UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

Estudos estruturais dos receptores
nucleares humanos dos hormônios
tireoidianos isoforma $\beta 1$ (hTR $\beta 1$) e do
ácido retinóico 9-*cis* isoforma α (hRXR α)

Sandra Martha Gomes Dias

Tese apresentada ao Instituto de
Física de São Carlos, da
Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Doutor em
Ciências na área de concentração:
Física Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Igor Polikarpov

São Carlos – 2004

Dias, Sandra Martha Gomes

“Estudos estruturais dos receptores nucleares humanos dos hormônios tireoidianos isoforma $\beta 1$ (hTR $\beta 1$) e do ácido retinóico 9-*cis* isoforma α (hRXR α)”

Sandra Martha Gomes Dias – São Carlos, 2004

Tese (Doutorado) – Área de Física Aplicada da Universidade de São Paulo, São Carlos

2004 - Páginas: 284

Orientador: Prof. Dr. Igor Polikarpov

1. Receptores Nucleares. 2. TR. 3. RXR. 4. Cristalografia. 3. SAXS.

I. Título

“After a year's research, one realises that it could have been done in a week.”
William Henry Bragg, em *Fifty years of X-ray diffraction*, 1962

.....

*Em memória de minha mãe,
Exemplo de força e luta,
Ao meu pai e meus irmãos,
Apoio e incentivo de todos os momentos*

*Ao André (xuxu),
Companheiro, amigo, amor*

*Aos meus amigos que a vida distanciou,
Àqueles os quais o tempo ainda não levou
Aos que virão*

Agradeço também....

À Adriana “Rolhas”, pela especial amizade e apoio em todas as circunstâncias da minha vida nas quais ela esteve presente.

Ao Mauro Sanches, Sandra Krauchenco, Ronaldo, Aparício, Lee, Adriana Alves, Valéria, Katucha, Basílio, Brandão, Vanessa, Paula, Gustavo, e todos os ex-componentes do nunca extinto grupo CPR. Amigos queridos essenciais para minha formação pessoal e científica. Obrigada pelas lições de senso crítico.

À aluna de iniciação científica Ana Carolina pela oportunidade de aprender a ensinar; pelo apoio na execução do trabalho. Ao amigo João, pela disposição em ajudar a qualquer momento.

Aos meus professores de toda uma vida. Aos que me deram mais do que lições de classe. Ao meu orientador, Igor Polikarpov, pela liberdade de trabalho e idéias.

Aos colaboradores do projeto, pertencentes aos grupos do Prof. John Baxter (Universidade da Califórnia/São Francisco, EUA) e dos Profs. Chico e Luiz (Universidade de Brasília).

Em memória do Prof. Ralff, grande cientista, exemplo de pesquisa nacional de alta qualidade.

À banca examinadora, pelas críticas, discussões e contribuições para este trabalho.

À FAPESP pelo auxílio financeiro essencial para execução deste projeto (processos números 00/00021-8 e 99/03387-4).

Ao LNLS, pelo tempo em que lá estive, pelos momentos em que fui usuária.

*A todos os componentes do grupo de Cristalografia do Instituto de Física da USP/SC.
Amigos, colegas e colaboradores que tenham, de forma direta ou indireta, contribuído
para a elaboração deste trabalho.*

*Aos que sabem que para cruzar o Borjador...
É preciso ir além da dor.*

E aos que amam a ciência com o coração de um criador

.....

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO GERAL: RECEPTORES NUCLEARES¹

1.1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	1
1.1.1. SINALIZAÇÃO CELULAR	1
1.1.2. A SUPERFAMÍLIA DOS RECEPTORES NUCLEARES	3
1.1.3. ESTRUTURA GERAL DOS RECEPTORES NUCLEARES	5
1.1.4. O MECANISMO DE AÇÃO DOS RECEPTORES NUCLEARES	7
1.1.5. DETALHES SOBRE A LIGAÇÃO AO DNA	11
1.1.6. A ESTRUTURA DO DOMÍNIO DE LIGAÇÃO AO LIGANTE	14
1.1.7. A ESTRUTURA DO DOMÍNIO DE LIGAÇÃO AO DNA	21
1.1.8. POTENCIAL FARMACOLÓGICO	26
1.2. OBJETIVOS	31
1.2.1. Expressão heteróloga, purificação, e estudos estruturais em solução e cristalográficos da porção DBD-LBD (desprovido da região A/B) dos receptores humanos dos hormônios tireoidianos isoforma $\beta 1$ (hTR $\beta 1$ DBD-LBD) e do ácido retinóico 9- <i>cis</i> isoforma α (hRXR α DBD-LBD)	31
1.2.2. Cristalização do domínio LBD de hTR $\beta 1$ com hormônios naturais e com um tiromimético β -seletivo	33

CAPÍTULO 2 - DETERMINAÇÃO POR SAXS DO ENVELOPE DO RECEPTOR hRXR α DBD-LBD

2.1. INTRODUÇÃO	34
2.1.1. OS RECEPTORES DO ÁCIDO RETINÓICO 9- <i>cis</i>	34
2.1.1.1. Caracterização e Expressão Diferencial das Isoformas	34
2.1.1.2. Os Elementos de Resposta ao 9- <i>cis</i> e a Ação dos RXRs	35
2.1.1.3. A Capacidade de Tetramerização do RXR α	41
2.2. METODOLOGIA	50
2.2.1. CRISTALIZAÇÃO DE MACROMOLÉCULAS	50
2.2.2. ESPALHAMENTO DE RAIOS X A BAIXOS ÂNGULOS	54
2.2.2.1. Breve Teoria	54
2.2.2.2. Determinação <i>ab initio</i> do Envelope Estrutural de Macromoléculas Biológicas	59
2.2.2.3. Modelagem de Movimentos de Domínios Utilizando Dados de SAXS	60
2.3. RESULTADOS	63
2.3.1. ENSAIOS DE CRISTALIZAÇÃO	63
2.3.2. DETERMINAÇÃO DOS ENVELOPES POR SAXS DO DÍMERO E TETRÂMERO DE hRXR α DBD-LBD	63

CAPÍTULO 3 – ESTUDOS EM SOLUÇÃO DO RECEPTOR hTR β 1 DBD-LBD E DETERMINAÇÃO DE SEU ENVELOPE POR SAXS

3.1. INTRODUÇÃO.....	64
3.1.1. OS RECEPTORES DOS HORMÔNIOS TIREOIDIANOS.....	64
3.1.1.1. Caracterização e Expressão Diferencial das Isoformas	64
3.1.1.2. Localização Celular	68
3.1.1.3. Os Elementos de Resposta aos Hormônios Tireoidianos e a Ação dos TRs.....	70
3.1.1.3.1. Mecanismo de Repressão Transcricional Dependente de Ligante	76
3.1.1.3.2. Mecanismo de Ativação Transcricional Dependente de Ligante	79
3.1.1.3.3. Interação da H12 com o Sítio de Coativador: Mecanismo de Repressão na Ausência de Ligante Comum aos Receptores Nucleares?	83
3.2. METODOLOGIA	91
3.2.1. OBTENÇÃO DOS CLONES	91
3.2.2. TRANSFORMAÇÃO DE <i>E. coli</i>	91
3.2.2.1. Preparação de Células Competentes	91
3.2.2.2. Transformação de Bactérias.....	92
3.2.3. EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS	93
3.2.3.1. Expressão do TR DBD-LBD (Selvagem e Mutantes)	93
3.2.3.2. Expressão do TR LBD (Selvagem e Mutantes).....	94
3.2.4. PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA TR DBD-LBD (SELVAGEM E MUTANTES).....	95
3.2.4.1. Purificação por Afinidade.....	95
3.2.4.2. Purificação por Interação Hidrofóbica.....	96
3.2.4.3. Purificação por Exclusão Molecular.....	96
3.2.5. PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA TR LBD (SELVAGEM E MUTANTES).....	97
3.2.5.1. Purificação por Afinidade.....	97
3.2.5.2. Purificação por Interação Hidrofóbica.....	98
3.2.5.3. Purificação por Exclusão Molecular.....	98
3.2.6. ENSAIOS DE ATIVIDADE.....	99
3.2.6.1. Marcação Radioativa dos TRES.....	99
3.2.6.2. <i>Gel Shift</i>	100
3.2.7. ESTUDOS DE OLIGOMERIZAÇÃO EM SOLUÇÃO	101
3.2.7.1. Eletroforese em Condições Não Desnaturantes	101
3.2.7.2. <i>Crosslinking</i> Químico	103
3.2.7.3. Gel Filtração Analítica.....	104
3.2.7.4. Espalhamento de Luz Dinâmico	106
3.2.8. ESPALHAMENTO DE RAIOS X A BAIXOS ÂNGULOS	109
3.2.9. CRISTALIZAÇÃO DE MACROMOLÉCULAS	109
3.3. RESULTADOS.....	111
3.3.1. PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS.....	111
3.3.1.1. Receptor Tireoidiano	111
3.3.1.2. Heterodímero TR DBD-LBD (T3) / <i>apo</i> -RXR DBD-LBD	112
3.3.1.3. Complexos Proteína-DNA.....	114
3.3.2. ESTUDOS FUNCIONAIS	117
3.3.3. ESTUDOS DE OLIGOMERIZAÇÃO EM SOLUÇÃO DAS PROTEÍNAS SELVAGENS	118
3.3.3.1. Eletroforese em Condições não Desnaturantes	119
3.3.3.1.1. TR DBD-LBD.....	119
3.3.3.1.2. TR LBD	121
3.3.3.2. <i>Crosslinking</i> Químico	122
3.3.3.3. Gel Filtração Analítica.....	123
3.3.3.3.1. TR DBD-LBD.....	123

3.3.3.2. TR LBD	125
3.3.3.4. Espalhamento de Luz Dinâmico	128
3.3.3.4.1. TR DBD-LBD	129
3.3.3.4.2. TR LBD	131
3.3.4. ESTUDOS DE OLIGOMERIZAÇÃO EM SOLUÇÃO DAS PROTEÍNAS MUTANTES	133
3.3.4.1. Superfície de Dimerização	134
3.3.4.2. Superfície de Tetramerização	137
3.3.5. ESTUDOS DE SAXS	140
3.3.5.1. Metodologia	140
3.3.5.2. Resultados	142
3.3.6. ENSAIOS DE CRISTALIZAÇÃO	148
3.3.6.1. Ensaios sem DNA	148
3.3.6.2. Ensaios com DNA	156
3.3.6.2.1. Complexo TR/TR + F2	156
3.3.6.2.2. Complexo TR/RXR + DR4	157
3.4. DISCUSSÃO	159
3.4.1. hTR β 1 FORMA DÍMERO E TETRÂMERO EM SOLUÇÃO	159
3.4.2. SIGNIFICADO FUNCIONAL DA TETRAMERIZAÇÃO	164
3.4.3. AS DIFICULDADES NA CRISTALIZAÇÃO DO RECEPTOR NUCLEAR TR β 1	166
3.5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	168

