarelo claro), 0,6 % em regiões generosamente permitidas (bege) e nenhuma ocupação na região totalmente desfavorável (branco).

Outras análises feitas pelo PROCHECK abordam parâmetros estereoquímicos da cadeia principal e mostram como a estrutura em questão se comporta quando comparada com outras resolvidas na mesma resolução. Vale a pena destacar dois gráficos, mostrados na figura 2.10. O primeiro (a) mostra a porcentagem de resíduos que ocupam a região mais favorável do diagrama de Ramachandran, em função da resolução de seu conjunto de dados. O segundo (b) mostra o valor médio do G_{factor} que é uma medida da normalidade estereoquímica da estrutura como um todo. Representa uma média para os G_{factor} de cada resíduo na estrutura. Nesses gráficos, a região hachurada representa a faixa de resultados dessas estruturas, a linha central é o ajuste mínimo quadrático para a inclinação média em função da resolução, enquanto que a largura da banda corresponde à variação de um desvio padrão sobre a média. Em alguns casos a inclinação é dependente da resolução e em outros não.

Figura 2.10: Algumas das estatísticas geradas pelo programa PROCHECK. As análises indicam que o modelo cristalográfico apresentado nesta tese apresenta qualidade estereoquímica muito superior, quando comparado com outras estruturas determinadas na mesma resolução. Em (a) observa-se que a quantidade obtida de 91,5 % de resíduos na região mais favorável do diagrama de Ramachandram está muito acima da média e do desvio padrão para a resolução de 2,8 Å. O mesmo vale para o fator G de normalidade estereoquímica (b).

Observa-se acima que a estrutura possui um número muito maior de resíduos na região mais favorável do gráfico de Ramachandram, quando comparada com outras estruturas determinadas na mesma resolução. O mesmo vale para a qualidade estereoquímica do modelo. O fator G é significativamente melhor, indicando que foi possível se alcançarem valores aceitáveis de R e R_{free} mantendo uma estereoquímica excelente.

Referências do capítulo

1. Greene, M.E., Blumberg, B., McBride, O.W., Yi, H.F., Kronquist, K., Kwan, K., Hsieh, L., Greene, G. e Nimer, S.D (1995) *Gene Expression* **4**, 281 – 299
2. Nwankwo, J.O. e Robbins, M.E. (2001) *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **64**, 241 – 245
3. Rohn, T.T., Wong, S.M., Cotman, C.W. e Cribbs, D.H. (2001) *Neuroreport* **12(4)**, 839 – 843
4. Kitamura, Y., Shimohama, S., Koike, H., Kakimura, J., Matsuoka, Y., Nomura, Y., Gebicke-Haerter, P.J. e Taniguchi, T. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **254(3)**, 582 – 586
5. Hampel, A., Labananskas, M., Connors, P.G., Kirkegard, L., Raj Bhandary, U.L., Sigler, P.B. e Bock, R.M. (1968) *Science* **162**, 1384 – 1386

6. Nolte, R. T., Wisely, G. B., Westin, S., Cobb, J. E., Lambert, M. H., Kurokawa, R., Rosenfeld, M. G., Willson, T. M., Glass, C. K. e Milburn, M. V. (1998) *Nature* **395**, 137 - 142
7. Uppenberg, J., Svensson, C., Jaki, M., Bertilsson, G., Jendeberg, L. e Berkenstam, A. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 31108 - 31112
8. Oberfield, J. L., Collins, J. L., Holmes, C. P., Goreham, D. M., Cooper, J. P., Cobb, J. E., Lenhard, J. M., Hull-Ryde, E. A., Mohr, C. P., Blanchard, S. G., Parks, D. J., Moore, L. B., Lehmann, J. M., Plunket, K., Miller, A. B., Milburn, M. V., Kliewer, S. A. e Willson, T. M. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 6102 - 6107
9. Xu, H. E., Lambert, M. H., Montana, V. G., Parks, D. J., Blanchard, S. G., Brown, P. J., Sternbach, D. D., Lehmann, J. M., Wisely, G. B., Willson, T. M., Kliewer, S. A. e Milburn, M. V. (1999) *Mol. Cell* **3**, 397 - 402
10. Gampe Jr., R. T., Montana, V. G., Lambert, M. H., Miller, A. B., Bledsoe, R. K., Milburn, M. V., Kliewer, S. A., Willson, T. M. e Xu, H. E. (2000) *Mol. Cell* **5**, 545 - 550
11. Cronet, P., Petersen, J. F. W., Folmer, R., Blomberg, N., Sjoblom, K., Karlsson, U., Lindstedt, E.-L. e Bamberg, K. (2001) *Structure* **9**, 699 - 704
12. Xu, H. E., Lambert, M. H., Montana, V. G., Plunket, K. D., Moore, L. B., Collins, J. L., Oplinger, J. A., Kliewer, S. A., Gampe Jr., R. T., McKee, D. D., Moore, J. T. e Willson, T. M. (2001) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **98**, 13919 - 13925
13. Mogensen, J. P., Wassermann, K., Sauerberg, P., Pettersson, I., Jeppesen, L., Bury, P. S., Brand, C. L., Sturis, J., Woldike, H. F., Fleckner, J., Andersen, A.-S. T., Mortensen, S. B., Svensson, L. A., Rasmussen, H. B., Lehmann, S. V., Polivka, Z., Sindelar, K., Panajotova, V., Ynddal, L. e Wulff, E. M. (2002) *J. Med. Chem.* **45**, 789 - 796
14. Ebdrup, S., Pettersson, I., Rasmussen, H. B., Deussen, H.-J., Frost Jensen, A., Mortensen, S. B., Fleckner, J., Pridal, L., Nygaard, L. e Sauerberg, P. (2003) *J. Med. Chem.* **46**, 1306 - 1313
15. Ostberg, T., Sundbom, M., Sydow-Backman, Svensson, S., Selen, G., Uppenberg, J., Thor, M. M., Gustavsson, A. L. e Jendeberg, L. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 41124 - 41130
16. Polikarpov, I., Perles, L.A., de Oliveira, R.T., Oliva, G., Castellano, E.E., Garratt, R.C. e Craievich, A. (1998) *J. Synch. Rad.* **5**, 72 - 76
17. Leslie, A.G.W., (1992), Joint CCP4 + ESF-EAMCB Newsletter on Protein Crystallography, No. 26
18. Evans, P. R. (1993) /Proceedings of CCP4 Study Weekend, on Data Collection & Processing, January 9-10, Daresbury, UK/, pp. 114-122, Daresbury Laboratory, Daresbury, UK
19. French, G.S. e Wilson, K.S. (1978) *Acta Cryst. A* **34**, 517 - 525
20. Collaborative Computational Project Number 4 (1994) *Acta Cryst.* **D50**, 760 - 763
21. Matthews, B.M. (1968) *J. Mol. Biol.* **33**, 491 - 497
22. Drenth, J. (1999) *Principles of X-ray Crystallography*, 2nd ed. Heidelberg: Springer.
23. Haas, D.J. e Rossmann, M.G. (1970) *Acta Cryst.* **B26**, 998 - 1004
24. Leslie, A. G. W. (1992) *Joint CCP4 _ ESF-EAMCB Newsletter on Protein Crystallography*, No. **26**, Daresbury Laboratory, Daresbury, UK
25. Berman, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I.N. e Bourne, P.E. (2000) *Nucleic Acids Research* **28**, 235 - 242
26. Nolte, R.T., Wisely, G.B., Westin, S., Cobb, J.E., Lambert, M.H., Kurokawa, R., Rosenfeld, M.G., Willson, T.M., Glass, C.K. e Milburn, M.V. (1998) *Nature* **395**, 137 - 143
27. Brunger, A.T., Adams, P.D., Clore, G.M., DeLano, W.L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R.W., Jiang, J. S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N.S., Read, R.J., Rice, L.M., Simonson, T. e Warren, G. (1998) *Acta Crystallogr. D* **54**, 905 - 921

28. Emsley, P. e Cowtan, K. (2004) *Acta Crystallogr. D* **60**, 2126 – 2132
29. Read, R.J. (2001) *Acta Cryst. D* **57**, 1373 – 1382
30. Murshudov, G. N., Vagin, A. A. e Dodson, E. J. (1997) *Acta Crystallogr. D* **53**, 240 – 255
31. Brünger, A., Adams, P., Clore, M., Gros, P., Nilges, M. e Read, R. (1998) *Acta Cryst. D* **54**, 905 – 921
32. Otwinowski, Z. e Minor, W. (1997) *Methods Enzymol.* **276**, 307 – 326
33. Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S. e Thornton, J.M. (1993) *J. Appl. Cryst.* **26**, 283 – 291

CAPÍTULO 3

ANÁLISE ESTRUTURAL E DISCUSSÕES

Neste capítulo é feita uma análise detalhada do modelo cristalográfico da região PPAR γ -LDB complexo com o ácido ajulêmico, determinado a 2,8 Å de resolução. Os contatos que caracterizam a interação entre essas duas moléculas são descritos e comparados com outras estruturas já determinadas e disponíveis no banco de dados PDB. Tal comparação dá as bases estruturais para alguns resultados obtidos em ensaios *in vitro*, disponíveis na literatura, como por exemplo, a seletividade de AJA por PPAR γ . É observado também que a ligação de AJA depende fortemente de mudanças na conformação do ω -loop, quando comparado com outras estruturas da mesma região que estão disponíveis no PDB. É discutida também a presença de AJA na superfície da cadeia protéica, intermediando contatos intermoleculares, em um sítio que parece ser o novo alvo de moléculas inibitórias da interação entre receptores e proteínas co-reguladoras.

Descrição do modelo cristalográfico

Neste trabalho é apresentada a estrutura cristalográfica da região LBD (resíduos Leu²⁰⁴ a Tyr⁴⁷⁷) do receptor nuclear humano PPAR γ , em complexo com o ligante ácido ajulêmico (AJA), ilustrada na figura 3.1. O modelo final, determinado a 2,8 Å de resolução, contém 4 moléculas de LBD e 8 moléculas da AJA na unidade assimétrica, além de 229 moléculas de água. Todos os átomos presentes foram modelados dentro de densidades eletrônicas bem interpretadas, com exceção de algumas poucas cadeias laterais de resíduos presentes na superfície dos monômeros e expostos ao solvente, cujas conformações não puderam ser modeladas. Nestes casos, a ocupação para tais átomos foi igualada a zero. O enovelamento total de cada monômero pouco difere daqueles já determinados para outras estruturas, tanto na forma *apo*, quanto na forma *holo*, como será discutido adiante.

Figura 3.1: Estrutura cristalográfica da região LBD de PPAR γ em complexo como ácido ajulêmico. Representação estereográfica do conteúdo da unidade assimétrica do cristal, mostrando a presença de quatro moléculas de LBD (em *cartoon*), oito moléculas de AJA (mostradas como esferas verdes) e 229 moléculas de solvente interpretadas como água (pequenos pontos vermelhos).

Devido à baixa resolução do conjunto de dados, as cadeias protéicas foram refinadas com imposição de alta correlação por simetria não-cristalográfica (NCS) para todos os átomos, ao longo do processo de refinamento. Tal imposição foi feita aos pares, onde a cadeia C foi dita como sendo equivalente a cadeia A (grupo I) e D equivalente a cadeia B (grupo II). Claramente existem diferenças entre as moléculas destes dois grupos, isto é, A/C são diferentes de B/D. Alguns *loops* puderam ser traçados em A (e por consequência, em C), mas não foram modelados para B e D, devido a ausência de densidade eletrônica interpretável nessas regiões. Por exemplo, parte do ω -*loop*, entre os resíduos Pro²⁶⁹ e Lys²⁷⁵, ficou indeterminada para as moléculas do grupo II, assim como outro *loop*, formado pelos aminoácidos entre Thr²³⁸ e Lys²⁴⁴.

Mas apesar da ausência dessas regiões, as partes que foram modeladas apresentam alto grau de conservação estrutural. O valor do desvio médio quadrático da posição dos C α entre representantes dos dois grupos (mais especificamente entre cadeias A e B, usadas como referência de cada grupo), calculados pelo programa LSQMAN [1], foi de 0,46 Å, com valor máximo 1,97 Å. Esse alinhamento estrutural é mostrado na figura 3.2, juntamente com um gráfico do desvio médio em função do

aproximadas de $60 \text{ \AA} \times 40 \text{ \AA} \times 30 \text{ \AA}$, constituído de 12 hélices- α e uma pequena folha de três fitas- β (refira-se a figura 1.2). Esses motivos de estrutura secundária são formados por aproximadamente 80 % de todos os resíduos que caracterizam a região. O bolsão de ligação ao ligante é bem volumoso ($\sim 1300 \text{ \AA}$), comparável aos encontrados nas outras estruturas que serão descritas adiante. A cavidade é contornada por oito elementos de estrutura secundária (H2', H3, H6, H7, H11, H12, $\beta 2$ e $\beta 3$) e possui um formato com três ramificações, semelhante à letra Y, como descrito em [3].

O modo de interação de AJA e sua consequência na seletividade pelo tipo γ

As moléculas de AJA observadas dentro do bolsão de ligação ao ligante ocupam uma posição um pouco diferenciada dos outros ligantes já reportados para todos os receptores PPAR. Não há nenhuma interação direta com H12, estando o ligante posicionado entre as hélices H3, H4, H7 e H8, com a fita $\beta 3$ e principalmente interagindo com o ω -loop. Essa ausência de contatos com H12 foi observada na estrutura da região LDB de PPAR γ em complexo com ligante da família 2-BABA (PDBID 1WM0, [4]).

A molécula realiza contatos polares (a partir de seu grupo ácido) com os grupamentos amina das ligações peptídicas dos resíduos Lys²⁶⁵ e His²⁶⁶, presentes no ω -loop, além do O γ da Ser³⁴² (fita- β 3), e uma molécula de água, que por sua vez, não coordena com mais nenhum outro átomo. O oxigênio presente no anel intermediário de AJA (O1) e a hidroxila presente no anel aromático não realizam nenhum tipo de contato polar. Em contrapartida, é bastante grande o número de contatos hidrofóbicos observados no restante da molécula, envolvendo, por exemplo, os resíduos Cys²⁸⁵, Phe²⁶⁴ (parte do ω -loop), Met³⁴⁸, Leu³⁵³, Gly²⁸⁴, Ile³⁴¹, entre vários outros, como mostrados na figura 3.3. AJA ocupa aproximadamente 30 % do volume total do bolsão.

número do resíduo, feito como auxílio do programa CDplot [2], parte do programa LSQMAN.

Figura 3.2: Comparação entre as estruturas dos monômeros na unidade assimétrica. (a) Sobreposição estrutural entre a cadeia A (em branco) e a cadeia B (em verde). (b) CDplot mostrando o r.m.s.d dos Cα em função da posição do aminoácido, em uma escala de tons que varia de 0,0 Å (branco) até o desvio máximo observado de 1,97 Å (preto). As regiões destacadas em vermelho em (a) e (b) se referem aos resíduos do *ω-loop*, ausentes nas cadeias B e D, que foram modeladas com sucesso em A e C.

Devido ao alto grau de conservação estrutural entre os monômeros e ao fato de ter sido modelada por completo, a cadeia A foi escolhida como referência para estudos posteriores de análise das interações com o ligante e comparações com outras estruturas cristalográficas.

A região LDB do receptor nuclear humano PPARγ aqui apresentada, possui o enovelamento globular característico observado para a família, com dimensões

Figura 3.3: Interação de AJA com os resíduos presentes no bolsão de ligação ao ligante da região LBD. Interações-chave para a estabilização de AJA no sítio de ligação ao ligante, tanto de caráter polar (destacadas em vermelho) como hidrofóbico (em preto), além da presença de uma molécula de água.

A análise da conservação desses resíduos para os tipos α e δ de origem humana, dá as bases da seletividade de AJA pelo tipo γ . Essa seletividade foi mostrada por Liu e colaboradores [5], através de ensaios de proteólise parcial e transfecção celular na presença de AJA, para os três tipos de receptores, de origem de rato (*Mus musculus*).

Pelo alinhamento sequencial mostrado a seguir, observa-se que os resíduos-chave na interação entre AJA e PPAR γ -LBD humano não são conservados entre os diferentes tipos. Primeiramente, Ser³⁴² está presente em PPAR γ , mas é substituída por alanina nos tipos α e δ . Dessa maneira, é perdida a ponte de hidrogênio observada entre a serina e o grupamento ácido de AJA.

Substituindo Phe²⁶⁴, em PPAR α é encontrada uma alanina e em PPAR δ um triptofano. O anel aromático da Phe²⁶⁴ em PPAR γ realiza um extenso contato hidrofóbico com AJA, que seria perdido no tipo α devido à curta cadeia lateral da alanina. Já em PPAR δ , a mutação pelo triptofano, juntamente com a substituição de uma glicina (na posição 284 em PPAR γ) por uma arginina, são responsáveis pelo

estreitamento do bolsão hidrofóbico na direção do ω -loop, causando um impedimento estérico para a acomodação de AJA. O mesmo vale para a cisteína que substitui a mesma glicina em PPAR α .

Um outro contato importante, realizado não diretamente com AJA, ocorre entre os resíduos His²⁶⁶ (presente no ω -loop) e Phe²⁸⁷ (em H4). Tal contato envolve sobreposição das nuvens π das cadeias laterais desses resíduos. Essa interação parece ser importante no auxílio da estabilização do ω -loop, em uma conformação que mantenha os resíduos que realizam contatos com AJA próximos deste. O caráter do contato entre His²⁶⁶ e Phe²⁸⁷ seria perdido nos tipos α e δ , devido à ausência de orbitais π nos pares de resíduos substituintes.

A sobreposição estrutural das três formas indica que essas mudanças são suficientes para explicar a seletividade de AJA por PPAR γ , corroborando com os resultados de Liu e colaboradores [5]. As seqüências das três formas de origem do organismo *Mus musculus*, também estão alinhadas com as de origem humana, para mostrar, que apesar de os ensaios *in vitro* terem sido feitos com as proteínas de origem de rato, não haveria diferenças dos resultados com as proteínas humanas (figura 3.4).

	264	287	342
PPAR γ humano	...FKHITPLQEQSKEVAIRIFQGCQFR...	...LISEG...	
PPAR γ rato	...FKHITPLQEQSKEVAIRIFQGCQFR...	...LISEG...	
PPAR δ humano	...WKQLVNGLPPYKEISVHVVFYRCQCT...	...LVANG...	
PPAR δ rato	...WKQLVNGLPPYNEISVHVVFYRCQST...	...LVANG...	
PPAR α humano	...AKLVANGIQ-NKEAEVRIFHCQCT...	...LVAYG...	
PPAR α rato	...AKMVANGVE-DKEAEVRFFHCQCM...	...LIAYG...	

Figura 3.4: Alinhamento seqüencial dos diferentes tipos de PPAR de origem humana e de rato. Tendo como referência de numeração o PPAR γ humano, os resíduos destacados em cinza são aqueles que fazem contatos diretos com AJA, nas proximidades do ω -loop. A substituição destas por outros mais volumosos (destacados em vermelho) ou com características químicas diferentes (em azul ciano e amarelo) explicam as bases da seletividade de AJA pelo tipo γ , como mostrados por Liu e colaboradores [5].

Contatos intermoleculares no cristal e as moléculas de AJA presentes na interface

A presença de quatro moléculas na unidade assimétrica (e não seis, como previsto pelo cálculo do coeficiente de Matthews) implica em uma grande quantidade

de solvente no cristal (~ 65 % do volume total). Deve se levar em conta a importância desse parâmetro, pois tem influência direta na baixa qualidade do padrão de difração, possibilitando uma maior desordem estática das moléculas.

Os contatos intermoleculares aqui observados diferem de todos os outros observados nas estruturas equivalentes disponíveis no banco de dados PDB [6]. A determinação e a descrição destes contatos foram feitas com o auxílio do servidor PISA [7], que pode ser acessado em http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot_int/pistart.html. Por este servidor, pode-se calcular a área de contato entre dois monômeros, descrever quais resíduos realizam contatos polares (pontes de hidrogênio e pontes salinas) e hidrofóbicos, além de se determinar a acessibilidade ao solvente de cada. Também é calculada a probabilidade, entre zero e um, de a interface analisada ter relevância na atividade biológica da proteína. Resumidamente, os contatos intermoleculares no cristal compartilham áreas pequenas (valor máximo de 470 Å² e mínimo de 70 Å²), com baixos números de contatos polares (em média 2 por interface). Esses valores de área de contato estão muito abaixo daqueles previstos como sendo funcionalmente importantes (em média 1400 Å², [8]), e não devem representar nenhum papel biológico.

Não surpreendentemente, a probabilidade de que qualquer interface observada tenha alguma relevância biológica é dada como zero em todos os casos, até mesmo no modo simétrico observado na interface mediada pelas moléculas do ácido ajulêmico. Esse resultado faz bastante sentido se levarmos em consideração que até a data de confecção desta tese, PPARs não haviam sido descritos como ativos em arranjos homodiméricos. Em todos os estudos funcionais sempre existe outro parceiro, que na maioria dos casos é o receptor RXR (como descrito no capítulo introdutório).

De qualquer maneira, o modo de interação das moléculas de AJA encontradas na superfície da molécula (como descrito no capítulo anterior), mais especificamente no sítio de interação do coativador, é no mínimo curioso e merece atenção. É observada a formação de um dímero simétrico na interface entre as cadeias A e B (o mesmo é observado entre C e D), com contatos mediados por duas moléculas de ácido ajulêmico, que também exibem simetria no modo de ligação (figura 3.5). Esse eixo de ordem 2 passa perpendicular ao plano da folha, entre as moléculas de AJA situadas no meio da figura.

Figura 3.5: Interface mediada por AJA. Representação estereográfica da formação de dímero simétrico devido à presença de AJA na superfície do LBD, como observado no modelo cristalográfico. Coloração *rainbow*, do N (azul) para o C-term (vermelho).

Curiosamente, apenas uma ponte de hidrogênio entre resíduos das cadeias protéicas foi encontrada, formada por Gln²⁷¹ Ne2 (cadeia A) e Asn³⁰⁸ O (cadeia B), separados por 3,1 Å. Se levarmos em consideração a influência da baixa resolução do conjunto, podemos dizer que outra ponte de hidrogênio seja formada, entre Asn²⁹⁴ Oδ1 (cadeia A) e Asn²⁹⁴ Nδ2 (cadeia B), que se encontram separados por 3,8 Å. Possivelmente, essa ponte seria detectada tendo-se em posse um conjunto de melhor resolução.

AJA se liga na interface com a cadeia alifática de 7 carbonos ocupando a cavidade hidrofóbica formada por resíduos das hélices H4, H5, H6 e H12. Para a molécula de AJA (cadeia E2) cuja cauda hidrofóbica se enterra no bolsão da cadeia A, três contatos polares são observados: **1)** entre Lys³⁰¹ Nζ (cadeia A) e um dos oxigênios do grupamento carboxílico de AJA, separados por 2,94 Å, **2)** entre Asn²⁹⁴ Nδ2 (cadeia B) e o outro oxigênio do mesmo grupamento ácido de AJA, a 3,36 Å e **3)** entre His⁴⁶⁶ Ne2 (cadeia B) e O1 do anel intermediário de AJA, com distância de 3,4 Å. Esses contatos também se repetem para a outra molécula de AJA da interface (cadeia F2), cuja cadeia alifática interage com o monômero B (sendo observadas pequenas variações nas distâncias entre os pares de átomos) com exceção do contato **2)**, onde na cadeia lateral do resíduo Asn²⁹⁴ aponta na direção oposta do grupo ácido de AJA. Também,

várias moléculas de solvente estão presentes nessa região da interface, ora realizando pontes de hidrogênio diretamente com AJA, ora mediando interação de AJA com as cadeias protéicas. Esse padrão de solvente não se repete em cada uma das moléculas de ácido ajulêmico, podendo ser devido à baixa resolução do conjunto de dados, ou mesmo à não obediência de um padrão de interação entre o ligante e o solvente devido ao formato do sítio. Todas as interações descritas estão mostradas na figura 3.6.