CAPÍTULO 4 - CRISTALIZAÇÃO E RESOLUÇÃO DA ESTRUTURA DO DOMÍNIO LBD DE hTR β 1 COMPLEXADO COM LIGANTES

4.1. INTRODUÇÃO	171
4.1.1. OS HORMÔNIOS TIREOIDIANOS NATURAIS	171
4.1.2. A BUSCA POR AGONISTAS TIROMIMÉTICOS SELETIVOS	176
4.2. METODOLOGIA	182
4.2.1. EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DO TR LBD	182
4.2.2. PURIFICAÇÃO DO HETERODÍMERO TR LBD (T3) / APO-RXR LBD	182
4.2.2.1. Expressão e Purificação do RXR LBD	182
4.2.2.2. Purificação do Heterodímero	183
4.2.3. CRISTALIZAÇÃO DE MACROMOLÉCULAS	183
4.2.3.1. TR LBD com T3, Triac e GC-1	184
4.2.3.2. TR LBD (T3) / apo-RXR LBD	185
4.2.3.3. apo-TR LBD	186
4.2.4. COLETA E PROCESSAMENTO DE DADOS DE DIFRAÇÃO DE RAIOS X	188
4.2.5. OBTENÇÃO DAS FASES E REFINAMENTO DAS ESTRUTURAS CRISTALOGRAFICAS	192
4.3. RESULTADOS	195
4.3.1. PURIFICAÇÃO DO HETERODÍMERO TR LBD (T3) / APO-RXR LBD	195
4.3.2. ENSAIOS DE CRISTALIZAÇÃO	197
4.3.2.1. Cristalização dos Complexos TR LBD com T3, Triac e GC-1	197
4.3.2.2. Ensaios de Cristalização do Heterodímero TR LBD (T3) /apo-RXR LBD e do apo-TR LBD	199

4.3.3. COLETA E PROCESSAMENTO DOS DADOS DE DIFRAÇÃO DE RAIOS X, OBTENÇÃO DAS FASES E REFINAMENTO DAS ESTRUTURAS.....	200
4.3.3.1. Análise dos Contatos Cristalinos	203
4.3. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	207
ANEXO 1.....	209
ANEXO 2.....	210
ANEXO 3.....	211
ANEXO 4.....	212

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comparação sequencial entre a hélice AF-2 (pertencente à H12) de receptores nucleares com a sequência responsável por promediar a ligação dos CoAs aos receptores nucleares (RID, <i>Nuclear Receptor Interacting Domain</i>). Está delineada a região central de resíduos hidrofóbicos que se liga à superfície formada pelas hélices H3, H4, H5 e, no caso dos CoAs, a H12.	88
Tabela 2. Condições empregadas para eletroforese em condições não desnaturantes no equipamento Phast System (Amersham-Bioscience).....	102
Tabela 3. ¹ Raio hidrodinâmico (<i>Rh</i>) expresso $\pm$ desvio padrão (SD) das medidas. ^{2, 3, 4} Porcentagens de monômero, dímero e tetrâmero, calculadas pelo programa Dynamics 5.26.60 (Protein Solutions) a partir da média de <i>Rh</i> obtida.	130
Tabela 4. ¹ Raio hidrodinâmico (<i>Rh</i>) expresso $\pm$ desvio padrão (SD) das medidas. ^{2, 3, 4} Porcentagens de monômero, dímero e tetrâmero, calculadas pelo programa Dynamics 5.26.60 (Protein Solutions) a partir da média de <i>Rh</i> obtida.	132
Tabela 5. Parâmetros estruturais do dímero e tetrâmero de TR.....	147
Tabela 6. Detalhes sobre os diversos ensaios realizados para tentativa de cristalização do receptor TR DBD-LBD.....	155
Tabela 7. Parâmetros e valores finais do processamento dos dados coletados para os cristais dos complexos TR LBD + T3, TR LBD + GC-1 e TR LBD + Triac, além dos dados referentes ao refinamento das estruturas.	202

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da organização estrutural e funcional dos receptores nucleares.	7
Figura 2. Modelo proposto de associação dos receptores nucleares com os complexos corepressor e coativador.	8
Figura 3. Com a ligação do ligante, os receptores nucleares recrutam diferentes complexos coativadores.	9
Figura 4. Vias de sinalização reguladoras da ação genômica dos receptores nucleares (NR).	10
Figura 5. Elementos de resposta a receptores nucleares.	13
Figura 6. A comparação entre as estruturas cristalográficas do domínio LBD do receptor RXR α sem ligante (<i>apo</i>) (PDB ID 1lbd) e do RAR γ com ligante (<i>holo</i>) (PDB ID 2lbd) revela as mudanças conformacionais induzidas pelo ligante, responsáveis por gerar a forma transcricionalmente ativa destes receptores nucleares. A estrutura terciária do LBD do RAR γ na forma <i>holo</i> é muito similar à estrutura do LBD <i>holo</i> do receptor RXR α (dados não mostrados), por este motivo a estrutura do RAR foi empregada nesta comparação.	16
Figura 7. Superposição das estruturas cristalográficas do LBD de PXR sem ligante (em vermelho) ²³ e do complexo ternário LBD/agonista (em cinza)/peptídeo de SRC-1 (em azul) (o agonista foi omitido) ⁶⁰ , feita pelo programa SUPCOMB.	18
Figura 8. Ilustração esquemática e estrutura de RMN do domínio de ligação ao DNA do receptor hRXR α	22
Figura 9. Estrutura cristalográfica do homodímero do DBD de hRXR α associado ao elemento responsivo DR1 ⁴⁴ . Apontado por seta está a hélice 3, a qual apresenta-se parcialmente desenovelada em relação à estrutura observada por RMN deste domínio em solução (Figura 8B e ⁴¹).	23
Figura 10. Estruturas tridimensionais de três protótipos DBDs associados a seus respectivos HREs, obtidos por cristalografia de proteínas.	24
Figura 11. Mecanismo proposto para repressão transcricional exercida pelo heterodímero TR/RXR ⁸¹	38

Figura 12. Estrutura cristalográfica e proposta através de dados de SAXS do tetrâmero do LBD de RXR.....	44
Figura 13. (A) Interação H3/H3 entre os monômeros B1 e B2. (B) Interação H11/H11 entre os monômeros B1 e B2. (C) Interação AF2/sítio de ligação do coativador entre os monômeros B1 e B2.	46
Figura 14. Método da gota suspensa para a cristalização de proteínas.....	53
Figura 15. Função de distribuição de distâncias.	57
Figura 16. Diversas macromoléculas e suas respectivas funções de distribuição de distâncias.....	58
Figura 17. Comparação das homologias de aminoácido e das propriedades funcionais entre as diversas isoformas do receptor TR de rato.	68
Figura 18. Modelo para a interação do heterodímero TR/RXR e do homodímero TR/TR aos seus TREs de maior afinidade.	74
Figura 19. Modelo em dois passos da regulação negativa do gene TSH pelo ligante T3.	78
Figura 20. Modelo de ativação da transcrição gênica via elementos responsivos ao T3 (TREs) de resposta positiva à presença do ligante. TRE (<i>Thyroid Response Element</i>), CoRs (correpressores) e CoAs (coativadores).....	80
Figura 21. Contato da H12 com o sítio de ligação de coativadores entre homodímeros de PPAR γ relacionados por simetria cristalográfica.....	85
Figura 22. A Comparação entre as estruturas do complexo ternário ER α LBD/agonista/GRIP1 BoxII (A) e do complexo ER α LBD/antagonista (B) revela que, no complexo contendo o antagonista, a H12 (que possui uma sequência LXXML parecida com a sequência LXXLL de interação dos CoAs com receptor nuclear) mimetiza a hélice do coativador (em amarelo) ²¹⁶	87
Figura 23. Comparação entre as seqüências primárias dos LBDs dos receptores <i>holo</i> -hTR β 1 e <i>apo</i> -hRXR α feita pelo programa ClustalW v1.82.	89
Figura 24. SDS-PAGE corado com Comassie Blue de <i>pools</i> de frações de processos de purificação contendo a proteína TR DBD-LBD e TR LBD.	112
Figura 25. (A) Cromatogramas superpostos mostrando perfis de eluição da proteína TR DBD-LBD ligada ao T3 (linha azul), da proteína <i>apo</i> -RXR DBD-LBD (linha	

verde) e do complexo TR (T3) + <i>apo</i> -RXR (linha vermelha) da coluna de gel filtração Superdex 75 HR 10/30.....	113
Figura 26. <i>Native</i> - PAGE (gradiente linear 8-25%) do heterodímero TR/RXR sem DNA (TR/RXR) a 1.4mg/ml, TR/RXR ligado à DR4 (TR/RXR+DR4) a 0.5mg/ml, corado com Coomassie Blue ou com Brometo de Etídeo. M = marcadores de peso molecular, Tireoglobulina (<i>Rh</i> 8.5nm), Ferritina (440kDa, <i>Rh</i> 6.5nm), Catalase (<i>Rh</i> 5.22nm), Lactato Desidrogenase (<i>Rh</i> 4.3nm) e Albumina (<i>Rh</i> 3.55nm).....	115
Figura 27. Ensaios de <i>Gel Shift</i> do receptor TR DBD-LBD com os elementos responsivos F2 e DR4.	118
Figura 28. Eletroforese do TR DBD-LBD sob condições não desnaturantes em géis de gradiente 8-25% no sistema <i>PhastSystem</i> , pH8.8, 6°C e corados com prata.....	120
Figura 29. Eletroforese do TR LBD sob condições não desnaturantes em géis de gradiente 8-25% no sistema <i>PhastSystem</i> , pH8.8, 6°C e corados Coomassie.	121
Figura 30. Crosslinking químico de TR DBD-LBD sem ligante (A) e ligado ao T3 (B); TR LBD sem T3 (C) e com T3 (D).....	123
Figura 31. Experimento de gel filtração analítica da proteína TR DBD-LBD.	124
Figura 32. Experimento de gel filtração analítica da proteína TR LBD.	126
Figura 33. Gráfico indicando relação do raio hidrodinâmico ($\pm$ SD) medido pela técnica de <i>Dynamic Light Scattering</i> (DynaPro -Protein Solutions) com a concentração da proteína TR DBD-LBD na ausência (pontos azuis) e presença de ligante (pontos vermelhos). As linhas pontilhadas pretas indicam um ajuste sigmoidal feito para os dados pelo Origin Pro v7.0.	130
Figura 34. Gráfico indicando relação do raio hidrodinâmico ($\pm$ SD) medido pela técnica de <i>Dynamic Light Scattering</i> (DynaPro -Protein Solutions) com a concentração da proteína TR LBD na ausência (pontos azuis) e presença de ligante (pontos vermelhos). As linhas pontilhadas pretas indicam um ajuste sigmoidal feito para os dados pelo Origin Pro v7.0.	131
Figura 35. Estrutura do LBD de hTR β 1 (PDB ID 1BSX) evidenciando os aminoácidos importantes para heterodimerização TR-RXR em solução (resíduos E393 e L400 na H10, em verde, e P419, L422, M423, T426, e M430 na H11, em azul), sendo alguns destes também importante para homodimerização do TR em F2 e DR4 (L400, L422 e M423) ¹⁸⁹	135
Figura 36. Gráfico indicando relação do raio hidrodinâmico medido ($\pm$ SD) pela técnica de <i>Dynamic Light Scattering</i> (DynaPro -Protein Solutions) com a concentração do receptor.....	136