Figura 3.6: Contatos realizados por AJA na interface do dímero cristalográfico. (Representação estereográfica) Mapa de Fourier $2F_{obs}-F_{calc}$, σ_{calc} , contornado a 1σ (azul) em torno de AJA e as respectivas interações realizadas por essas moléculas na interface entre dois monômeros de LDB. A presença de contatos mediados por moléculas de solvente também é observada.

Na tentativa de se determinar quando a formação dessa interface ocorre, seja após a adição de AJA previamente à cristalização (em excesso molar 10:1) ou se somente é um artefato do processo de cristalização, foram realizados experimentos de filtração em gel, para se avaliar o estado oligomérico da proteína sob diferentes condições, usando uma coluna analítica Superdex 75 HR 10/30.

Temos disponível em nosso laboratório o clone da porção LDB do receptor nuclear RXR α adicionada da região D (*hinge*), em fusão com cauda de histidina (sem sítio de clivagem), que totaliza aproximadamente 35 KDa. Como citado várias vezes nesta tese, é sabido que RXR α é o parceiro funcional dos PPAR. Sabe-se também que a porção LBD dos dois receptores é suficiente para formação de heterodímeros, quando

ambos estão ligados a agonistas, como mostrado, por exemplo, em estruturas cristalográficas [9-11].

Também, como controle positivo para esses experimentos, foi utilizado o ligante de PPAR γ ciglitazone (Cayman Chemical), da família dos TZD. Essa família de ligantes é conhecida pela alta afinidade por PPAR e por se ligar especificamente no bolsão de ligação ao ligante, segundo observado em estruturas cristalográficas de complexos com TZDs [3, 9, 12]. O ligante endógeno ácido 9-cis retinóico (Sigma-Aldrich), foi usado para ligação em RXR α .

Foram montadas diversas combinações entre PPAR γ -LBD, RXR α -LBD, na presença e ausência dos ligantes, conforme descrito no gráfico abaixo. Quando necessários, as proteínas foram misturadas na razão molar 1:1 e os ligantes adicionados em excesso molares de 10 vezes. Os perfis de eluição são mostrados na figura 3.7.

Figura 3.7: Mudanças no estado de oligomerização de PPAR γ -LBD sob diferentes condições, por filtração em gel analítica. São observados diferentes perfis de eluição quando a proteína se encontra nas formas *apo*, *holo* e em complexo com o receptor RXR α , como descrito no texto abaixo.

De posse da curva de calibração da coluna, temos no gráfico acima que quando PPAR γ é analisado na forma *apo* (linha contínua verde), ou somente na presença dos ligantes AJA ou ciglitazone (linha contínua azul), um único pico é observado, e eluído num volume de 10,4 ml, compatível com um peso molecular de 31 KDa (forma monomérica).

Para RXR α *apo* (linha pontilhada verde) ou em complexo com o ácido 9-cis retinóico (linha pontilhada vermelha), dois picos são observados, em 9,6 ml e 8,1 ml. O primeiro se refere à forma *apo* da proteína e o segundo, pode ser devido à dímeros e tetrâmeros, não possíveis de se distinguir de acordo com os limites de resolução da coluna. O peso molecular estimado a partir do ajuste na curva de calibração para o monômero a partir da posição do pico é de 42 KDa, diferente do previsto pela sequência primária. Entretanto, deve se levar em consideração a presença do *hinge* (estruturalmente em forma de hélice- α) e da cauda de histidinas (sem estrutura secundária definida), o que resulta em um caráter não globular para a molécula total. Vale lembrar que a curva de calibração é feita com proteínas globulares.

Quando PPAR γ -LDB *apo* é analisado na presença de RXR α -LBD:9-cis (linha contínua vermelha), observa-se a presença de três populações, onde a primeira, eluída em 10,4 ml, condiz com PPAR na forma monomérica, o segundo, em 9,04 ml, com um heterodímero de 64 KDa (tendo em mente o comportamento não-globular de RXR α) e o terceiro em 8,1 ml, no *void* da coluna, que pode se referir a dímeros/tetrâmeros de RXR ou outros estados de oligomerização maiores que heterodímeros.

E finalmente, quando PPAR em complexo com AJA ou ciglitazone é analisado na presença de RXR e 9-cis, observa-se o aumento do pico em 9,04 ml, indicando que há maior formação de heterodímeros.

A compilação de todos estes resultados mostra que de fato a formação do dímero intermediado por AJA, como observado no modelo cristalográfico é simplesmente uma exigência para o correto empacotamento cristalino.

Comparação estrutural com outros PPAR-LBD

Até a data de realização deste trabalho, 14 estruturas de PPAR γ -LBD determinadas por difração de raios X estavam disponíveis no banco de dados PDB.

Estas serão referidas de acordo com seu código de deposição. São elas: 1FM6 (2 moléculas na unidade assimétrica, [9]), 1FM9 (1 molécula na unidade assimétrica, [9]), 1I7I (2 moléculas na unidade assimétrica, [13]), 1K74 (1 molécula na unidade assimétrica, [11]), 1KNU (2 moléculas na unidade assimétrica, [14]), 1NYX (2 moléculas na unidade assimétrica, [18]), 1RDT (1 molécula na unidade assimétrica, [10]), 1WM0 (1 molécula na unidade assimétrica, [4]), 1ZGY (1 molécula na unidade assimétrica, [12]), 2F4B (2 moléculas na unidade assimétrica, [15]), 1PRG (2 moléculas na unidade assimétrica, [3]), 2PRG (2 moléculas na unidade assimétrica, [3]), 3PRG (1 molécula na unidade assimétrica, [16]) e 4PRG (4 moléculas na unidade assimétrica, [17]). Foram acrescentadas também as cadeias A e B do complexo PPAR γ com AJA. Para as comparações feitas adiante, moléculas equivalentes por operações de simetria não-cristalográficas serão tratadas de maneira independente. Dessa maneira, 25 monômeros foram sobrepostos, pelo algoritmo SSM [19], implementado no programa Coot [20].

Das estruturas alinhadas, 6 monômeros estão na forma *apo* e os outros 19 restantes estão em complexo com algum ligante. Tal alinhamento estrutural é mostrado na figura 3.8. Apesar de toda a discussão corrente na literatura a respeito do movimento de H12 na presença ou ausência de ligantes, sendo essencial para a ativação da atividade transcricional, pode-se notar uma grande similaridade conformacional para essa região, havendo aparentemente dois tipos de população, onde H12 ora está fechada sobre a região LBD (estruturas mostradas em azul, aqui chamadas de forma I), ora levemente deslocada dessa posição (em vermelho, aqui chamadas de forma II). Uma explicação óbvia, olhando-se apenas as estruturas sobrepostas seria a de que as estruturas pertencentes à forma I seriam aquelas cristalizadas na presença de ligante e que as pertencentes à forma II seriam aquelas cristalizadas na forma *apo*.

Mas não é exatamente isso o que acontece. Dentre as estruturas que apresentam a forma I, três foram cristalizadas na forma *apo* e mesmo assim apresentam H12 na forma “ativa” (1PRG cadeia A, 2F4B cadeia B e 3PRG cadeia A). Ainda, das seis que estão na forma II, três foram cristalizadas na presença de agonistas (1I7I cadeia B, 4PRG cadeia B e 4PRG cadeia D).

Mas, curioso mesmo, é o fato de que em todas as estruturas na forma II, H12 realiza contatos com moléculas relacionadas por simetria cristalográfica, mais especificamente no sítio de interação com coativadores. Em todas estas o modo de interação entre essas moléculas é conservado, com Leu⁴⁶⁸ e Ile⁴⁷² realizando contatos hidrofóbicos que mimetizam aqueles encontrados na sequência consenso LxxLL em coativadores. Apesar de em alguns trabalhos essa interação entre moléculas relacionadas por simetria cristalina ser discutida [15, 17], em outros, é sugerido que de fato essa conformação de H12 seja referente ao estado “inativo” [4].

As comparações estruturais aqui descritas parecem mais reforçar resultados de estudos de RMN dessas moléculas em solução, que mostram que H12 apresenta um equilíbrio entre várias conformações, ao invés de se estabilizar em conformações únicas [21-23], sugerindo que de fato, a forma II seja apenas mero resultado do empacotamento cristalino.

Embora o ω -loop (região entre H1 e H3 é chamada de ω -loop, que consiste de H2, β 1, H2' e o grande loop, até o início de H3) tenha sido dito como a região flexível entre os membros da família, observa-se no alinhamento estrutural que apenas uma porção de aproximadamente 13 resíduos apresenta marcantes diferenças conformacionais. As conformações observadas dependem fortemente de interações com ligantes, sendo muito vezes descrita como ausente no caso de estruturas na forma *apo*. O modo de ligação de AJA faz com essa parte do ω -loop assuma uma conformação distinta de todas as outras observadas (figura 3.8). E essas características não se apresentam apenas no tipo γ . Os alinhamentos estruturais dos modelos de PPAR α e PPAR δ mostram a mesma variabilidade conformacional para esta região (não mostrados aqui), com alto grau de conservação para o restante da molécula. Em todas as estruturas analisadas, essa porção final do ω -loop é a que apresenta fatores de temperatura discrepantes quando comparados com o restante da cadeia.

Figura 3.8: Sobreposição estrutural entre as diversas estruturas da região LBD de PPAR γ . (Representação estereográfica) Essa sobreposição mostra o alto grau de conservação entre as estruturas determinadas tanto na forma *apo* quanto na *holo*. Diferenças maiores são encontradas na parte final do ω -loop e em H12. Essas diferenças sugerem a divisão dessas estruturas em dois grupos (chamados de formas I e II), como discutido no texto acima.

Deve-se ressaltar a capacidade de diferentes agonistas induzirem a ligação de diferentes proteínas co-ativadoras e mesmo a diferentes elementos responsivos [24]. Tentativas de se explicar essa seletividade baseando-se apenas na análise estrutural falham devido às poucas pistas fornecidas pelos modelos cristalográficos. Mesmo com a falta de peças nesse quebra-cabeça, podemos hipotetizar que a combinação entre diferenças estruturais da porção H12 com ω -loop (como consequência da presença ou ausência de ligantes) acarrete mudanças súbitas na dinâmica da proteína em solução, não detectáveis nesses modelos.

Não podemos descartar também a possibilidade de modificações pós-traducionais, especialmente nessas regiões, como a fosforilação do ω -loop já observada para o receptor RXR α [25].

Mais sobre o sítio externo de ligação de AJA

A ligação de pequenas moléculas ao sítio de ligação a proteínas co-reguladoras já foi reportada algumas vezes para receptores nucleares, sempre como resultado da adição de aditivos, essenciais para o sucesso de experimentos de cristalização. No trabalho de Fyffe e colaboradores [26], onde são apresentadas estruturas cristalográficas da região LBD de PPAR δ em complexo com ácidos graxos endógenos [PDBID 2B50], foram encontradas moléculas n-heptil- β -D-glicopiranosídeo em sítio equivalente àquele observado para AJA, com pequenas diferenças nas interações observadas. A cadeia alifática de sete carbonos ocupa a cavidade hidrofóbica formada por resíduos das hélices H4, H5, H6 e H12, na mesma posição do radical dimetilheptil de AJA, ambas mimetizando a posição de uma das leucinas conservadas da sequência LxxLL encontradas em coativadores (essa região é conhecida como “NR box”, e possui enovelamento em forma de hélice- α , como determinado para várias estruturas cristalográficas [3, 4, 9-13], figura 3.9).

Um ponto importante é a formação do chamado “grampo carregado” no LBD, como consequência da estabilização da H12 sobre o sítio de ligação ao ligante. Este grampo é formado pela exposição de dois resíduos carregados, Lys³⁰¹ e Glu⁴⁷¹, responsáveis por interações polares com a hélice do “NR box”. O grupo ácido de AJA interage com Lys³⁰¹, enquanto que um dos oxigênios da ribose (em n-heptil- β -D-glicopiranosídeo) interage com Glu⁴⁷¹.

Um outro exemplo é a ligação de uma molécula de um detergente não-iônico (dodecil- α -D-maltosídeo) mediando contatos intermoleculares em uma das estruturas cristalográficas do LBD de RXR, como reportado em [27]. Essa molécula ocupa o mesmo sítio que AJA e n-heptil- β -D-glicopiranosídeo.

Todas essas interações podem ser úteis no desenvolvimento de moléculas que se liguem de maneira específica em tal cavidade, com o intuito, por exemplo, de se inibir a atividade transcricional dos receptores, de maneira alternativa à ligação de antagonistas.

Figura 3.9: AJA e n-heptil-β-D-glicopiranosídeo no sítio de ligação de “NR box”. (Representação estereográfica) As cadeias alifáticas dessas duas moléculas mimetizam a posição da cadeia lateral de um resíduo de leucina, parte da sequência conservada LxxLL em proteínas coativadoras. AJA realiza contato polar com Lys³⁰¹ e o derivado de glicopiranosídeo com Glu⁴⁷¹. Esses dois resíduos também são importantes para o reconhecimento e estabilização da interação com NR box, formando um grampo carregado que favorece as interações polares.

Em trabalho de Arnold e colaboradores [28], os autores reportam os primeiros resultados de inibição direta da ligação entre receptores nuclear (no caso, o receptor do hormônio tireoidiano, TR) e proteínas co-reguladoras. Algumas dessas moléculas se mostraram ativas, ou seja, atuando como antagonistas, somente na presença de agonistas. Uma explicação parece ser a de que o agonista induz o fechamento de H12 sobre LBD e em seguida esses inibidores se ligam à região de ligação aos co-reguladores.

Essa aproximação pode vir a ser uma tendência na regulação das atividades de receptores nucleares.

Se PPAR γ liga AJA, porque não ligaria Δ^9 -THC e ácido THC-11-óico?

Embora não haja trabalhos que analisem a possibilidade de tais interações ocorrerem *in vitro*, uma rápida análise das estruturas químicas dessas moléculas, juntamente com as interações realizadas por AJA com PPAR γ -LBD, pode dar evidências sobre a viabilidade de acontecerem *in vivo*.

A substituição do grupo carboxílico alílico no ácido ajulêmico, de volta para um metil, como observado em Δ^9 -THC, acabaria com as pontes de hidrogênio realizadas por AJA com a porção final do ω -loop e com a Ser³⁴², como mostrado na figura 3.3. É

bem provável que essas interações sejam essenciais para a estabilização do ligante dentro bolsão. Mas, devido à presença de resíduos de caráter hidrofóbico no ω -loop, como por exemplo, Ile²⁶², Phe²⁶⁴, Ile²⁶⁷ e Pro²⁶⁹, não se podem descartar re-arranjos conformacionais que possam levar a estabilização por interações não-polares. Em contrapartida, a conservação da carboxila no ácido THC-11-óico sugere que as interações nessa porção da molécula sejam mantidas, como observado para AJA.

A substituição do radical dimetilheptil de volta para um pentil, como observado em Δ^9 -THC e ácido THC-11-óico, diminuiria consideravelmente o número de interações no interior do sítio hidrofóbico, mas a grande mobilidade associada a uma cadeia alifática saturada poderia garantir estabilidade através de outras interações.

Seguindo essa linha de raciocínio, poderíamos supor que de fato, interações entre PPAR γ e Δ^9 -THC seriam viáveis dentro do organismo, e dessa maneira, tal proteína poderia participar, mesmo que pouco, na mediação do efeito analgésico desta molécula.

Já foi sugerida aos nossos colaboradores a realização de experimentos para se verificar tais possibilidades, e a viabilidade destes está sendo analisada.

Referências do capítulo

1. G.J. Kleywegt & T.A. Jones (1994) CCP4/ESF-EACBM Newsletter on Protein Crystallography 31 9-142
3. Nolte, R.T., Wisely, G.B., Westin, S., Cobb, J.E., Lambert, M.H., Kurokawa, R., Rosenfeld, M.G., Willson, T.M., Glass, C.K., and Milburn, M.V. (1998) *Nature* **395**, 137 – 143
4. Östberg, T., Svensson, S., Selén, G., Uppenberg, J., Thor, M., Sundbom, M., Sydow-Bäckman, Gustavsson, A.L. e Jendeberg, L. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 41124 – 41130
5. Liu, J., Li, H., Burstein, S.H., Zurier, R.B., Chen, J.D. (2003) *Molecular Pharmacology* **63**, 983 – 992
6. Berman, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I.N. and Bourne, P.E. (2000) *Nucleic Acids Research* **28**, 235 – 242
7. E. Krissinel and K. Henrick (2005) In: M.R. Berthold *et.al.* (Eds.): *CompLife 2005*, LNBI 3695, pp. 163--174. Springer-Verlag Berlin Heidelberg
8. Lo Conte, L., Chothia, C. e Janin, J. (1999) *J. Mol. Biol.* **285**, 2177–2198
9. Gampe, R.T., Montana, G.T., Lambert, M.H., Miller, A.B., Bledsoe, R.K., Milburn, M.V., Kliewer, S.A., Wilson, T.M. e Xu, H.E. (2000) *Molecular Cell* **5**, 545 – 555
10. Haffner, C.D., Lenhard, J.M., Miller, A.B., McDougald, D.L., Dwornik, K., Ittoop, O.R., Gampe, R.T., Xu, E.H., Blanchard, S., Montana, V.G., Consler, T.G., Bledsoe, R.K., Ayscue, A. e Croom, D. (2004) *J. Med. Chem.* **47**, 2010 – 2029

11. Xu, H.E., Lambert, M.H., Montana, V.G., Plunket, K.D., Moore, L.B., Collins, J.L., Oplinger, J.A., Kliewer, S.A., Gampe, R.T., McKee, D.D., Moore, J.T. e Wilson, T.M (2001) *Proc. Nat. Acad. Sci.* **98**, 13919 – 13924
12. Li, Y., Choi, M., Suino, K., Kovach, A., Daugherty, J., Kliewer, S.A. e Xu, H.E. (2005) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **102**, 9505 – 9510
13. Cronet, P., Petersen, J. F. W., Folmer, R., Blomberg, N., Sjoblom, K., Karlsson, U., Lindstedt, E.-L., Bamberg, K. (2001) *Structure* **9**, 699 – 706
14. Sauerberg, P., Pettersson, I., Jeppesen, L., Bury, P.S., Mogensen, J.P., Wassermann, K., Brand, C.L., Sturis, J., Wöldike, H.F., Fleckner, J., Andersen, A.S.T., Mortensen, S.B., Svensson, L.A., Rasmussen, H.B., Lehmann, S.V., Polivka, Z., Sindelar, K., Panajotova, V., Ynddal, L. e Wulff, E.M. (2002) *J. Med. Chem.* **45**, 789 – 804
15. Mahindroo, N., Wang, C.C., Liao, C.C., Huang, C.F., Lu, I.L., Lien, T.W., Peng, Y.H., Huang, W.J., Lin, Y.T., Hsu, M.C., Lin, C.H., Tsai, C.H., Hsu, J.T.A., Chen, X., Lyu, P.C., Chao, Y.S., Wu, S.Y. e Hsieh, H.P. (2006) *J. Med. Chem.* **49**, 1212 – 1216
16. Uppenberg, J., Svensson, C., Jaki, M., Bertilsson, G., Jendeberg, L. e Berskentam, A. (1998) *J. Biol. Chem.* **272**(47), 31108 – 31112
17. Oberfield, J.L., Collins, J.L., Holmes, C.P., Goreham, D.M., Cooper, J.P., Cobb, J.E., Lenhard, J.M., Hull-Ryde, E.A., Mohr, C.E., Blanchard, S.G., Parks, D.J., Moore, L.B., Lehmann, J.M., Plunket, K., Miller, A.B., Milburn, M.V., Kliewer, S.A. e Willson, T.M. () *Proc. Nat. Acad. Sci.* **96**, 6102 – 6106
18. Ebdrup, S., Pettersson, I., Rasmussen, H.B., Deussen, H.J., Jensen, A.F., Mortensen, S.B., Fleckner, J., Pridal, L., Nygaard, L. e Sauerberg, P. (2003) *J. Med. Chem.* **46**, 1306 – 1317
19. Kissinel, E. e Henrick, K. (2003) *Proceedings of the 5th International Conference on Molecular Structural Biology* (Andreas J. Kungl & Penelope J. Kungl, Editors), 88
20. Emsley, P. e Cowtan, K. (2004) *Acta Crystallogr. D* **60**, 2126 – 2132
21. Cronet, P., Petersen, J.F.W., Folmer, R., Blomberg, N., Sjoblom, K., Karlsson, U., Lindstedt, E.L., and Bamberg, K. (2001) *Structure* **9**, 699 – 706
22. Berger, J.P., Petro, A.E., Macnaul, K.L., Kelly, L.J., Zhang, B.B., Richards, K., Elbrecht, A., Johnson, B.A., Zhou, G., Doebber, T.W., Biswas, C., Parikh, M., Sharma, N., Tanen, M.R., Thompson, G.M., Ventre, J., Adams, A.D., Mosley, R., Surwit, R.S., and Moller, D.E. (2003) *Mol. Endocrinol.* **17**, 662 – 676
23. Johnson, B.A., Wilson, E.M., Li, Y., Moller, D.E., Smith, R.G., and Zhou, G. (2000) *J. Mol. Biol.* **298**, 187 – 194
24. Rocchi, S., Picard, F., Vamecq, J., Gelman, L., Potier, N., Zeyer, D., Dubuquoy, L., Bac, P., Champy, M. F., Plunket, K. D., Leesnitzer, L. M., Blanchard, S. G., Desreumaux, P., Moras, D., Renaud, J. P., and Auwerx, J. (2001) *Mol. Cell* **8**, 737 – 747
25. Bruckl, N., Bastien, J., Bour, G., Tarrade, A., Plassat, J.L., Bauer, A., Adam-Stitah, S. e Rochette-Egly, C. (2005) *Cellular Signalling* **17**, 1229 – 1239
26. Fyffe, S.A., Alphey, M.S., Buetow, L., Smith, T.K., Ferguson, M.A.J., Sørensen, M.D., Björkling, F. e Hunter, W.N. (2006) *J. Mol. Biol.* **356**, 1005 – 1013
27. Klaholz, B. P. & Moras, D. (2000) *Acta Crystallographica D*, **56**, 933–935
28. Arnold, L.A., Estébanez-Perpiñá, Togashi, M., Jouravel, N., Shelat, A., McReynolds, A.C., Mar, E., Nguyen, P., Baxter, J.D., Fletterick, R.J., Webb, P. e Guy, R.K. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 43038 – 43055

CAPÍTULO 4

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na primeira parte desta tese foram descritos todos os procedimentos experimentais que levaram à determinação da estrutura cristalográfica da região LDB do receptor nuclear PPAR γ em complexo com um análogo do canabinóide Δ^9 -THC, o ácido ajulêmico (AJA).

Estudos pré-clínicos mostraram que AJA induz efeitos analgésico e antiinflamatório, sem apresentar alterações psicoativas como observado para Δ^9 -THC. Esse composto foi patenteado e teve seus direitos de desenvolvimentos comprados pela Indevus Pharmaceuticals, Inc., nos Estados Unidos. Após aprovação recente do FDA, AJA está entrando em fase II de testes clínicos.