Figura 37. Mapa topográfico do LBD de TR (PDB ID 1BSX).	138
Figura 38. Gráfico indicando relação do raio hidrodinâmico medido ($\pm$ SD) pela técnica de <i>Dynamic Light Scattering</i> (DynaPro -Protein Solutions) com a concentração do receptor.....	139
Figura 39. Curvas experimentais de espalhamento do TR dimérico (A) e tetramérico (B) (1), curvas de espalhamento do envelope após modificação para o espalhamento da estrutura interna (2), espalhamento calculado dos modelos de <i>dummy</i> (3), espalhamento calculado dos modelos de PDBs combinados (4).	144
Figura 40. Função de distribuição de distâncias do dímero e tetrâmero de TR β DBD-LBD.....	144
Figura 41. Sobreposição da média de modelos de <i>dummy</i> com os modelos cristalográficos combinados do dímero (A, 20 modelos) e tetrâmero (B, 40 modelos) de TR DBD-LBD. Da esquerda pra direita tem-se uma rotação de 90° no eixo y e, em seguida, uma de 90° no eixo x.	145
Figura 42. Sequência de oligonucleotídeos correspondente aos TREs usados nos ensaios de cristalização.....	157
Figura 43. Modelo proposto para a tetramerização do LBD de TR.....	162
Figura 44. Estrutura dos hormônios tireoidianos T3 e T4. Os iodios estão em roxo, carbonos em verde, e oxigênios em vermelho.	172
Figura 45. Estrutura do hormônio tireoidiano Triac. Os iodios estão em roxo, carbonos em verde, e oxigênios em vermelho.....	174
Figura 46. Estrutura do ligante agonista tiromimético GC-1. Os carbonos estão representados em verde e os oxigênios em vermelho.	178
Figura 47. Purificação do heterodímero TR LBD (T3) / <i>apo</i> -RXR LBD.....	195
Figura 48. Fotos de alguns cristais obtidos dos complexos hTR β LBD com T3, GC-1 e Triac (da esquerda para direita) juntamente com as condições que os geraram. ...	199
Figura 49. Ilustrações dos modelos cristalográficos do TR LBD com diferentes ligantes.	202
Figura 50. Contato cristalino entre moléculas de TR LBD cristalizado com o ligante T3 e comparação com a estrutura de TR LBD <i>holo</i> associado com a região NR-box 2 de GRIP1.....	204

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTR - Acetyltransferase
AD – Activation Domain
AF-1 - Activation Function 1
AF-2 - Activation Function 2
CAR - Constitutive Androstane Receptor
CBP/p300 - cAMP Response Element Binding Protein (CREB)-binding Protein
cdk - cell cycle-dependent kinase
CoA - Coactivator
CoR - Corepressor
COUP-TF - Chicken Ovoalbumin Upstream Promoter Transcription Factor
CRBP II - Cellular Retinol-Binding Protein II
CRE - cAMP Response Element
CREB - cAMP Response Element Binding Factor
DBD - DNA Binding Domain
DLS - Dynamic Light Scattering
DR - Dummy Residues
DRIP- Vitamin D Receptor-interacting Protein
DTT - Dithiotreitol
EDTA - Ácido Etilenodiaminotetracético
ER - Estrogen Receptor
ERE - Estrogen Responsive Element
FXR - Farnesoid X Receptor
GR- Glucocorticoid Receptor
GRE - Glucocorticoid Responsive Element
GRIP - Glucocorticoid Receptor Interacting Protein
GRTH - Generalized Resistance to Thyroid Hormone
GST - Glutathione S-Transferase
HAT - Histone Acetyltransferase
HDAC - Histone Deacetylase
HIV - Human Immunodeficiency Virus
HPLC - High-Performance Liquid Chromatography
HRE - Hormone Responsive Element
HSP - Heat Shock Protein
I-box - Identify Box
IMAC - Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography
IPTG - Isopropil- β -D-tiogalactopiranoside
LB - Luria-Bertani
LBD - Ligand Binding Domain
LBP - Ligand-Binding Pocket
LXR - Liver X Receptor
MAPK - Mitogen-activated Protein Kinase
Native PAGE - Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis

NBRE – NGFI-B Response Element
NcoR - Nuclear Corepressor
NGFI-B - Nerve Growth Factor-induced B
NSL - Nuclear Signal Localization
p/CIP - p300/CBP/Cointegrator-associated Protein
PCAF - p300/CBP-associated Factor
PDB - Protein Data Bank
PKA - Protein Kinase A
PMSF - Fenilmetilsulfonil Fluoride
PPAR- Peroxisomal Proliferator-activated Receptor
PR- Progesterone Receptor
PXR- Pregnane X Receptor
RAR - Retinoic Acid Receptor
RID - Nuclear Receptor Interacting Domain
RMN - Ressonância Magnética Nuclear
RXR - Retinoid X Receptor
SAXS - Small Angle X-Ray Scattering
SDS-PAGE - Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SMRT- Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid-Hormone Receptors
SRC-1 - Steroid Receptor Coactivator-1
SWI/SNF - Switch Defective/Sucrose Nonfermenter
TRE - Thyroid Responsive Element
TIF - Transcriptional Intermediary Factor
TR - Thyroid Hormone Receptor
TRAP - TR-associated Protein
TRH - Thyrotropin Releasing Hormone
TSA - Trichostatin A
TSH - Thyroid Stimulating Hormone
VDR - Vitamin D Receptor

RESUMO

Os receptores nucleares são de suma importância para os processos de sinalização intercelular nos eucariotos, uma vez que possuem a capacidade de convergir diferentes sinais internos e externos na regulação de programas genéticos. Estas proteínas funcionam, na sua maioria, como fatores de transcrição ativados por ligantes, sendo a via de comunicação direta entre as moléculas de sinalização e a resposta transcricional eliciada pelas mesmas. A programação genética, estabilizada ou modificada pelos receptores, afeta virtualmente todos os aspectos da vida dos organismos multicelulares, tais como a embriogênese, a homeostase, a reprodução, o crescimento e a morte celular. A regulação transcricional e a seletividade promovida por estas proteínas têm fomentado intensas pesquisas, as quais estão decifrando a complexa rede de eventos moleculares que relatam sua forma de ação. Será um desafio para o futuro o conhecimento completo das regras moleculares que definem sua maneira de promover o controle espacial e temporal da expressão gênica. Estas informações prometem trazer detalhes cruciais para o desenvolvimento de drogas mais eficientes e de grande valor terapêutico. Neste contexto, o principal objetivo dos estudos aqui apresentados foi o de aumentar o conhecimento sobre o comportamento e estrutura do receptor nuclear humano dos hormônios tireoidianos, isoforma $\beta 1$ (hTR $\beta 1$), e do receptor nuclear humano do ácido retinóico 9-*cis*, isoforma α (hRXR α). Para tal, aplicou-se a técnica de espalhamento de raios X a baixos ângulos para determinar-se, em solução, o envelope destes receptores contendo os domínios de ligação ao DNA e ao ligante. Paralelamente, investiu-se em diversas tentativas de cristalização dos mesmos. Os resultados obtidos permitiram a determinação da localização espacial dos diferentes domínios e as organizações quaternárias dos homodímeros e homotetrâmeros. Conseqüentemente, foram propostos os primeiros modelos estruturais de receptores nucleares contendo os domínios de ligação ao DNA e ao ligante. O comportamento oligomérico, em solução, do hTR $\beta 1$ também foi analisado qualitativamente. Verificou-se que a formação do homodímero e do homotetrâmero é influenciada pela presença do hormônio T3, pela concentração protéica, pelos domínios presentes e por mutações específicas. Estes estudos geraram a hipótese de que o receptor nuclear hTR $\beta 1$ é capaz de se autoreprimir. Até então, dentro da superfamília dos receptores nucleares, esta capacidade de autorepressão somente havia sido descrita para o receptor hRXR α . Por fim, cristalizou-se o domínio LBD do receptor hTR $\beta 1$ com os ligantes T3, Triac e GC-1. O objetivo foi o de determinar estruturas cristalográficas importantes para o futuro desenvolvimento de tiromiméticos de ação isoforma-seletiva.

ABSTRACT

In eukaryotes, nuclear receptors are of major importance for intercellular signaling because they join different intra and extracellular signals during regulation of genetic programs. The great majority of these proteins function as ligand activated transcription factors providing a direct link between signaling molecules and the transcriptional responses elicited by them. The genetic programs that these receptors establish or modify affect virtually all aspects of the multicellular organisms' life, such as embryogenesis, homeostasis, reproduction, cell growth, and death. Their gene-regulatory power and selectivity has prompted intense research which is now starting to decipher the complex network of molecular events involved in transcription regulation. The future challenge will be to uncover the molecular rules that define spatial and temporal control of gene expression. Such knowledge would be essential to the development of more efficient drugs with better therapeutic values. Therefore, the main purpose in this study was to extend the understanding on the behavior and the structure of human thyroid receptor, isoform $\beta 1$ (hTR $\beta 1$), and human retinoic acid X receptor, isoform α (hRXR α). It was applied the small angle X-ray scattering technique to determine, in solution, the envelop of both receptors containing DNA and ligand binding domains. Beside this, several crystallization conditions were tried for both receptors. The results made possible to define the spatial localization of the domains and the quaternary structure of the homodimers and homotetramers. Consequently, we were able to propose the first structural models for nuclear receptors containing the DNA and ligand binding domains. The oligomeric behavior of the hTR $\beta 1$, in solution, was also analyzed qualitatively. We verified that it was influenced by the presence of T3 hormone, the protein concentration, the presence of both DNA and ligand binding domains, and by specific mutations. Based on these results, we were able to hypothesize that the hTR $\beta 1$ has the capacity of autorepression. Up to now, only the hRXR α , in the whole nuclear receptor superfamily, had been described to behave similarly. Finally, we crystallized the ligand binding domain of the hTR $\beta 1$ in the presence of the ligands T3, Triac, and GC-1. The objective was to solve crystallographic structures essential for the future development of tiromimetics with isoform-selective action.

CAPÍTULO 1– INTRODUÇÃO GERAL: RECEPTORES NUCLEARES

1.1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1.1. SINALIZAÇÃO CELULAR

Os organismos multicelulares requerem vias específicas de comunicação intercelular de maneira a organizar seu complexo organismo durante a embriogênese, assim como desenvolver e manter suas propriedades e funções no decorrer da existência.

A comunicação entre as células ocorre através da secreção de centenas de tipos de moléculas sinalizadoras, incluindo proteínas, pequenos peptídeos, aminoácidos, nucleotídeos, esteróides, retinóides, derivados de ácidos graxos e gases, como óxido nítrico e monóxido de carbono. 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 específicos desencadeia vários processos de respostas nas células alvo.

Um grupo de receptores é constituído por proteínas do tipo transmembrana, as quais estão localizadas na superfície das células alvos. Estes receptores, quando ligados a uma molécula sinalizadora extracelular específica, se tornam ativados e geram uma cascata de sinais intracelulares que alteram o comportamento da célula alvo.