Contudo, a via de ação de AJA não é bem entendida, mas resultados recentes sugerem que PPAR γ seja um mediador dessa ação. Estudos funcionais mostraram a ativação da atividade transcricional desse receptor sob a administração de AJA em doses terapêuticas. Foi mostrado também que H12 é essencial para tal ativação, resultando no recrutamento de coativadores. Ainda, AJA inibiu a atividade promotora de Interleucina-8 em um modo dependente de PPAR γ e surpreendentemente, também induziu a diferenciação de fibroblastos 3T3 L1 em adipócitos, efeito esse mediado pelo mesmo receptor. Esses resultados estão mostrados em trabalho de Liu e colaboradores (*Molecular Pharmacology* **63**, 983 – 992, 2003).

Todos esses resultados juntos sugerem uma relação entre o efeito antiinflamatório de AJA e a ativação de PPAR γ , com possível potencial terapêutico em diferentes vias de sinalização.

Os resultados cristalográficos aqui apresentados corroboram os discutidos acima e mostram que de fato PPAR γ pode servir como um mediador da ação de AJA no organismo, atuando como agonista. Ainda, a descrição e análise das interações podem ser úteis ao desenho racional de novos análogos, mais potentes e específicos.

Curiosamente, quando comparado com outras estruturas descritas na literatura, o modelo cristalográfico do complexo levanta uma interessante questão: como diferentes agonistas (TZD, ácidos graxos, análogos de tirosina, AJA) podem induzir diferentes vias de regulação se as modificações que estes causam na estrutura da proteína são praticamente as mesmas?

Provavelmente, a resposta estará na análise do comportamento dinâmico destas proteínas, em sua construção completa (N-terminal + DBD + LBD) e na presença de outros componentes essenciais, como co-reguladores e elementos responsivos. Também não se pode descartar a influência dos diferentes ambientes celulares nos quais as vias são reguladas, pois é sabido que essas proteínas também são alvos de modificações pós-traducionais.

Atualmente, em colaboração com os doutorandos Alessandro Nascimento e Napoleão Valadares (ambos alunos do nosso grupo), estamos tentando medir dados de afinidade de AJA por PPAR γ , utilizando diferentes técnicas para análise em solução, como SPR (*Surface Plasmon Resonance*) e ITC (*Isothermal Titration Calorimetry*), mas devido a baixa solubilidade em solução aquosa do ácido ajulêmico, a realização desses ensaios com sucesso é prejudicada. Alternativas para se contornar este problema estão sendo testadas.

É importante ressaltar que existe um número mínimo de trabalhos publicados sobre o uso destas técnicas na caracterização cinética de agonistas/antagonistas de receptores nucleares, dada a alta lipofilia inerente a essas pequenas moléculas.

Além disso, a realização de experimentos de transfecção celular e análise por gene repórter podem fornecer dados sobre possíveis interações entre PPAR γ e os canabinóides Δ^9 -THC e ácido THC-11-óico. Esses compostos são conhecidos por também apresentarem ação antiinflamatória e analgésica, além disso, apresentam similaridade estrutural com a molécula do AJA sugerindo que PPAR possa

desempenhar alguma função na regulação desses efeitos. A realização destes experimentos foi sugerida aos nossos colaboradores, fornecedores do ácido ajulêmico.

A presença do ácido ajulêmico na superfície da proteína, mais especificamente no sítio de ligação a proteínas co-ativadora, pode auxiliar no desenvolvimento de ligantes potentes e seletivos para esta região, proporcionando alternativas para a regulação ou inibição da transcrição gênica.

Em resumo, os resultados obtidos para AJA, agora caracterizado como agonista do receptor $\text{PPAR}\gamma$, demonstram que canabinóides endógenos e sintéticos podem servir como ponto de partida no planejamento de fármacos com ação específica em receptores nucleares.

PARTE II
ESTRUTURA CRISTALOGRÁFICA DO
COMPLEXO
HIV-1 IN-CCD/LEDGF-IBD

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

No capítulo introdutório é apresentado um panorama atual da AIDS mundo. Em seguida, é discutida a importância da enzima integrase no processo de replicação do agente causador, o HIV, e a sua aplicação como novo alvo no desenho racional de fármacos anti-retrovirais. O artigo publicado encontra-se no apêndice II.

HIV-1 IN e o problema biológico associado

A tentativa de se erradicar a síndrome da imunodeficiência adquirida (acquired immunodeficiency syndrome - AIDS) é vista hoje como um dos maiores desafios da humanidade. O agente causador da AIDS, o vírus da imunodeficiência humana (Human Immunodeficiency Virus – HIV), representa atualmente um grande risco à saúde mundial, com grande impacto em aspectos econômicos, sociais e éticos. Também são tidos como complexos quebra-cabeças científicos, na busca por medicamentos e vacinas.

Inicialmente reportada em 1981 em um pequeno número de pacientes [1-3], AIDS hoje é considerada uma epidemia, com números assustadores. Em aproximadamente 20 anos, mais de 20 milhões já morreram, e cerca de 38 milhões estão infectadas em todo o mundo (esse número tem crescido em aproximadamente cinco milhões por ano). A maior parte dos doentes, 25,8 milhões, encontra-se no continente africano (www.unaids.org). Na América Latina esse número chega a 1,6 milhões de infectados (duzentos mil novos doentes por ano). No Brasil, 135 mil pessoas têm acesso ao tratamento anti-retroviral totalmente financiado pelo governo, que produz medicamentos genéricos em instituições nacionais públicas e privadas.

Desde a identificação clínica da AIDS, um extraordinário progresso tem se observado nos campos terapêutico e científico. Foram necessários seis anos para a identificação do agente patogênico e determinação de testes eficientes para a detecção deste, além da introdução da primeira terapia efetiva, o medicamento AZT.

Além disto o prognóstico para pacientes que tem acesso a esses tratamentos mudou completamente desde que o primeiro caso de AIDS foi reportado [4]. Hoje, a expectativa de vida para portadores sob tratamento excede oito anos. Antes da introdução do AZT em 1987, essa expectativa era menor que um ano. Essa mudança dramática se deve ao desenvolvimento de terapias intensivas, à detecção da doença em estágios iniciais em indivíduos infectados e ao imenso esforço para se entender e analisar o ciclo de vida e os mecanismos de desenvolvimento de resistência do vírus.

As terapias correntes, aprovadas pelo FDA (*U.S. Food and Drug Administration*), pela EMEA (*European Medicine Agency*) e pela Anvisa (Agência Nacional Vigilância Sanitária), têm como alvos três importantes passos do ciclo de vida do HIV: a transcrição reversa, maturação proteolítica e a fusão do genoma viral no cromossomo do hospedeiro (figura 1.1). Atualmente a terapia mais eficiente consiste na combinação de três ou mais fármacos, conhecida como HAART (*highly active antiretroviral therapy*) ou “coquetel” [5]. Esse coquetel inclui inibidores das enzimas transcriptase reversa e da protease, diminuindo de maneira significativa taxa de progressão da doença e da mortalidade de pacientes. Mas, em contrapartida, não é bem tolerada pelos pacientes. Requer disciplina, é de alto custo e geralmente leva à resistência contra os princípios ativos [6].

O mais recente alvo para o desenvolvimento de novos fármacos tem sido uma terceira enzima viral, a integrase (a partir daqui referida como HIV-1 IN), onde estudos recentes do grupo Merck têm demonstrado a viabilidade e eficácia de inibidores da integrase em modelos animais [7]. Os primeiros inibidores da integrase surgiram há aproximadamente 10 anos atrás [8-10] e agora estão alcançando fase I em testes clínicos. Os compostos que se encontram em fase de testes foram desenvolvidos pela Merck e GSK–Shionogi, e pertencem à classe de compostos que inibem o passo de transferência da fita, agindo sobre o sítio ativo da integrase. Características estruturais e

dados sobre a atividade dessa classe de inibidores são encontrados em revisão de Pommier e colaboradores [11].

A importância da integrase na replicação do HIV

Aproximadamente 40 a 100 moléculas da integrase são encontradas dentro de uma partícula do HIV. Sua função primária é catalisar a inserção do cDNA viral no genoma da célula infectada, podendo agir também como cofator na ação da transcriptase reversa [12-13]. A integração é um passo essencial na replicação viral, pois a transcrição de seu genoma e a produção de suas proteínas requerem que o cDNA esteja completamente integrado ao cromossomo do hospedeiro [14]. Vide esquema resumido do ciclo de replicação viral na figura 1-1.

HIV-1 IN é uma enzima de 32 KDa, formada por três domínios, estrutural e funcionalmente distintos, chamados de NTD (domínio N-terminal), CCD (domínio catalítico) e CTD (domínio C-terminal). NTD e CTD são importantes para o reconhecimento e ligação da enzima a seqüências específicas de DNA e CCD é responsável pelas atividades catalíticas (clivagem e junção), como descritas a seguir.

Nesse processo, após a transcrição reversa, que ocorre dentro do citoplasma, integrase participa tanto do passo de preparação (clivagem) das extremidades 3' a serem fusionadas (conhecido com *processamento 3'*), bem como de integração do cDNA processado ao genoma do hospedeiro. Nesse último passo, HIV-1 IN permanece ligada ao cDNA, interagindo ainda com muitas outras proteínas intracelulares, formando os chamados *complexos pré-integração* (PICs). Algumas das proteínas da célula alvo que constituem os PICs se ligam diretamente à integrase e ainda estimulam sua atividade enzimática [revisão completa em 15]. Dentre essas estão INI1 (*Interactor 1*, 16), que foi o primeiro parceiro de HIV-1 IN descrito, LEDGF (*Lens-epithelium derived growth factor*, também conhecida como p75, 17), HSP60 (Heat-shock protein 60, 18), e outras mais. A organização dos PICs é suficiente para o transporte do complexo através da membrana nuclear.

Uma vez dentro do núcleo, integrase catalisa a inserção (junção) do cDNA viral com o genoma alvo, em um processo completado com o auxílio de enzimas da via de reparo do DNA do próprio hospedeiro.

Figura 1-1: O ciclo de replicação do HIV e os pontos alvo para o desenho de fármacos. Esquema passo-a-passo do ciclo de vida do HIV. Seguindo as setas, de cima pra baixo: com a aproximação da partícula viral na membrana celular do hospedeiro, esta interage com receptores na membrana, que mediam a fusão e o rompimento do capsídeo do vírus. Uma vez no citoplasma, ocorre a transcrição reversa a partir do RNA viral, utilizando-se transcriptases reversas provenientes do vírus. O cDNA produzido sofre processamento nas extremidades 3', seguido da formação das PICs. Esse novo complexo é necessário e suficiente para o transporte do cDNA para dentro do núcleo. Uma vez dentro do núcleo, o cDNA do vírus é integrado ao cromossomo do hospedeiro, que passa a produzir as poli-proteínas do vírus. HIV-1 IN é responsável pelos passos do processamento e da integração do genoma viral. O genoma do vírus completamente integrado recebe o nome de *provírus*. Após a transcrição do *provírus*, as proteases realizam o processamento das poli-proteínas, e ocorre o agrupamento dos componentes virais na superfície interna da membrana celular, onde novas partículas virais são geradas. As terapias anti-HIV já disponíveis focam os passos de (a) fusão do envelope viral na membrana da célula do hospedeiro, (b) transcrição reversa e (c) digestão da poli-proteína. Integrase, a terceira enzima retroviral, catalisa o processamento das extremidades do cDNA viral, e permanece ligado a ele para posterior formação dos PICs. Após o transporte do complexo para dentro do núcleo, integrase catalisa a inserção do DNA viral no cromossomo do hospedeiro. Inibidores dos passos (d) e (e) estão atualmente em desenvolvimento e alguns já alcançam primeiros estágios de testes clínicos. Esquema adaptado de Pommier e colaboradores [11].

Especificamente, a interação da HIV-1 com LEDGF parece ter consequências na distribuição celular da integrase, como mostrado em experimentos RNA de interferência ou de mutantes deficientes em LEDGF. Além do mais, a interação com LEDGF previne integrase de sofrer degradação pela via de ubiquitinação [22]. LEDGF também tem sido mostrada como interagindo com as integrases, como HIV-2 IN e com a integrase de FIV (*feline immunodeficiency virus*) [15, 17].

LEDGF se liga à HIV-1 através de um pequeno domínio, de 80 aminoácidos, chamado de IBD (*integrase binding domain*), que se mostra necessário e suficiente para tal interação [22].

Inibidores de HIV IN: mais de dez anos de tentativas

Terapias baseadas em inibidores da HIV IN têm sido propostas ao longo dos 10 últimos anos, antes mesmo da recente validação da integrase como alvo farmacológico [7]. De fato, IN é essencial para a replicação retroviral, como discutido acima. Ainda, a ausência de uma proteína com função equivalente nas células do hospedeiro sugere que inibidores da integrase, a princípio, não devam interferir nos processos celulares normais. Contudo, tem sido mostrado que a superdosagem alguns dos atuais compostos não só bloqueia a integrase, mas também altera atividade de algumas classes de recombinases, responsáveis pela regulação das vias normais de produção de anticorpos no hospedeiro [45].

Existe ainda a necessidade constante do desenvolvimento de novas drogas e também da determinação de alvos alternativos, pois é sabido que o tratamento combinando fármacos anti-HIV, como é o caso do “coquetel”, é mais efetivo que somente a administração individual de fármacos, e que ainda o vírus adquire rapidamente resistência aos princípios ativos.

No trabalho descrito nesta parte da tese, é mostrada a determinação da estrutura cristalográfica do domínio catalítico da enzima HIV-1 em complexo com um dos parceiros na formação do *complexo pré-integração*, o fator de transcrição LEDGF. A análise do modelo final dá as bases do reconhecimento molecular entre os parceiros e ainda sugere a possibilidade do uso das interações observada interface de entre as moléculas como um método alternativo na busca de medicamentos anti-HIV.

Referências do capítulo

1. Gottlieb, M.S., Schroff, R., Schanker, H.M., Weisman, J.D., Fan, P.T., Wolf, R.A. e Saxon A. (1981) *N. Engl. J. Med.* **305**, 1425 – 1431
2. Masur, H., Michelis, M.A., Greene, J.B., Onorato I., Stouwe, R.A., Holzman, R.S., Wormser, G., Brettman, L., Lange, M., Murray, H.W. e Cunningham-Rundles (1981) *N. Engl. J. Med.* **305**, 1431 – 1438
3. Siegal, F.P., Lopez, C., Hammer, G.S., Brown, A.E., Kornfeld, S.J., Gold J., Hassett J., Hirschman, S.Z., Cunningham-Rundles, C. e Adelsberg, B.R. (1981) *N. Engl. J. Med.* **305**, 1439 – 1444
4. Jaffé, H. (2004) *Science* **305**, 1243 – 1244
5. Richman, D. D. (2001) *Nature* **410**, 995 – 1001
6. Cohen, J. (2002) *Science* **296**, 2320 – 2324
7. Hazuda, D.J., Young, S.D., Guare, J.P., Anthony, N.J., Gomez, R.P., Wai, J.S., Vacca, J.P., Handt, L., Motzel, S.L., Klein, H.J., Dornadula, G., Danovich, R.M., Witmer, M.V., Wilson, K.A.A., Tussey, L., Schleif, W.A., Gabryelski, L.S., Jin, L., Miller, M.D., Casimiro, D.R., Emini, E.A. and Shiver, J.W. (2004) *Science* **305**, 528 – 532
8. Fesen, M.R., Kohn, K.W., Leteurtre, F. e Pommier, Y. (1993) *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **90**, 2399 – 2403
9. Cushman, M. e Sherman, P. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **185**, 85 – 90
10. Carteau, S., Mouscadet, J.F., Goulaouic, H., Subra, F. e Auclair, C. (1993) *Arch. Biochem. Biophys.* **305**, 606 – 610
11. Pommier, Y., Johnson, A.A. e Marchand, C. (2005) *Nature Reviews Drug Discovery* **4**, 236 – 248
12. Tsurutani, N. *et al.* (2000) *J. Virol.* **74**, 4795 – 4806
13. Zhu, K., Dobard, C. e Chow, S. A. (2004) *J. Virol.* **78**, 5045 – 5055
14. Brown, P. O. (1998) *Retroviruses*, 161–203 (eds. Coffin, J.M., Hughes, S.H. e Varmus, H.E.). Cold Spring Harbor Press
15. Turlure, F., Devroe, E., Silver, P.A. e Engelman, A. (2004) *Front. Biosci.* **9**, 3187 – 3208
16. Kalpana, G.V. e Goff, S.P. (1994) *J. Cell. Biochem.* **18B**, 27 – 32
17. Cherepanov, P., Maertens, G., Proost, P., Devreese, B., Van Beeumen, J., Engelborghs, Y., De Clercq, E. e Debyser, Z. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 372 – 381
18. Parissi, V., Camels, C., De Soultrait, V.R., Caumont, A., Fournier, M., Chaignepain, S. e Litvak, S. (2004) *J. Virol.* **75**, 11344 – 11353
19. Maertens, G., Cherepanov, P., Pluymers, W., Busschots, K., De Clercq, E., Debyser, Z. e Engelborghs, Y. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 33528 – 33539
20. Maertens, G., Cherepanov, P., Debyser, Z., Engelborghs, Y. & Engelman, A. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 33421 – 33429
21. Llano, M., Vanegas, M., Fregoso, O., Saenz, D., Chung, S., Peretz, M. e Poeschla, E. M. (2004) *J. Virol.* **78**, 9524 – 9537
22. Emiliani, S., Mousnier, A., Busschots, K., Maroun, M., Van Maele, B., Tempe, D., Vandekerckhove, L., Moisan, F., Ben-Slama, L., Witvrouw, M., *et al.* (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 25517 – 25523
22. Cherepanov, P., Devroe, E., Silver, P. A. & Engelman, A. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 48883 – 48892
23. Melek, M., Jones, J.M., O'Dea, M.H., Pais, G., Burke, T.R., Pommier, Y., Neamati, N. e Gellert, M. (2002) *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **99**, 134 – 137

CAPÍTULO 2

DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA CRISTALOGRÁFICA

Neste capítulo são apresentados os procedimentos experimentais e os resultados obtidos, a partir da coleta dos dados de difração de raios X, realizada no NSLS (*Brookhaven National Laboratory* - EUA) até a determinação e avaliação do modelo final, por substituição molecular do complexo entre IN-CCD e LEDGF-IBD.

Procedimento experimental

Todos os processos de subclonagem dos genes HIV-1 IN CCD e LEDGF IBD, expressão e purificação das proteínas recombinantes e cristalização do complexo foram realizados pelo Doutor Peter Cherepanov e seus colaboradores no Departamento de Patologia, Escola Médica da Universidade de Harvard, Boston, EUA.

Em resumo, o gene que codifica para HIV-1 IN CCD (resíduos 50-212, com mutação Phe¹⁸⁵Lys por razões de solubilidade da proteína) foi subclonado em vetor pET15b, e a proteína, expressa em fusão com cauda His6x foi purificada por cromatografia de afinidade como previamente publicado [1]. A cauda de histidinas foi removida por digestão com trombina (Sigma-Aldrich) e em seguida a amostra foi sujeita a uma filtração em gel através de uma coluna Superdex-200 (Amersham Pharmacia Biosciences), em tampão de corrida 0,5 M NaCl, 25 mM HEPES pH 7,2 e 0,5 mM EDTA.

O gene que codifica para LEDGF-IBD (resíduos 347-471) foi preparado clonado em vetor pGEX-4T1, e a proteína e expressa em fusão com GST. A remoção de 29 resíduos na região C-terminal que se mostraram desordenados em trabalho

anterior [2] foi feita através da adição de tripsina. A LEDGF-IBD foi ainda submetida a uma purificação de troca iônica, em coluna SP Sepharose, seguida de filtração em gel em uma Superdex-200, em tampão de corrida 0,1 M NaCl, 50 mM Na₂HPO₄, pH 7,2.

Para montagem do complexo visando experimentos de cristalização, IN-CCD e LEDGF-IBD foram concentradas separadamente a 10 mg/ml, e misturadas a uma razão molar 2:1. O complexo foi então equilibrado em tampão 250 mM NaCl, 10 mM DTT, 0,4 mM EDTA, 20 mM Hepes, pH 7,0, usando colunas BioSpin-6 (BioRad).

Inicialmente, precipitados cristalinos foram obtidos pelo método de difusão de vapor por gotas suspensas, a 20,5 °C, na condição 42 do kit de matriz esparsa *Crystal Screen I* (Hampton Research), cuja preparação contém 20% PEG 8000, 50 mM KH₂PO₄. Após otimização dos parâmetros, a condição final que favoreceu o crescimento de bons cristais (figura 2-1) foi 18% PEG 3350, 45,9 mM Na₂HPO₄, 21,6 mM NaH₂PO₄ e 157,5 mM KH₂PO₄ (pH final de 6,25).

Figura 2-1: Cristais do complexo IN-CCD:LEDGF-IBD. Cristais obtidos por difusão de vapor por gotas suspensas, a 20,5 °C, em 18% PEG 3350, 45,9 mM Na₂HPO₄, 21,6 mM NaH₂PO₄ e 157,5 mM KH₂PO₄, pH 6,25. Cristais coletados tinham dimensões aproximadas de 1 × 0,09 × 0,05 mm.

Os cristais foram submetidos a experimentos de difração de raios X na linha X26C, Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (Laboratório Nacional de Brookhaven, Upton, NY - EUA). Dados foram coletados a um comprimento de onda de 1 Å, por um detector do tipo CCD, modelo QUANTUM 4 (ADSC), com os cristais resfriados a 100 K (crioprotégidos com a adição de 11% de glicerol (v/v) à solução mãe). Os dados foram processados com o pacote HKL2000 [3]. Os cristais pertenciam ao grupo

espacial C2. Um coeficiente de Matthews de $2.1 \text{ \AA}^3/\text{Da}$ se mostrou consistente com a presença de duas moléculas de IN-CCD e duas de LEDGF-IBD na unidade assimétrica. Os parâmetros da coleta e as estatísticas do conjunto se encontram na tabela 2.1.

A substituição molecular foi feita utilizando-se o programa MOLREP [4] em duas etapas, com dados entre 15 e $3,5 \text{ \AA}$ de resolução. Primeiro, tendo como modelo a estrutura cristalográfica da IN⁵⁰⁻²¹² (mutações W¹³¹E e Phe¹⁸⁵Lys), depositada no banco de dados PDB [5] sob o código 1BIS [6], foram encontradas duas soluções esperadas para tal porção. A inspeção visual do empacotamento gerado e a análise dos mapas de densidade eletrônica indicaram que as soluções estavam corretas.

Em seguida, fixando as duas moléculas de IN já encontradas, e usando o modelo de mais baixa energia da LEDGF dentre os 20 determinados por RMN em trabalho anterior de Cherepanov e colaboradores [7], (também depositada no PDB, sob o código 1ZE9), outra etapa de substituição molecular foi realizada. Novamente, a inspeção visual do resultado indicou a coerência do resultado.