Outro grupo de receptores está localizado no interior da célula alvo e requer a entrada do ligante sinalizador dentro da célula, a fim de ativar seus componentes. Desta maneira, estas moléculas devem ser suficientemente pequenas e hidrofóbicas para se difundirem através da membrana plasmática, segundo algumas, entretanto, captadas por proteínas na membrana. Os receptores que recebem o sinal no interior das células são membros da superfamília dos **receptores nucleares**.

Os receptores nucleares são geralmente proteínas de 50 a 100kDa que agem através da regulação da transcrição de genes-alvo, mediando, desta forma, os efeitos pleiotrópicos dos hormônios lipofílicos nas células. Estes receptores agem, portanto, como fatores de transcrição com as seguintes características: (1) respondem a uma grande variedade de reguladores hormonais ou sinais metabólicos de maneira direta, ou seja, através da associação física com os mesmos; (2) integram diversas vias de sinalização podendo ser, eles próprios, alvos de modificação pós-traducional; (3) regulam a atividade de outras cascatas de sinalização (normalmente referidas como transdução de sinal cruzada).

Os receptores nucleares são uns dos sinalizadores 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.

Estes receptores estão intimamente relacionados a diversas doenças, principalmente a vários tipos de câncer, sendo, por isso, considerados “alvos” para novas terapias. Os grupos de agonistas (glucocorticóides, estrogênios, vitamina D, retinóides, androgênios, antiandrogênios e tiroxina) 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.

1.1.2. A SUPERFAMÍLIA DOS RECEPTORES NUCLEARES

Atualmente existem vários receptores nucleares já identificados através de todo reino animal, desde os nematóides até o homem sendo, portanto, proteínas cujo surgimento na escala evolutiva precedeu a diferenciação entre vertebrados e invertebrados¹. No genoma humano, sabe-se hoje que existem 48 genes pertencentes a esta família de fatores de transcrição². Estes receptores compartilham uma estrutura modular de 5-6 domínios conservados e com funções específicas³. A principal distinção desta família dos outros fatores de transcrição é sua capacidade de ligar especificamente pequenas moléculas lipofílicas.

¹ Hodgkin, J. (1999) *Cell* 98:277-80.

² Maglich, J.M., Sluder, A., Guan, X., Shi, Y., McKee, D.D., Carrick, K., Kamdar, K., Willson, T.M., and Moore, J.T. (2001) *Genome Biol.* 2(8): research0029.

³ Gronemeyer, H. and Laudet, V. (1995) *Protein Profile* 2:1173-08.

A superfamília dos receptores nucleares é formada pelos receptores de hormônios lipofílicos (esteróides, retinóides, vitamina D e tireoidianos), de metabólitos endógenos (ácidos biliares e graxos, eicosanóides e oxisterol), e de xenobióticos (que induzem a produção de citocromo P450, facilitando processos de desintoxicação). Desta maneira, os receptores nucleares fazem parte tanto das vias de sinalização endócrina (como os receptores de hormônios esteroideais), assim como da autócrina/parácrina (receptores de retinóides, por exemplo) e intácrina (receptores de metabólitos tais como o receptor LXR, *Liver X Receptor*).

Nesta superfamília também são encontrados um grande número de receptores cujos ligantes naturais ainda não foram identificados, sendo estes receptores denominados "receptores órfãos"⁴. O receptor do retinóide X (RXR, *Retinoid X Receptor*) foi inicialmente descrito como membro desta categoria, sendo seu ligante, o ácido retinóico 9-*cis*, somente conhecido posteriormente à identificação da molécula receptora⁵. Recentemente, foram identificados ligantes para outros "receptores órfãos", como por exemplo, os ácidos graxos, eicosanóides e as tiazolidinedionas, os quais se ligam ao receptor ativado por proliferadores peroxissomais (PPAR, *Peroxisomal Proliferator-activated Receptor*)⁶, os oxisteróis (produtos do metabolismo do colesterol) que reconhecem o receptor hepático X (LXR, *Liver X Receptor*)⁷, a pregnenolona, progesterona e dexametasona, ligantes do receptor dos pregnanos X

⁴ Kliewer, S.A., Lehmann, J.M., and Willson T.M. (1999) *Science* 284:757-60.

⁵ Mangelsdorf, D.J., Ong, E.S., Dyck, J.A., and Evans, R.M. (1990) *Nature* 345:224-9.

⁶ Keller, H., Dreyer, C., Medin, J., Mahfoudi, A., Ozato, K., and Wahli, W. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sc. U. S. A.* 90:2160-4.

⁷ Lehmann, J.M., Kliewer, S.A., Moore, L.B., Smith-Oliver, T.A., Oliver, B.B., Su, J.L., Sundseth, S.S., Winegar, D.A., Blanchard, D.E., Spencer, T.A., Willson, T.M. (1997) *J. Biol. Chem.* 272:3137-40.

(PXR, *Pregnane X Receptor*)⁸, o androstanol e androstenol, ligantes do receptor constitutivo dos androstanos (CAR, *Constitutive Androstane Receptor*)⁹, e os ácidos biliares, os quais se ligam ao receptor dos farnesóides X (FXR, *Farnesoid X Receptor*)¹⁰. Estes achados sugerem que novos ligantes poderão ser identificados para outros “receptores órfãos”, reforçando a importância da superfamília de receptores nucleares no controle do metabolismo, crescimento e desenvolvimento dos organismos multicelulares¹¹.

Tem sido proposto que os receptores nucleares evoluíram a partir de um “receptor” órfão ancestral, tendo adquirido, com o tempo, a capacidade de ligação¹². Neste sentido espera-se também que alguns “receptores órfãos” de fato não liguem ligantes, podendo agir como repressores ou ativadores constitutivos da expressão.

1.1.3. ESTRUTURA GERAL DOS RECEPTORES NUCLEARES

Todos os membros desta superfamília são proteínas modulares, com três domínios principais. Cada módulo desempenha uma função específica, apesar de poderem também interagir entre si para executar uma determinada ação biológica do receptor. O módulo amino-terminal, que diverge completamente em tamanho e composição de aminoácidos entre os diversos membros, apresenta uma propriedade de transativação

⁸ Kliewer, S.A., Moore, J.T., Wade, L., Staudinger, J.L., Watson, M.A., Jones, S.A., McKee, D.D., Oliver, B.B., Willson, T.M., Zetterstrom, R.H., Perlmann, T., Lehmann, J.M. (1998) *Cell* 92:73-82.

⁹ Forman, B.M., Tzameli, I., Choi, H.S., Chen J., Simha, D., Seol, W., Evans, R.M., Moore, D.D. (1998) *Nature* 395:612-15.

¹⁰ Parks, D.J., Blanchard, S.G., Bledsoe, R.K., Chandra, G., Consler, T.G., Kliewer, S.A., Stimmel, J.B., Willson, T.M., Zavacki, A.M., Moore, D.D., and Lehmann, J.M. (1999) *Science* 284:1365-68.

¹¹ Giguère, V. (1999) *Endocr. Rev.* 20:689-725.

¹² Escriva, H., Safi, R., Hanni, C., Langlois, M.C., Saumitou-Laprade, P., Stehelin, D., Capron, A., Pierce, R., and Laudet, V. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94:6803-08.

denominada de AF-1 (*Activation Function 1*), a qual promove a ativação da transcrição na ausência do hormônio, sendo específica para região promotora, região DBD (*DNA Binding Domain*) e tipo celular^{3, 13, 14}.

Outro domínio (cerca de 70 a 80 resíduos de aminoácidos), conhecido como domínio de ligação ao DNA (DBD), possui alta identidade sequencial entre os diversos receptores. Este domínio é rico em resíduos de cisteína, as quais coordenam a formação de dois dedos de zinco. Foi constatado que o domínio DBD é o responsável tanto pela ligação específica do receptor a sequência de DNA alvo, assim como possui fraca capacidade de dimerização^{3, 13, 14}.

Já o terceiro domínio (cerca de 250 resíduos de aminoácidos), denominado domínio de ligação do ligante (LBD, *Ligand Binding Domain*), tem a sequência de aminoácidos moderadamente conservada entre os membros da família e é responsável pela ligação do receptor ao hormônio, ativação da transcrição (AF-2, *Activation Function 2*) dependente da presença do hormônio, além de ser responsável direto pela homo e/ou heterodimerização entre os receptores. Este módulo é também essencial para associação dos receptores de esteróides com proteínas de choque térmico (HSPs, *Heat Shock Proteins*), e de todos os receptores com proteínas coreguladoras, correpressores e coativadores, respectivamente essenciais para repressão ou ativação de genes pelos receptores. Entre estes dois domínios há a região conhecida como *hinge*, ou dobradiça, a qual é pouco conservada e está associada com a localização nuclear do receptor e associação com correpressores^{3, 13, 14} (**Figura 1**).

¹³ Chambon, P. (1996) *FASEB J.*10:940-54.

¹⁴ Laudet, V. and Gronemeyer, H. *The Nuclear Receptor*, 1.ed. New York, Academic Press, 2002

Figura 1. Representação esquemática da organização estrutural e funcional dos receptores nucleares. Os boxes grandes e coloridos representam os domínios estruturalmente conservados C e E, enquanto que as barras brancas ilustram as regiões divergentes A/B, D e F. A região F está ausente em alguns receptores. Duas funções de ativação da transcrição (AFs) tem sido descritas entre os vários receptores nucleares, uma região AF-1 constitutivamente ativa (se retirada do contexto do receptor) e presente na região A/B, e outra região AF-2 induzida por ligante e encontrada na região E (hélice 12). Dentro destas funções de ativação, tem-se definido na região amino-terminal dos receptores, por exemplo, de estrógeno (ER, *Estrogen Receptor*) e progesterona (PR, *Progesterone Receptor*), domínios autônomos de transativação (ADs dentro dos círculos pretos, identificados em PR; dentro dos boxes cinzas, identificados em ER). Outro domínio de ativação autônomo tem sido identificado na porção C-terminal do domínio de ligação do ligante (LBD) dos receptores nucleares. NSL, sinal de localização nuclear¹⁴.

1.1.4. O MECANISMO DE AÇÃO DOS RECEPTORES NUCLEARES

A ação dos receptores de esteróides se dá com ligação do hormônio aos receptores inativados no citoplasma pela ligação com HSPs. Após a ligação do ligante, o receptor se desliga das HSPs, migra para o núcleo e ativa a transcrição¹⁵. Entretanto, muitos receptores nucleares são constitutivamente nucleares e estão em muitos casos ligados ao DNA na ausência do ligante. Nesta situação, estes receptores estão ligados a correpressores (CoRs) e atuam como fortes repressores da transcrição gênica. As proteínas corepressoras agem recrutando desacetilases de histonas, uma atividade que mantém a cromatina em um estado reprimido (condensado)¹⁶.

Com a ligação do ligante, o complexo corepressor se desliga do receptor nuclear, ficando este livre para interagir com os complexos de coativadores (CoAs). Vários

¹⁵ Pratt, W.B., and Toft, D.O. (1997) *Endocr. Rev.* 18:306-60.

¹⁶ Aranda, A. and Pascual, A. (2001) *Physiol. Reviews*, 81:1269:1304.

coativadores possuem atividade intrínseca de acetilação de histonas, enquanto que outros recrutam enzimas acetilases. A ação destes coreguladores contribuem para a desrepressão da expressão gênica por afrouxamento da cromatina¹⁶ (**Figura 2**).