O modelo final (2 moléculas de IN e 2 moléculas da LEDGF) foi sujeito ao refinamento de corpo rígido e anelamento simulado, pelo pacote de programas CNS [8]. Ciclos de refinamento no espaço real, com modificações manuais do modelo, foram feitos através da inspeção dos mapas de densidade eletrônica usando o programa gráfico Coot [9]. Alternadamente, cálculos intermediários (no espaço recíproco) para refinamento de posições atômicas, restrições geométricas e de contato, refinamento de fator de temperatura individual para todos os átomos, além de minimização de funções de energia e TLS, utilizando-se o programa Refmac [10]. O modelo final incluiu ainda dois íons fosfato, quatro moléculas de glicerol e 219 sítios tratados como água. Os parâmetros finais do refinamento do modelo estão resumidos na tabela 2.1. O modelo final foi depositado no banco de dados PDB sob o código 2B4J. Na análise da qualidade estereoquímica do modelo final, feita pelo programa PROCHECK [11], 95% dos resíduos se encontram nas regiões mais favoráveis, 5% estão em regiões adicionais permitidas, e nenhuma ocupação em regiões generosamente permitidas ou totalmente desfavoráveis.

Tabela 2-1: Parâmetros e estatísticas da coleta e processamento dos dados do cristal do complexo HIV-1 IN-CCD: LEDGF-IBD.

Valores em parênteses são referentes à camada mais externa de resolução	
Coleta de dados	
Grupo espacial	C2
Parâmetros da rede	a = 112.4 Å, b = 60.6 Å, c = 71.1 Å, $\beta = 109.1^\circ$
Limites de resolução (Å)	67.27 – 2.02 (2.09 – 2.02)
Reflexões únicas	32136 (3189)
Multiplicidade	2,4 (2,3)
R _{sym} (%)	7.2 (47.0)
$\langle I \rangle / \sigma(I)$	18,9 (3,1)
Completeza (%)	99.2 (99.2)
Refinamento do modelo	
Limites de resolução (Å)	20.0 – 2.02 (2.07 – 2.02)
Reflexões	30486 (2223)
R (%)	18.0 (21.4)
R _{free} (%)	22.6 (27.4)
r.m.s.d. distância de ligação (Å)	0.017
r.m.s.d. ângulo de ligação (°)	1,602

Referências do capítulo

1. Dyda, F., Hickman, A. B., Jenkins, T. M., Engelman, A., Craigie, R. e Davies, D. R. (1994) *Science* **266**, 1981 – 1986

2. Cherepanov, P., Sun, Z. Y., Rahman, S., Maertens, G., Wagner, G. e Engelman, A. (2005) *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**, 526 – 532

3. Otwinowski, Z. e Minor, W. (1997) *Methods in Enzymology*, Volume **276**: Macromolecular Crystallography, parte A, 307 – 326, C.W. Carter, Jr. e R. M. Sweet, Eds., Academic Press (New York).

4. Vagin, A. e Teplyakov, A. (1997) *J. Appl. Cryst.* **30**, 1022 – 1025

5. Berman, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I.N. e Bourne, P.E. (2000) *Nucleic Acids Research* **28**, 235 – 242

6. Goldgur, Y., Dyda, F., Hickman, A.B., Jenkins, T.M., Craigie, R. e Davies, D. R. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 9150 – 9154

7. Cherepanov, P., Sun, Z. Y., Rahman, S., Maertens, G., Wagner, G. e Engelman, A. (2005) *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**, 526 – 532

8. Brunger, A.T., Adams, P.D., Clore, G.M., DeLano, W.L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R.W., Jiang, J.S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N.S., Read, R.J., Rice, L.M., Simonson, T. e Warren, G.L. (1998) *Acta Crystallogr. D* **54**, 905 – 921
9. Emsley, P. & Cowtan, K. (2004) *Acta Crystallogr. D* **60**, 2126 – 2132
10. Murshudov, G. N., Vagin, A. A. & Dodson, E. J. (1997) *Acta Crystallogr. D* **53**, 240 – 255
11. Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S. and Thornton, J.M. (1993) *J. Appl. Cryst.* **26**, 283 – 291

CAPÍTULO 3

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo é feita uma análise detalhada do modelo cristalográfico do complexo LEDGF-IBD:IN-CCD determinado a 2,02 Å e as consequências deste na inferência de um mecanismo de reconhecimento molecular, com bases estruturais. Os detalhes observados na interface de interação proteína-proteína sugerem que esta pode ser usada como alvo na busca por inibidores que possam perturbar o reconhecimento molecular dentro das células do hospedeiro, inviabilizando o contínuo do processo de replicação viral.

A estrutura cristalográfica do complexo protéico IN-CCD: LEDGF-IBD

O domínio catalítico (CCD) da enzima HIV-1 Integrase (resíduos 50-212) é necessário e suficiente para a interação desta com LEDGF [1]. Além do mais, a mutação Phe¹⁸⁵Lys, por razões de solubilidade, não diminui de maneira significativa a interação entre as duas proteínas [2]. Cristais do complexo IN⁵⁰⁻²¹²(Phe¹⁸⁵Lys):LEDGF³⁴⁷⁻⁴⁴² sujeitos a experimentos de difração de raios X difrataram até aproximadamente 2 Å de resolução, com o uso de uma fonte de luz síncrotron. O modelo estrutural do complexo foi gerado por substituição molecular e refinado até valores de R e R_{free} de 18,0 % e 22,6 %, respectivamente (tabela 3.1).

A unidade assimétrica dos cristais contém um dímero IN-CCD (cadeias A e B) e duas moléculas de LEDGF-IBD (cadeias C e D), ligadas na interface dimérica das CCD, como mostrado na figura 3-1. O conteúdo da unidade assimétrica é equivalente à organização funcional do complexo. O esquema a seguir de cores é mantido durante o decorrer do trabalho: cadeias A e B, referentes à IN-CCD em amarelo e roxo, e cadeias C e D (LEDGF) em verde e azul, respectivamente.

O modelo final possui uma pseudo-simetria de ordem dois, com as duas moléculas CCD-IBD apresentando pequenas diferenças entre si. A interface de interação entre as cadeias A, B (IN-CCD) e C (LEDGF-IBD) será discutida em detalhes a seguir.

Figura 3-1: Representação estereográfica do modelo cristalográfico IN-CCD:LEDGF-IBD. Conteúdo da unidade assimétrica dos cristais e unidade biológica do complexo. O modelo apresenta um dímero de IN-CCD, duas moléculas de LEDGF-IBD, e mais dois íons fosfato, quatro moléculas de glicerol e 219 sítios tratados com moléculas de água.

No geral, as estruturas dos dois domínios são muito parecidas àquelas já descritas em separado (PDBID 1BL3 e 1Z9E) [2, 3]. Por exemplo, IN-CCD forma dímero compartilhando extensa interface, como também já observado em outra estrutura previamente determinada (PDBID 1K6Y) [4]. Além disso, um íon fosfato é encontrado interagindo com cada um dos sítios ativos do dímero CCD, com os resíduos Thr⁶⁶, His⁶⁷ e Lys¹⁵⁹. O mesmo é observado em 1K6Y, reforçando a hipótese de que essa posição poderia corresponder ao sítio de coordenação ao grupamento fosfato do DNA [4].

Os contatos atômicos observados na interface entre os domínios IBD e CCD se dão sobre uma superfície aproximada de 1300 Å². A nomenclatura utilizada para identificação dos elementos de estrutura secundária da região IN-CCD, foi primeiramente introduzida em trabalho de Dyda e colaboradores [3].

Nota-se uma cooperatividade entre as duas cadeias de IN-CCD na interação com um monômero de LEDGF-IBD. Basicamente, hélice $\alpha 5$ e seis resíduos que formam o *loop* que conecta hélices $\alpha 4$ e $\alpha 5$ da cadeia A (referido com conector $\alpha 4/\alpha 5$) e hélices $\alpha 1$ e $\alpha 3$ da cadeia B, estão envolvidas na manutenção do complexo. Em LEDGF-IBD,

somente os resíduos presentes em regiões de voltas entre as hélices são responsáveis por interações inter-moleculares, como mostrados em experimentos de RMN e mutações sítio-dirigidas previamente reportados por Cherepanov e colaboradores [2].

Em [2] os autores mostraram através que a substituição alternada Ile³⁶⁵Ala, Asp³⁶⁶Ala ou Phe⁴⁰⁶Ala em LEDGF-IBD eliminava completamente a interação entre CCD e IBD em ensaios de *His₆-tag pull-down*. Ainda, a mutação Val⁴⁰⁸Ala reduziu significativamente a afinidade entre os dois domínios. A inspeção do modelo cristalográfico agora dá as bases estruturais dessas observações, mostrando que de fato esses resíduos realizam importantes contatos com a integrase, como mostradas na figuras 3-2.

Figura 3-2: Contatos observados na interface de interação de IN-CCD com LEDGF-IBD. Rede de contatos polares e hidrofóbicos encontrado na interface entre IN-CCD (cadeias A e B) e LEDGF (cadeia C), ilustrando o grande número de contatos. A presença de três moléculas de água bem coordenadas (baixo fator de temperatura) é observada.

A cadeia lateral do resíduo Ile³⁶⁵ da LEDGF-IBD (cadeia C) está projetada dentro de uma região altamente hidrofóbica, formada pelos resíduos do domínio integrase-CCD Thr¹⁷⁴ e Met¹⁷⁸ da cadeia A e Leu¹⁰², Ala¹²⁸, Ala¹²⁹ e Trp¹³² da cadeia B. Os resíduos Phe⁴⁰⁶ e Val⁴⁰⁸ do domínio LEDGF-IBD realizam contatos hidrofóbicos com o Trp¹³¹ da cadeia B da integrase-CCD. Um importante contato polar se dá entre a cadeia lateral do resíduo Asp³⁶⁶ (LEDGF-IBD) com os nitrogênios da cadeia principal dos resíduos Glu¹⁷⁰ e His¹⁷¹, da cadeia B da integrase-CCD. Foi mostrado em [2] que os mutantes Asp³⁶⁶Ala

e Asp³⁶⁶Asn da região LEDGF-IBD não se ligavam ao domínio CCD da integrase, sugerindo que esse contato polar é essencial para o reconhecimento molecular. Supostamente, essas interações neutralizam a carga negativa do grupamento ácido carboxílico do resíduo Asp³⁶⁶, quando em um ambiente extremamente hidrofóbico. Outro contato polar, essencial, é observado entre o nitrogênio do grupamento amida do resíduo Ile³⁶⁵ (LEDGF-IBD) e o oxigênio da carbonila do resíduo Gln¹⁶⁸ (integrase-IBD, cadeia B).

Uma ponte salina é observada entre os resíduos Lys³⁶⁴ (LEDGF-IBD) e Glu¹⁷⁰ (integrase-IBD, cadeia A). A mutação Lys³⁶⁴Ala não diminui os níveis de interação entre as duas moléculas, sugerindo que esta interação não contribui de maneira significativa para o reconhecimento e manutenção dos contatos inter-moleculares.

Ainda mais, três moléculas de água estão presentes dentro da interface de interação entre integrase-CCD e LEDGF-IBD, sendo que uma delas faz pontes de hidrogênio com as carbonilas dos resíduos Ile³⁶⁵ (LEDGF-IBD) e Thr¹²⁵ (integrase-CCD, cadeia B).

Embora a região CCD tenha se mostrado suficiente para a interação com LEDGF [5], a mutação His¹²Asn na porção N-terminal (NTD) ou deleção do domínio de ligação a Zn²⁺ resultaram em níveis reduzidos de afinidade [5], sugerindo que NTD também contribui para interação com LEDGF.

Bases estruturais para o reconhecimento molecular entre HIV-1 Integrase e LEDGF

As extensivas interações hidrofóbicas e uma rede de pontes de hidrogênio observadas na interface de contato entre LEDGF-IBD:integrase-CCD explicam dois pontos essenciais para o reconhecimento molecular: (i) a conformação específica adotada pela cadeia principal dos resíduos 168-171, presentes no *loop* conector entre as hélices $\alpha 4$ e $\alpha 5$ e (ii) o bolsão hidrofóbico que acomoda os resíduos Ile³⁶⁵, Phe⁴⁰⁶ e Val⁴⁰⁸ da porção IDB da LEDGF. Essas características podem ainda explicar o fato de LEDGF se ligar a outras integrases lentivirais, como HIV-2 e FEV (vírus da imunodeficiência felina), como mostrado no alinhamento seqüencial da figura 3-3.