Figura 2. Modelo proposto de associação dos receptores nucleares com os complexos corepressor e coativador.

Na ausência do ligante, o receptor nuclear (muitas vezes associado como heterodímero) está complexado a complexos corepressores. Estes complexos (SMRT/NCOR, *Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid-Hormone Receptors / Nuclear Corepressor*) recrutam desacetilases de histonas (HDACs, *Histone Deacetylases*), tanto diretamente, assim como via associação com Sin3. Muitas outras proteínas pertencem a estes complexos, mas sua exata composição ainda não é conhecida. A ligação do ligante promove a liberação do complexo corepressor e o recrutamento dependente de AF-2 de um complexo coativador que contém coativadores da família p160 (tais como p/CIP, *p300/CBP/Cointegrator-associated Protein* ou SRC-1, *Steroid Receptor Coactivator-1*), CBP/p300 (*cAMP Response Element Binding Protein (CREB)-binding Protein*, p300, parâlogo desta proteína) e PCAF (*p300/CBP-associated factor*). Todas estas proteínas possuem atividade de acetilação de histonas (HAT, *Histone Acetyltransferase*). Múltiplas interações proteína-proteína existem entre os diferentes componentes: CBP/p300 contacta ao mesmo tempo o receptor, os coativadores p160 e PCAF através de domínios independentes. Da mesma maneira, o receptor liga CBP/p300, coativadores p160 e PCAF, assim como PCAF pode se ligar diretamente aos elementos CBP/p300, coativadores p160 e o receptor¹⁶.

Entretanto, somente o afrouxamento da cromatina não é suficiente para a ativação da transcrição, indicando que interações adicionais entre os receptores nucleares e o maquinário geral de transcrição são importantes para a regulação da expressão gênica¹⁶.

O exato mecanismo bioquímico pelo qual os receptores nucleares estimulam a transcrição gênica ainda não é muito bem definido. Sabe-se que os receptores ativados por ligantes recrutam de fato três tipos de complexos coativadores, os quais possuem

diferentes atividades (**Figura 3**). Apesar de conhecido estes complexos, não se sabe muito sobre a forma como eles agem: se independentemente ou de uma maneira coordenada ou sequencial¹⁶.

Figura 3. Com a ligação do ligante, os receptores nucleares recrutam diferentes complexos coativadores. O complexo TRAP/DRAP favorece o recrutamento de componentes do maquinário basal de transcrição, incluindo a RNA polimerase, para o promotor alvo. Os complexos PCAF/CBP/p160 funcionam como as enzimas que modificam a estrutura da cromatina através da acetilação das histonas componentes dos nucleossomos. O complexo SWI/SNF é formado por fatores de remodelamento da cromatina dependentes de ATP¹⁶.

Muitos alvos gênicos de hormônios são, entretanto, desligados na presença do ligante, um fenômeno conhecido como transrepressão; nestes casos, receptores ligados a ligantes recrutam correpressores e desacetilases de histonas ou se associam a coativadores mas não se ligam à DNA, sequestrando estes de outros fatores de transcrição¹⁶.

Por fim, os receptores nucleares podem regular a transcrição gênica através da interação indireta com outros fatores de transcrição, um processo que não depende da

ligação do receptor nuclear ao DNA^{17, 18}. Outro processo de regulação envolve modificações covalentes pós-traducionais nos receptores, usualmente na forma de fosforilações reguladas por eventos na membrana celular ou durante o ciclo celular¹¹. Uma visão geral e resumida de alguns destes modos de ação dos receptores nucleares é apresentada na **Figura 4**.

Figura 4. Vias de sinalização reguladoras da ação genômica dos receptores nucleares (NR). A atividade destes fatores de transcrição pode ser regulada pela ligação direta de pequenas moléculas hidrofóbicas, por interações proteína-proteína com outros fatores de transcrição (TF), ou por modificações covalentes tais como fosforilação, após ativação de receptores de superfície celular (estimulados, por exemplo, por hormônios peptídicos) ou por quinases dependentes de ciclina (cdk, *cell cycle-dependent kinase*)¹¹.

A fosforilação de receptores nucleares permite uma importante ligação entre as vias de sinalização. Várias quinases ativadas por sinais extracelulares que se ligam a receptores de superfície, incluindo, por exemplo, proteínas quinase ativadas por

¹⁷ Pfahl, M. (1993) *Endocr. Rev.* 14:651-58.

¹⁸ Karin, M. (1998) *Cell* 93:487-90.

mitógenos (MAPK - *Mitogen-activated Protein Kinase*), serina e tirosina quinases (*Ser-Tyr Kinases*), quinases dependentes do ciclo celular (cdks), quinases caseína e proteínas quinase A, afetam a atividade de receptores nucleares através de eventos de fosforilação¹⁹. Dependendo do receptor e do resíduo envolvido, vários aspectos da função dos receptores podem ser regulados por eventos de fosforilação, incluindo ligação à DNA e dimerização, atividade transcricional, interação com coreguladores e afinidade de ligação com ligantes¹⁹. Há também receptores que podem ser ativados por fosforilação através de sinais originados na membrana, mesmo na ausência de seu ligante específico¹⁶.

1.1.5. DETALHES SOBRE A LIGAÇÃO AO DNA

Os receptores nucleares agem basicamente como fatores de transcrição regulados pelo hormônio e se ligam no promotor dos genes-alvo influenciando diretamente a taxa de transcrição. No promotor dos genes regulados por estes hormônios encontram-se seqüências de bases que são responsáveis pelo reconhecimento específico do receptor, as quais compõem os chamados elementos responsivos ao hormônio (HREs - *Hormone Responsive Elements*).

Estes HREs são formados pelo motivo hexamérico 5'-PuGGTCA-3' (Pu = A ou G). Entretanto, eventos de mutação, extensão, duplicação, além de variações na orientação relativa destes elementos repetidos geraram elementos de reposta que são seletivos para um dado (ou uma classe de) receptor¹⁴.

Os hexâmeros podem estar organizados em diferentes orientações (direta, palindrômica ou palindrômica invertida) e separados por um número variável de

¹⁹ Shao, D. and Lazar, M.A. (1999) *J. Clin. Invest.* 103:1617-18.

nucleotídeos²⁰. O receptor do hormônio tireoidiano (TR, *Thyroid Receptor*), do ácido retinóico (RAR, *Retinoic Acid Receptor*), da vitamina D (VDR, *Vitamin D Receptor*) e o receptor PPAR formam heterodímeros com o receptor RXR e se ligam às repetições diretas (DR, *Direct Repeats*) do hexâmero, em espaçamentos que estão relacionados com a especificidade da interação; homodímeros de RXR se ligam à DR com espaçamento de 1 nucleotídeo¹⁶. Os receptores de esteróides e dos hormônios tireoidianos se ligam como homodímeros em repetições do tipo palíndromo com espaçamentos diversos¹⁶. O homodímero do receptor TR também é capaz de reconhecer um motivo organizado como palíndromo invertido separado por 6 nucleotídeos¹⁶. Alguns receptores órfãos reconhecem elementos de resposta compostos de meio-sítio ligando-se, desta maneira, como monômeros. O receptor órfão NGFI-B (*Nerve Growth Factor-induced B*) pode também se heterodimerizar com RXR e se ligar ao elemento do tipo DR5^{21, 22} (**Figura 5**).

²⁰ Glass, C.K. (1994) *Endocr. Rev.* 15: 391-07.

²¹ Perlmann, T. and Jansson, L. (1995) *Genes Dev.* 9:769-82.

²² Forman, B.M., Umesono, K., Chen, J. and Evans, R.M. (1995) *Cell* 81:541-50.

Figura 5. Elementos de resposta a receptores nucleares.

A sequência de reconhecimento conservada é 5' - PuGGTCA - 3' (setas indicam a direção 5' para 3'), a qual, juntamente com dois As na posição 5', é o elemento de resposta para o receptor órfão NGFI-B. Eventos de mutação e duplicação geraram palíndromos simétricos (PALx) e palíndromos invertidos (IPx, *Inverted Palindrome*), assim como repetições diretas polares (DRx), com x pares de bases separando os dois meios sítios. PAL3 é o elemento de resposta ao estrógeno (ERE), enquanto que PAL0 corresponde ao elemento de resposta ao hormônio tireoidiano (TRE). Uma única mutação na posição 4 da sequência conservada, mudando T para A, forma elementos PAL3 de resposta a glucocorticóides (GRE), elemento o qual também é reconhecido pelos receptores de andrógeno, progesterona e mineralocorticóide. É importante ressaltar que muitos elementos de resposta estão longe do ideal e freqüentemente um dos meios sítios contém uma ou mais mutações. Enquanto que os elementos PAL são reconhecidos por homodímeros, os elementos DRs podem se ligar tanto a homodímeros quanto heterodímeros com a especificidade dada, entre outros, pela sequência espaçadora. Os receptores posicionados na porção 3' fazem contatos com a cavidade menor do DNA na região espaçadora. Alguns elementos do tipo IP são elementos de resposta para homodímeros de TR e heterodímeros de TR-RXR¹⁴.

O processo de dimerização é um mecanismo geral que objetiva o aumento da afinidade e especificidade de ligação ao HRE, além de aumentar a diversidade de

elementos de resposta. O aumento em afinidade e especificidade se dá porque a dimerização promove ligação cooperativa ao DNA, além de que há uma menor frequência de HREs contendo hexâmeros duplicados separados por um espaçamento determinado, em relação aos meio-sítios. Já o ganho em diversidade existe devido ao fato de que heterodímeros podem ter sítios de reconhecimento diferentes dos sítios dos homodímeros. A heterodimerização com o RXR, por sua vez, promove um aumento na eficiência de ligação ao DNA em relação ao seu correspondente homodímero, além de permitir dois *inputs* de sinalização, aquela para o ligante do RXR e outra para o ligante do parceiro de heterodimerização¹⁴.

1.1.6. A ESTRUTURA DO DOMÍNIO DE LIGAÇÃO AO LIGANTE

Em 1995 foram reportadas as estruturas cristalográficas do domínio LBD dos receptores nucleares RXR e TR, tendo sido estas as primeiras estruturas conhecidas para o LBD de receptores nucleares. Até recentemente já foram descritas a estrutura cristalina de mais de uma dezena de LBDs de diferentes receptores nucleares¹⁴. Todos estes LBDs de receptores nucleares revelaram um enovelamento comum, com 12 α -hélices (H1 – H12) e uma folha- β de três (ou quatro) fitas arranjada em um *sandwich* de α -hélices antiparalelas, formando uma estrutura de três camadas¹⁴. Algumas variabilidades, entretanto, existem, não tendo sido, por exemplo, encontrada uma hélice H2 no receptor RAR γ ¹⁴. Outro exemplo é o do PXR, o qual possui uma folha- β antiparalela de cinco fitas, que está envolvida na dimerização da estrutura cristalográfica²³.

²³ Watkins, R.E., Wisely, G.B., Moore, L.B., Collins, J.L., Lambert, M.H., Williams, S.P., Willson, T.M., Kliewer, S.A., Redinbo, M.R. (2001) *Science* 292:2329-33.

Em todas as estruturas cristalinas atualmente disponíveis, o ligante está embebido dentro da estrutura da proteína, não havendo, em muitos casos, nenhuma entrada clara de acesso ou região de saída. O receptor PPAR γ é uma exceção a esta regra, dado que uma região potencial de acesso ao bolsão de ligação do ligante (LBP, *Ligand-Binding Pocket*) foi observada entre a hélice 3 e a volta β . Esta região aparenta possuir tamanho suficiente para permitir a entrada de pequenos ligantes sem maiores adaptações^{24, 25, 26, 27}.

Para vários receptores dos quais se conhece a estrutura do LBD, sabe-se que são necessárias mudanças estruturais significativas para a abertura de uma porta de entrada para os ligantes. O modelo da “armadilha de rato” fornece uma solução interessante para este problema: o movimento da hélice H12 abre um canal, uma vez que há a remoção da barreira que fecha o LBP. Este reposicionamento da hélice H12 não é só essencial para entrada do ligante, sendo também de suma importância para a atividade do receptor.

Comparações entre as estruturas *apo* (sem ligante) e *holo* (com ligante) das porções LBDs de alguns receptores sugerem um mecanismo comum através do qual o ligante “entra” na estrutura e a função da transativação AF-2 se torna competente. Na forma *apo*, a hélice H12 está projetada para fora do corpo da proteína e as hélices H11 e H10 são descontínuas. Além disto, as demais hélices estão em posições tais que cria-se

²⁴ 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., and Willson, T.M. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96:6102-06.

²⁵ 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* 395:137:43.

²⁶ 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., and Milburn, M.V. (1999) *Mol. Cell* 3:397-403.

²⁷ Uppenberg, J., Svensson, C., Jaki, M., Bertilsson, G., Jendeberg, L., and Berkenstam, A. (1998) *J. Biol. Chem.* 273:31108-112.

uma superfície adequada para a interação com correpressores. Com a ligação do ligante, a hélice H11 é reposicionada de maneira a ficar contínua à hélice H10, enquanto que o movimento concomitante da hélice H12 traz o *loop* omega para abaixo da hélice H6, carregando junto a porção N-terminal da hélice H3 (Figura 6). Nesta posição final, a hélice H12 sela o LBP, formando uma espécie de gaiola que estabiliza a ligação do ligante, promovendo interações adicionais ligante-proteína. A trans-conformação da H12, juntamente com mudanças estruturais adicionais (tais como o dobramento da hélice H3), cria superfícies distintas entre as forma *apo* e *holo* dos LBDs.

Figura 6. A comparação entre as estruturas cristalográficas do domínio LBD do receptor RXR α sem ligante (*apo*) (PDB, *Protein Data Bank* ²⁸, ID 1lbd) e do RAR γ com ligante (*holo*) (PDB ID 2lbd, ligante não mostrado) revela as mudanças conformacionais induzidas pelo ligante, responsáveis por gerar a forma transcricionalmente ativa destes receptores nucleares. A estrutura terciária do LBD do RAR γ na forma *holo* é muito similar à estrutura do LBD *holo* do receptor RXR α (dados não mostrados). Por este motivo a estrutura do RAR foi empregada nesta comparação. **Todas as figuras de estrutura de proteínas foram**

²⁸ Berman, H.M., Westbrook, J. Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I.N., and Bourne, P.E. (2000) *Nucl. Acids Res.* 28: 235-42.

geradas com o programa PyMOL v0.97 (Warren L. DeLano "The PyMOL Molecular Graphics System." DeLano Scientific LLC, San Carlos, CA, USA. <http://www.pymol.org>)

A hélice 12 possui o domínio de ativação AF-2 (AF-2 AD *core*, **Figura 6**). Este domínio apresenta alta homologia entre os receptores nucleares, sendo formado pelo motivo $\phi\phi XE\phi\phi$ (ϕ , qualquer resíduo hidrofóbico). Este motivo se dobra como uma α -hélice anfipática, a qual é precedida por um *loop* de 8-12 aminoácidos variável em sequência. Após a ligação do ligante, a AF-2 se posiciona em uma região inteiramente diferente do LBD, de maneira que os resíduos hidrofóbicos apontam para o interior da estrutura e os carregados se direcionam para fora. Nesta posição, a AF-2 é capaz de interagir com o motivo LXXLL normalmente encontrado nos coativadores, contribuindo para a formação da superfície de interação com estes coreguladores. Concomitantemente, proteínas corepressoras, as quais se ligam na superfície do *apo*-LBD, se dissociam com a ligação do agonista, mas não necessariamente do antagonista¹⁴.

O modelo “armadilha de rato”, entretanto, parece não se aplicar ao receptor PPAR γ , para o qual já foram elucidadas as estruturas cristalográficas com e sem ligante²⁹. Verifica-se somente uma pequena mudança na posição da H12 quando se compara a estrutura *apo* com a *holo*. A H12, mesmo na estrutura *apo*, está em uma posição do tipo “ativa”, ou seja, de maneira a formar o sítio de interação de coativadores. Este dado, associado à observação de que a estrutura *apo* apresenta uma possível entrada para o LBP, parece indicar que a ligação do ligante neste receptor não promove grandes mudanças conformacionais. Provavelmente, a importância do agonista

²⁹ Nolte, R.T., Wisely, G.B., Westin, S., Cobb, J.E., Lambert, M.H., Kurokawa, R., Rosenfeldk, M.G., Willson, T.M., Glass, C.K., and Milburn, M.V. (1998) *Nature* 395:137-43.

está no ajuste fino da posição do AF-2 para uma conformação ideal de interação com o coativador.

O receptor PXR também é uma exceção para o modelo “armadilha de rato”. As estruturas cristalográficas dos LBDs *apo* e *holo* deste receptor revelaram que a hélice 12 se posiciona praticamente de maneira idêntica entre as duas estruturas. Em ambos os casos, a H12 está empacotada contra o restante da proteína em uma posição que aparenta ser permissiva para a ligação de coativadores (**Figura 7**)²³. Sabe-se, entretanto, que a atividade transcricional deste receptor é dependente da presença do ligante, e que o ligante promove o recrutamento do coativador SRC-1 para a proteína^{30, 60}.

Figura 7. Superposição das estruturas cristalográficas do LBD de PXR sem ligante (em vermelho, PDB ID 1ILG)²³ e do complexo ternário LBD/agonista (em cinza)/peptídeo de SRC-1 (em azul) (o agonista foi omitido, PDB ID 1NRL)⁶⁰, feita pelo programa SUPCOMB³¹. Estão indicados os resíduos E427 (*) e K259 (**) da estrutura *holo*, os quais formam o *charge clamp*. Este elemento estrutural é altamente conservado entre os diversos receptores nucleares, sendo importante para a interação com os coativadores. Note o posicionamento quase idêntico da H12 entre as conformações *apo* e *holo*.

Recentemente, tornaram-se conhecidas mais algumas outras exceções ao modo “clássico” de ação dos receptores nucleares. Estudos funcionais, acoplados à resolução

³⁰ Kliewer, S.A., Moore, J.T., Wade, L., Staudinger, J.L., Watson, M.A., Jones, S.A., McKee, D.D., Oliver, B.B., Willson, T.M., Zetterstrom, R.H., Perlmann, T., Lehmann, J.M. (1998) *Cell* 92:73-82.

³¹ Kozin, M.B., and Svergun, D.I (2001) *J. Appl. Crystallogr.* 34:33-41.

da estrutura cristalográfica do LBD do receptor órfão Nurr1, mostraram que este receptor age constitutivamente em alguns tipos celulares, sendo sua ação independente de ligante. A estrutura cristalográfica revelou um arranjo terciário no qual a hélice H12 está na posição típica de ativação (empacotada contra o núcleo hidrofóbico da estrutura). Outras observações interessantes foram que o sítio de ligação de coativador está formado, mas o bolsão de ligação de ligante está preenchido por cadeias laterais da proteína³². Outro exemplo é o receptor LHR-1, cuja estrutura cristalina do LBD, recentemente resolvida, revelou que este domínio adota uma conformação ativa, com a hélice 12 recolhida na ausência de ligante e coativadores, além de possuir um grande, mas vazio LBP. A atividade constitutiva deste receptor aparenta estar relacionada com um elemento estrutural distinto, o qual consiste de uma hélice H2 estendida. Esta hélice forma uma camada adicional no empacotamento clássico do LBD de receptores nucleares, sendo essencial para estabilização do enovelamento deste domínio e provavelmente agindo como um agonista integrante da estrutura³³.

Sabe-se que o aumento da concentração de coativadores pode tornar o RAR transcricionalmente competente, sob certas condições³⁴. Além disto, um resíduo de tirosina presente na H12 do receptor ER (Y537) é importante para manter o receptor *apo* inativo, dado que a fosforilação (ou mutação deste resíduo por outro carregado) aumenta sua ligação com coativadores e atividade transcricional, mesmo na ausência de agonista^{35, 36}. Desta maneira, especula-se que a super-expressão de coativadores ou

³² Wang, Z., Benoit, G., Liu, J., Prasad, S., Aarnisalo, P., Liu, X., Xu, H., Walker, N.P.C., and Perlmann, T. (2003) *Nature* 423:555-60.

³³ Elena, P., Sablin, E.P., Krylova, I.N., Fletterick, R.J., and Ingraham, H.A. (2003) *Mol. Cell* 11:1575-85.

³⁴ Voegel, J.J., Heine, M.J., Tini, M., Vivat, V., Chambon, P. and Gronemeyer, H. *EMBO* (1998) 17:507-19.

³⁵ White, R., Sjöberg, M., Kalkhoven, E. and Parker, M.G. (1997) *EMBO J.* 16:1427-35.

modificações pós-traducionais podem tornar alguns receptores nucleares transcricionalmente ativos, independente da presença de ligantes.

Os LBPs são forrados principalmente com resíduos hidrofóbicos. Alguns poucos resíduos polares posicionados no fundo do bolsão, próximo a volta β , atuam como pontos de ancoramento para o ligante ou desempenham um papel essencial no correto posicionamento e reforço da seletividade do LBP.

Nos casos dos receptores RAR γ e TR β , a forma do LBP coincide com o formato do ligante. Esta coincidência entre a forma e o volume maximiza o número de contatos, principalmente os hidrofóbicos, contribuindo desta maneira para a estabilidade do complexo e a seletividade do bolsão para o ligante^{14, 37}. Entretanto, para os receptores esteroidianos o volume do LBP é significativamente maior que os dos correspondentes ligantes e a rigidez dos ligantes não permite adaptabilidade¹⁴. Nestes casos, interações chave específicas são mais importantes. Receptores como o PPAR γ e PXR, entretanto, possuem bolsões grandes e flexíveis que podem comportar, no caso do PPAR, até mais de um ligante^{29, 60}.

Estes resíduos de ancoragem, conservados dentro de uma dada subfamília, são indicativos do grupo polar característico de seus ligantes (por exemplo, carboxilatos para retinóides e cetona para esteróides)¹⁴. A existência destes pontos precisos de ancoragem fornece a possibilidade de se planejar ligantes, os quais, acrescidos de contatos adicionais, podem ter afinidade de ligação maior do que a dos ligantes naturais. Estes ligantes poderiam ser, desta maneira, “superagonistas”.