Figura 3-3: Análise das seqüências primárias de HIV-1, HIV-2 e FEV IN. Numeração dos resíduos em acordo com HIV-1 IN. Resíduos idênticos estão destacados em vermelho e resíduos com características semelhantes são destacados em amarelo. As setas indicam resíduos que realizam contatos com LEDGF através da cadeia lateral e os retângulos azuis indicam aqueles cujos contatos são realizados através da cadeia principal.

Outros trabalhos [2, 7, 8] reportam que os mutantes da HIV-1 integrase, como Val¹⁶⁵Ala, Arg¹⁶⁶Ala, Gln¹⁶⁸Ala, Gln¹⁶⁸Leu e Leu¹⁷²Ala/Lys¹⁷³Ala, falham em ligar LEDGF. Embora nenhum destes resíduos interaja diretamente com a região IBD da LEDGF na estrutura cristalográfica, pode se dizer que tais mutações perturbam a conformação do *loop* conector α4/α5. Por exemplo, Arg¹⁶⁶ forma uma ponte salina intramolecular com Glu⁶⁹, enquanto que a cadeia lateral do resíduo Gln¹⁶⁸ realiza ponte de hidrogênio com Trp¹³² do outro monômero, através da interface dimérica da porção CCD. Portanto, tais resíduos são esperados como sendo importantes para a integridade estrutural do conector α4/α5. Por outro lado, Val¹⁶⁵ e Leu¹⁷² encontram-se enterrados em uma porção hidrofóbica do CCD, e a mutação destes por alanina poderia comprometer a integridade da estrutura local.

Tipicamente, a formação de complexos protéicos não requer grandes mudanças estruturais das proteínas interagentes [8]. Em acordo, a ligação com LEDGF não altera de maneira significativa a conformação da porção CCD da integrase, quando comparada com a estrutura na ausência de ligantes (PDBID 1BL3, [9]), como mostrado na figura 3.4. A única grande mudança observada na formação do complexo é a rotação da cadeia lateral do Trp¹³¹. Em outras estruturas da região CCD na forma nativa [3, 10], tal resíduo está envolvido em contatos cristalinos, e sua orientação varia de cristal para cristal.

Figura 3- 4: Detalhes da interface de contato entre as duas cadeias de HIV-1 IN-CCD. Pequenas diferenças conformacionais, basicamente em cadeias laterais, são observadas na interface de contato de IN-CCD entre as estruturas cristalográficas dessa sozinha (azul ciano) e em complexo com LEDGF-IBD (amarelo e roxo).

Já a conformação do conector $\alpha 4/\alpha 5$ é preservada em todas as estruturas da HIV-1 integrase disponíveis, bem como na estrutura do mesmo domínio do vírus da imunodeficiência em símios (SIV, PDBID 1C6V) [10]. No geral a conformação adotada pela interface do complexo com LEDGF-IBD é conservada ao longo de outras estruturas.

Em contraste, as estruturas cristalográficas da integrase de *Rous sarcoma* vírus (RSV) [11, 12], que não se liga a LEDGF e possui um *loop* estendido de sete resíduos (resíduos 176-182) conectando $\alpha 4$ e $\alpha 5$, em uma conformação que impediria a aproximação de LEDGF no sítio aqui descrito. Vários resíduos hidrofóbicos presentes nessa região ocupam o sítio equivalente de ligação entre HIV-1 CCD e LEDGF-IBD. A conformação do *loop* em RSV é sempre preservada nas duas estruturas cristalográficas, sendo que este é formado por resíduos que apresentam fator de temperatura dentro ou abaixo da média dos modelos, sugerindo que essa possa ser a conformação adotada para a proteína em solução (figura 3.5), desfavorecendo a interação com LEDGF.

Figura 3- 5: Diferenças na interface de dimerização entre HIV-1 IN e RSV IN. RSV é conhecida por não se ligar a LEDGF. A diferença no tamanho e na conformação do loop que conecta $\alpha 4$ e $\alpha 5$ pode dar pistas sobre essa falta de afinidade.

Implicações da função da HIV-1 IN no desenho de inibidores específicos para a interface de formação do complexo

É sabido que LEDGF aumenta a atividade enzimática, a solubilidade e a capacidade de ligação ao DNA da HIV-1 IN [13-15]. Também, a interação com LEDGF é essencial para a associação de integrase expressa heterológamente com a cromatina [5, 16] e para a estabilidade da proteína viral em células humanas [5, 17].

Além do mais, mutações na região conectora $\alpha 4/\alpha 5$ abolem a interação com LEDGF, resultando em uma replicação viral desordenada [2, 7, 18, 19]. Interessantemente, tais mutantes preservam a atividade enzimática da HIV-1 IN *in vitro* [7, 18, 19].

Embora a estrutura cristalográfica apresentada neste trabalho explique porque tais mutações causam a perda da afinidade entre os parceiros, não se pode afirmar nada sobre as deficiências na processo de replicação observada para os mutantes. Uma hipótese seria a de que LEDGF é essencial para a replicação viral [7]. Contudo, em experimentos de RNA de interferência em LEDGF endógena não se observa uma redução concomitante na replicação viral [24].

Alternativamente, o sítio de ligação à LEDF em HIV-1 IN poderia mediar outras interações proteína:proteína durante a infecção viral, tal como interações entre protômeros da IN, em complexos de mais alta ordem.

Apesar de ainda faltarem peças neste quebra-cabeça, não se pode descartar o fato de que mutações no conector $\alpha 4/\alpha 5$ têm profundas implicações negativas sobre o processo de replicação viral. Dessa maneira, uma maneira alternativa de se inibir a integrase poderia ser o desenho de pequenas moléculas que se liguem especificamente no bolsão de interação com LEGDF-IBD, perturbando a interação entre estas.

O sítio alvo contém porções altamente hidrofóbicas, bem como polares, sujeitos a realização de pontes de hidrogênio e/ou pontes salinas (figura 3.2). Também, poderiam se explorar inibidores que substituam e desloquem as moléculas de água presentes na interface. Devido ao fato de que LEDGF pode se ligar a IN completa (NTD + CCD + CTD) mesmo quando esta está ligada ao seu substrato de DNA [20], pode-se especular que o sítio de interação entre essas duas proteínas possa estar disponível para interações com inibidores, até mesmo nos passos iniciais da replicação viral.

Referências do capítulo

1. Maertens, G., Cherepanov, P., Pluymers, W., Busschots, K., De Clercq, E., Debyser, Z. e Engelborghs, Y. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 33528 – 33539
2. Cherepanov, P., Sun, Z. Y., Rahman, S., Maertens, G., Wagner, G. e Engelman, A. (2005) *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**, 526 – 532
3. Dyda, F., Hickman, A. B., Jenkins, T. M., Engelman, A., Craigie, R. e Davies, D. R. (1994) *Science* **266**, 1981 – 1986
4. Wang, J. Y., Ling, H., Yang, W. e Craigie, R. (2001) *EMBO J.* **20**, 7333 – 7343
5. Maertens, G., Cherepanov, P., Pluymers, W., Busschots, K., De Clercq, E., Debyser, Z. & Engelborghs, Y. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 33528 – 33539
6. Turlure, F., Devroe, E., Silver, P. A. & Engelman, A. (2004) *Front. Biosci.* **9**, 3187 – 3208
7. Emiliani, S., Mousnier, A., Busschots, K., Maroun, M., Van Maele, B., Tempe, D., Vandekerckhove, L., Moisan, F., Ben-Slama, L., Witvrouw, M., *et al.* (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 25517 – 25523
8. Lo Conte, L., Chothia, C. & Janin, J. (1999) *J. Mol. Biol.* **285**, 2177 – 2198
9. Maignan, S., Guilloteau, J.P., Zhou-Liu, Q., Clement-Mella, C., Mikol, V. (1998) *J. Mol. Biol.* **282**, 359 – 368
10. Chen, Z., Yan, Y., Munshi, S., Li, Y., Zugay-Murphy, J., Xu, B., Witmer, M., Felock, P., Wolfe, A., Sardana, V., *et al.* (2000) *J. Mol. Biol.* **296**, 521 – 533
11. Lubkowski, J., Dauter, Z., Yang, F., Alexandratos, J., Merkel, G., Skalka, A. M. e Wlodawer, A. (1999) *Biochemistry* **38**, 13512 – 13522
12. Yang, Z. N., Mueser, T. C., Bushman, F. D. e Hyde, C. C. (2000) *J. Mol. Biol.* **296**, 535 – 548
13. Cherepanov, P., Maertens, G., Proost, P., Devreese, B., Van Beeumen, J., Engelborghs, Y., De Clercq, E. e Debyser, Z. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 372 – 381

14. Busschots, K., Vercammen, J., Emiliani, S., Benarous, R., Engelborghs, Y., Christ, F. e Debyser, Z. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 17841 – 17847
15. Cherepanov, P., Devroe, E., Silver, P.A. e Engelman, A. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 48883 – 48892
16. Llano, M., Vanegas, M., Fregoso, O., Saenz, D., Chung, S., Peretz, M. e Poeschla, E.M. (2004) *J. Virol.* **78**, 9524 – 9537
17. Llano, M., Delgado, S., Vanegas, M. e Poeschla, E.M. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 55570 – 55577
18. Bouyac-Bertoia, M., Dvorin, J.D., Fouchier, R.A., Jenkins, Y., Meyer, B.E., Wu, L.I., Emerman, M. e Malim, M.H. (2001) *Mol. Cell* **7**, 1025 – 1035
19. Lu, R., Limon, A., Devroe, E., Silver, P.A., Cherepanov, P. e Engelman, A. (2004) *J. Virol.* **78**, 12735 – 12746
20. Cherepanov, P., Devroe, E., Silver, P.A. e Engelman, A. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 48883 – 48892

APÊNDICES

ADDRESSING REVIEWER COMMENTS

BAD REVIEWS ON YOUR PAPER? FOLLOW THESE GUIDELINES AND YOU MAY YET GET IT PAST THE EDITOR:

Reviewer comment:
"The method/device/paradigm the authors propose is clearly wrong."

How NOT to respond:
✗ "Yes, we know. We thought we could still get a paper out of it. Sorry."

Correct response:
✓ "The reviewer raises an interesting concern. However, as the focus of this work is exploratory and not-performance based, validation was not found to be as critical importance to the contribution of the paper."

Reviewer comment:
"The authors failed to reference the work of Smith et al., who solved the same problem 20 years ago."

How NOT to respond:
✗ "Huh. We didn't think anybody had read that. Actually, their solution is better than ours."

Correct response:
✓ "The reviewer raises an interesting concern. However, our work is based on completely different first principles (we used different variable names), and has a much more attractive graphical user interface."

Reviewer comment:
"This paper is poorly written and scientifically unsound. I do not recommend it for publication."

How NOT to respond:
✗ "You #@% reviewer! I know who you are! I'm gonna get you when it is my turn to review."

Correct response:
✓ "The reviewer raises an interesting concern. However, we feel the reviewer did not fully comprehend the scope of the work, and misjudged the results based on incorrect assumptions."

www.phdcomics.com

JORGEL CUMY © 2005

I. Outros trabalhos realizados durante o período de doutoramento

① Sir2

(Fevereiro a Junho - 2005)
Expressão, purificação e cristalização de regiões solúveis da proteína Sir2 (*Silent information regulator-2*), de *Saccharomyces cerevisiae*, em colaboração com os Doutores Brian Hall e Tom Ellenberger (Biological Chemistry and Molecular Pharmacology, Harvard Medical School, Boston - EUA).

② Pfk-2

(Fevereiro a Março - 2006)
Resolução da primeira estrutura da Pfk-2 (*Phosphofrutokinase-2*), de *E. coli*, a 2,0 Å. Colaboração com os Doutores Ricardo Cabrera, Andrés Caniuguir e Jorge Babul (Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago - Chile).