³⁶ Weis, K.E., Ekena, K., Thomas, J.A., Lazennec, G. and Katzenellenbogen, B.S. (1996) *Mol. Endocrinol.* 10:1388-98.

³⁷ Klaholz, B.P., Renaud, J.P., Mitschler, A., Zusi, C., Chambon, P., Gronemeyer, H., and Moras, D. (1998) *Nature Struct. Biol.* 5:199-02.

1.1.7. A ESTRUTURA DO DOMÍNIO DE LIGAÇÃO AO DNA

Uma quantidade significativa de informações estruturais sobre o domínio de ligação ao DNA tem sido acumulada durante o passar dos últimos 10 anos. Conhece-se a estrutura em solução do DBD do receptor de glucocorticóide (GR, *Glucocorticoid Receptor*)³⁸, do receptor de estrógeno³⁹, do RAR⁴⁰ e do RXR⁴¹. Além disto, a estrutura cristalina em 3D já foi resolvida para, por exemplo, o homodímero do DBD de GR ligado ao seu HRE⁴², o homodímero do DBD de ER ligado ao ERE (*Estrogen Responsive Element*)⁴³, o homodímero do DBD de RXR ligado ao elemento DR1 (*Direct Repeat 1*)⁴⁴ e do heterodímero TR/RXR ligado a DR4 (*Direct Repeat 4*)⁴⁵.

Um esquema descrevendo a estrutura de um DBD e as funções específicas de cada região⁴⁴, assim como a estrutura de RMN (Ressonância Magnética Nuclear) do DBD de RXR em solução⁴¹, são mostrados na **Figura 8**. A estrutura do DBD consiste de um par de α -hélices anfipáticas empacotadas uma perpendicular à outra, cruzando próximo de suas metades. Uma região de ligação a zinco está localizada próximo do N-terminal de cada uma das hélices. Cadeias laterais hidrofóbicas formam um extenso contato hidrofóbico entre as duas hélices⁴¹.

³⁸ Baumann, H., Paulsen, K., Kovacs, H., Berglund, H., Wright, A. P., Gustafsson, J. A., Hard, T. (1993) *Biochemistry* 32:13463-71.

³⁹ Schwabe, J.W., Neuhaus, D., and Rhodes, D. (1990) *Nature*. 348:458-61.

⁴⁰ Knegtel, R. M., Katahira, M., Schilthuis, J. G., Bonvin, A. M., Boelens, R., Eib, D., van der Saag, P. T., and Kaptein, R. (1993) *J. Biomol. NMR* 3:1-17.

⁴¹ Holmbeck, S.M., Foster, M.P., Casimiro, D.R., Sem, D.S., Dyson, H.J., and Wright, P.E. (1998) *J. Mol. Biol.* 281:271-84.

⁴² Luisi, B. F., Xu, W. X., Otwinowski, Z., Freedman, L. P., Yamamoto, K. R., and Sigler, P. B. (1991) *Nature* 352:497-505.

⁴³ Schwabe, J. W., Chapman, L., Finch, J. T., and Rhodes, D. (1993) *Cell* 75:567-78.

⁴⁴ Zhao, Q., Chasse, S.A., Devarakonda, S., Sierk, M.L., Ahvazi, B., and Rastinejad, F. (2000) *J. Mol. Biol.* 296:509-20.

⁴⁵ Rastinejad, F., Perlmann, T., Evans, R. M., and Sigler, P. B. (1995) *Nature* 375:203-11.

Figura 8. Ilustração esquemática e estrutura de RMN do domínio de ligação ao DNA do receptor hRXR α . (A) A região P-Box é parte da hélice de reconhecimento do DNA (hélice 1) enquanto que a região T-Box é parte da hélice 3 e corresponde à interface de dimerização nos homodímeros de RXR em DR1⁴⁴. A região D-Box é responsável pela seleção PAL3/PAL0 entre o receptor de estrógeno e o receptor dos hormônios tireoidianos, além de contribuir para a interface de homodimerização dos DBDs de ER e GR¹⁴. (B) Estrutura de alta resolução em solução obtida pela técnica de RMN do DBD de hRXR α ⁴¹.

Na **Figura 9** mostra-se a estrutura cristalográfica do homodímero do DBD de RXR associado a DR1⁴⁴. Comparando-se a estrutura por RMN do DBD de RXR em solução⁴¹ com a estrutura cristalográfica do mesmo domínio ligado ao DNA⁴⁴, verifica-se uma transição estrutural na região T-Box (comparar com a hélice 3 da **Figura 8**) a qual aparentemente é responsável por aumentar a habilidade do RXR interagir favoravelmente com o DNA. A forma monomérica do RXR tem os resíduos R164 e K160 da hélice de reconhecimento do DNA fazendo contatos com o E208 do T-Box. O remodelamento da hélice 3 para uma conformação mais estendida reposiciona o E208 e libera os resíduos R164 e K160 para interagir com as bases e grupos fosfatos do DNA⁴⁴.

Figura 9. Estrutura cristalográfica do homodímero do DBD de hRXR α associado ao elemento responsivo DR1⁴⁴. Apontado por seta está a hélice 3, a qual apresenta-se parcialmente desenovelada em relação à estrutura observada por RMN deste domínio em solução (Figura 8B e ⁴¹).

A **Figura 10** exemplifica diferentes organizações que são necessárias para o ajuste de monômeros, assim como de homo e heterodímeros aos seus respectivos elementos responsivos no DNA.

Acredita-se que o mecanismo de associação dos dímeros ao DNA ocorre em duas etapas. Inicialmente, as superfícies de dimerização nos LBDs dos receptores se associam em solução, e, em seguida, o DBD de cada um dos receptores se liga a um dos hexâmeros que compõe o HRE⁴⁶. Em alguns casos, ao se ligar ao DNA, os DBDs formam uma segunda interface de dimerização, como visto nos estudos estruturais dos homodímeros de GR⁴² e do ER⁴³ e do heterodímero de TR-RXR⁴⁵. No caso dos homodímeros do GR e do ER, a associação entre os DBDs sobre o elemento responsivo

⁴⁶ Perlmann T, Umesono K, Rangarajan PN, Forman BM, Evans RM (1996) *Mol. Endocrinol.* 10:958-66.

(palíndromo) é simétrica, os DBDs de cada monômero estão voltados um para o outro (*head-to-head*, cabeça-cabeça) e aminoácidos idênticos de cada monômero participam da superfície de dimerização (**Figura 10A**). Em contraste, a associação dos heterodímeros TR/RXR ao DR-4 é polar, assimétrica. Neste heterodímero, os aminoácidos do segundo dedo de zinco do RXR se associam com aminoácidos do primeiro dedo de zinco do TR e esta polaridade (*head-to-tail*, cabeça-cauda) resulta na ligação do RXR com o hexâmero situado na região 5' e do TR com o hexâmero situado na região 3' (**Figura 10B**).

Figura 10. Estruturas tridimensionais de três protótipos DBDs associados a seus respectivos HREs, obtidos por cristalografia de proteínas. (A) Estrutura do DBD de ER em um elemento ERE; uma fita da sequência de DNA conservada é mostrada abaixo da estrutura. Os vários elementos estruturais tais como D-Box e P-Box são indicados; átomos de zinco são mostrados como esferas cinzas. É importante

notar que o D-Box forma a interface de dimerização induzida por DNA, enquanto que o P-Box estabelece os contatos seletivos com as bases da cavidade maior do DNA⁴³. (B) Estrutura cristalina do heterodímero 5' - RXR/TR - 3' ligado ao elemento DR4, representado por somente uma fita de DNA. O T-Box faz contato com a cavidade menor da dupla hélice de DNA, indicando que a sequência espaçadora (*hinge*) determina em algum grau a especificidade de interação (seta)⁴⁵. (C) Estrutura cristalina do monômero de NGFI-B em seu elemento NBRE (mostrado como dupla fita). As regiões A e T-Box fazem contato com a sequência AAA na cavidade menor do DNA⁴⁷.

Estudos estruturais, por cristalografia de raios X, e funcionais, empregando-se mutantes, têm sido utilizados para mapear a superfície de dimerização presente nos LBDs de receptores nucleares.

Vários estudos com mutantes pontuais e deletoriais levaram à identificação de uma região de 40 aminoácidos nas hélices 10 e 11 do LBD, chamada *I-box* (*Identify Box*), que é essencial para a heterodimerização dos receptores TR, RAR e VDR com o receptor RXR, e para homodimerização dos receptores COUP-TF (*Chicken Ovoalbumin Upstream Promoter Transcription Factor*), RXR e TR^{48, 49, 50, 51, 52, 53}.

A determinação das estruturas dos homodímeros de LBDs dos receptores *holo-ER* α ⁵⁴, *holo-ER* β ⁵⁵, *apo-PPAR* γ ⁵⁶ e *apo-RXR* α ⁵⁷ aponta para a existência de uma superfície de dimerização que compreende a previamente identificada região *I-box*. Esta

⁴⁷ Meinke, G., and Sigler, P. B. (1999) *Nat. Struct. Biol.* 6: 471-7.

⁴⁸ Au-Fliegner, M., Helmer, E., Casanova, J., Raaka, B.M., and Samuels, H.H. (1993) *Mol. Cell Biol.* 13:5725-37.

⁴⁹ Nagaya, T., and Jameson, J.L. (1993) *J. Biol. Chem.* 268:24278-82.

⁵⁰ Zhang, X.K., Salbert, G., Lee, M.O., and Pfahl, M. (1994) *Mol. Cell Biol.* 14: 4311-23.

⁵¹ Perlmann, T., Umesono, K., Rangarajan, P.N., Forman, B.M., and Evans, R.M. (1996) *Mol. Endocrinol.* 10:958-66.

⁵² Lee, S.K., Na, S.Y., Kim, H.J., Soh, J., Choi, H.S., and Lee, J.W. (1998) *Mol. Endocrinol.* 12:325-32.

⁵³ Forman, B.M., Yang, C.R., Au, M., Casanova, J., Ghysdael, J., and Samuels, H.H. (1989) *Mol. Endocrinol.* 3:1610-26.

⁵⁴ Brzozowski, A.M., Pike, A.C., Dauter, Z., Hubbard, R.E., Bonn, T., Engstrom, O., Ohman, L., Greene, G.L., Gustafsson, J.A., and Carlquist, M. (1997) *Nature* 389:753-8.

⁵⁵ Pike, A.C., Brzozowski, A.M., Hubbard, R.E., Bonn, T., Thorsell, A.G., Engstrom, O., Ljunggren, J., Gustafsson, J.A., and Carlquist, M. (1999) *EMBO J.* 18:4608-18.

⁵⁶ 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* 395:137-43.

⁵⁷ Bourguet, W., Ruff, M., Chambon, P., Gronemeyer, H., and Moras, D. (1995) *Nature* 375: 377-82.

superfície está localizada nas hélices 9 e 10 dos receptores *apo*-RXR α e *apo*-PPAR γ , e nas hélices 10 e 11 dos receptores ER α e β .

Dados cristalográficos recentes sobre os heterodímeros formados entre os LBDs de RXR α e RAR⁵⁸ revelaram uma interface de dimerização similar àquela observada nos homodímeros de *apo*-RXR α , *holo*-ER α , *holo*-ER β e *apo*-PPAR γ . A resolução da estrutura cristalográfica do heterodímero dos LBDs de PPAR γ -RXR α ⁵⁹ revelou a mesma interface, sendo esta, entretanto, ligeiramente assimétrica.

A recente co-cristalização do domínio LBD do receptor PXR associado com um agonista e o um peptídeo contendo o motivo LXXLL do coativador SRC-1⁶⁰ revelou, entretanto, uma extensa superfície de dimerização totalmente inédita, a qual envolve uma das fitas- β da estrutura (são 4 por molécula) e forma uma grande folha- β .

1.1.8. POTENCIAL FARMACOLÓGICO

Muitas drogas atuais possuem seu alvo nos receptores nucleares: hormônios tireoidianos, glucocorticóides, estrogênios, tiazolidinediona, retinóides sintéticos e muitos outros. O potencial farmacológico dos receptores nucleares consiste, em parte, na habilidade de derivados sintéticos ou naturais de reproduzirem ou inibirem a atividade dos hormônios naturais. De fato, agonistas e antagonistas sintéticos de muitos receptores nucleares têm sido usados no combate ao câncer, através de tratamentos quimioterápicos

⁵⁸ Bourguet, W., Vivat, V., Wurtz, J.M., Chambon, P., Gronemeyer, H., and Moras, D. (2000) *Mol. Cell* 5:289-98.

⁵⁹ Gampe, R.T., Montana, V.G., Lambert, M.H., Miller, A.B., Bledsoe, R.K., Milburn, M.V., Kliewer, S.A., Willson, T.M., and Xu, H.E. (2000) *Mol. Cell* 5:545-55.

⁶⁰ Watkins, R.E., Davis-Searles, P.R., Lambert, M.H., and Redinbo, M.R. (2003) *J. Mol. Biol.* 331:815-28.

(por exemplo, os retinóides e antagonistas de andrógenos e estrógenos), e como fármacos imuno-supressivos ou antiinflamatórios (glucocorticóides).

Atualmente, os tratamentos administrados para patologias causadas por disfunções tireoidianas agem em três principais vias, sendo empregados os íons tiocianato, o propiltiouracil e os iodetos orgânicos (nos casos de hipertireoidismo). Para os casos de hipotireoidismo, são freqüentemente administrados os próprios hormônios tireoidianos (T3 e T4). Os íons tiocianato diminuem o seqüestro de iodetos por inibição competitiva da bomba de iodeto, a qual transporta ativamente estes íons para o interior das células. Este processo impede que a tireoglobulina sofra iodação, e diminui a formação dos hormônios tireoidianos. Porém, a diminuição nos níveis de hormônios circulantes leva ao aumento na secreção de TSH (*Thyroid Stimulating Hormone*) pela hipófise anterior, o que provoca hipertrofia da glândula tireóide, e pode até levar a formação do bócio⁶¹.

O propiltiouracil (e compostos semelhantes como o metimazol e o carbimazol) bloqueia a enzima peroxidase. Esta enzima é necessária para a iodação e para o acoplamento das moléculas de tirosinas, passos importantes para a formação dos hormônios tireoidianos. Este tipo de tratamento pode também resultar em um notável aumento da secreção do TSH⁶¹.

Os iodetos orgânicos, quando presentes na circulação sanguínea em altas concentrações, podem levar a diminuição da atividade da tireóide, assim como a redução de seu tamanho e de seu suprimento sanguíneo. Desta maneira, sua administração em

⁶¹ Guyton, A.C., and Hall, J.E. (2002) *Tratado de Fisiologia Médica*. Editora Guanabara e Koogan, RJ, 10ª edição. p. 972.

pacientes somente é recomendada algumas semanas antes da remoção da glândula tireóide⁶¹.

Todos esses compostos comumente utilizados no tratamento de doenças tireoidianas, assim como os outros tratamentos administrados até hoje, como a injeção de iodo radioativo (que pode levar a destruição de até 80% das células glandulares), ou a administração de hormônios naturais (que podem levar a um descontrole no balanço hormonal), freqüentemente causam efeitos colaterais sérios e incômodos aos portadores de distúrbios tireoidianos.

O uso dos ligantes T3 e T4 para propósitos terapêuticos é limitado devido também ao fato de que estes hormônios apresentam baixa seletividade entre as isoformas do receptor TR. Isto resulta no desencadeamento de processos tóxicos quando esses ligantes são usados em doses farmacológicas. Por exemplo, doses supra fisiológicas de hormônio tireoidiano promovem perda de peso devido ao aumento do metabolismo e modificação do balanço de lipídeos [diminuição dos níveis plasmáticos de colesterol, triglicérides e lipoproteína (a)]. Estas doses, entretanto, causam taquicardia, arritmia e podem levar a falência cardíaca⁶².

O conhecimento das estruturas cristalográficas do LBD dos receptores, na forma *apo* ou complexado com seus agonistas ou antagonistas, é de grande valor, uma vez que podem ser empregadas na busca de novos ligantes. Isto pode ser feito de diversas maneiras, como por exemplo através de buscas em bancos de dados de moléculas

⁶² Webb, P., Nguyen, N., Chiellini, G., Yoshihara, H.A.I., Lima, S.C., Apriletti, W., Ribeiro, R., Marimuthu, A., West, B.L., Goede, P., Mellstrom, K., Nilsson, S., Kushner, P.J., Fletterick, R.J., Scanlan, T.S., and Baxter, J.D. (2003) *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 83:59-73.

virtuais. Além disto, pode-se empregar o desenho racional de ligantes, no intuito de se obter moléculas mais seletivas e com propriedades farmacológicas melhoradas.

O desenho racional de fármacos de fato envolve a reunião e combinação de estudos estruturais com estudos bioquímicos e fisiológicos. A partir da combinação dos dados obtidos com as análises estruturais e biológicas, com cálculos mecânicos-quânticos, é possível realizar a modelagem molecular de fármacos. A modelagem baseia-se na criação de um modelo estrutural tridimensional manipulável, através do uso de programas computacionais. Este modelo permite determinar as propriedades estereoquímicas das estruturas e de substituintes de possíveis fármacos em relação a sua interação com um receptor conhecido. O ponto de partida é uma substância protótipo sobre a qual se realizam os ajustes químicos necessários para otimizar suas propriedades⁶³.

Este tipo de abordagem está sendo extremamente importante na pesquisa de fármacos para o tratamento de inúmeras doenças, incluindo a AIDS. Assim, foram idealizadas as moléculas inibidoras das proteases associadas à reprodução dos vírus HIV⁶³. Além disto, o desenho racional de fármacos tem sido amplamente empregado na concepção de agonistas e antagonistas de diversos receptores nucleares.

Os diferentes subtipos ou isoformas de receptores nucleares, embora sejam normalmente altamente relacionados em nível de seqüência, podem apresentar dentro do LBP diferenças pontuais de aminoácidos. Estas diferenças podem ser exploradas para a criação de ligantes seletivos. Como um exemplo, sabe-se que três aminoácidos divergentes presentes no LBP de RAR α , RAR β e RAR γ são responsáveis por mediar o

⁶³ Pedrosa, R.C., Yunes, R.A., Cechinel Filho, V. (2001) *Quim. Nova*, 24:147-52.

reconhecimento específico de ligantes. De fato, ligantes sintéticos foram concebidos de maneira a reconhecer diferentemente estes subtipos⁶⁴.

Durante muito tempo os químicos medicinais acreditavam que um fármaco agiria como agonista ou antagonista de um determinado receptor, independente do órgão ou tecido em que este receptor age. No entanto, foi demonstrado que algumas moléculas estruturalmente próximas aos estrógenos são agonistas em alguns tecidos e antagonistas em outros, apesar de atuarem sempre sobre o mesmo receptor. Assim, foram desenvolvidos alguns fármacos, como o tamoxifeno, o qual atua como antiestrogênico sobre células cancerosas mamárias estrógenos-dependentes, mas atua como estimulador (via ação agonista sobre receptores ER) da proliferação dos tecidos endometrial e ósseo⁶⁵. O composto raloxifeno, por sua vez, possui atividade antiestrogênica no útero (inibindo a proliferação de células do endométrio), ao mesmo tempo em que é capaz de conservar a atividade estrogênica sobre os receptores nos tecidos ósseos (sendo empregado no tratamento da osteoporose), além de provocar a redução da concentração de colesterol no sangue⁶⁵.

Por fim, a combinação das técnicas de cristalografia de proteínas e desenho de fármacos tem sido aplicada no intuito de desenvolver tiromiméticos de ação isoforma seletiva, explorando as diferenças estruturais existentes. Neste sentido já são conhecidos compostos de ação até 100 vezes mais seletiva para o TR β em relação ao TR α , havendo, entretanto, ainda muito trabalho a ser feito no sentido de se obter moléculas mais eficientes.

⁶⁴ Bourguet, W., Germain, P., and Gronemeyer, H. (2000) *Trends Pharmacol. Sci.* 21:381-8.

⁶⁵ Howell, S.J., Johnston, S.R., and Howell, A. (2004) *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 18:47-66.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. Expressão heteróloga, purificação, e estudos estruturais em solução e cristalográficos da porção DBD-LBD (desprovido da região A/B) dos receptores humanos dos hormônios tireoidianos isoforma $\beta 1$ (hTR $\beta 1$ DBD-LBD) e do ácido retinóico 9-*cis* isoforma α (hRXR α DBD-LBD).

Diversos estudos sobre as interações entre os receptores com o DNA, importantes para as respostas transcricionais, além de estudos sobre os coreguladores (coativadores e correpressores), que são cruciais para a transmissão dos sinais hormonais para a maquinaria transcricional, vêm aumentando muito o conhecimento sobre o mecanismo de regulação da expressão gênica efetuado pelos receptores nucleares.

As resoluções das estruturas cristalográficas dos domínios de ligação a ligante e DNA dos receptores nucleares têm auxiliado na definição das bases estruturais das funções destes receptores. Com o conhecimento das estruturas modulares destas proteínas, na presença e ausência de compostos específicos (ligantes, peptídeos coativadores, peptídeos correpressores, agonistas e antagonistas), tornou-se possível entender melhor diversos processos. Entretanto, ainda existem várias lacunas que não permitem uma compreensão completa destes sistemas. Assim, torna-se imprescindível buscar mais informações sobre a estrutura e o funcionamento destes receptores.

Nenhuma estrutura completa de um receptor nuclear, ou mesmo contendo somente os domínios DBD-LBD, foi determinada até então. O conhecimento das estruturas da porção DBD-LBD dos receptores TR $\beta 1$ e hRXR α traria respostas específicas e gerais sobre o modo de ação dos receptores.

Como já comentado, são conhecidas somente as estruturas cristalográficas e em solução dos domínios DBD e LBD isolados. Desta maneira, a resolução da estrutura contendo ambos domínios possibilitaria mostrar a relação espacial entre os módulos e a completa superfície de dimerização. O conhecimento de complexos de receptores com seus HREs permitiriam uma visão completa e funcional do que hoje somente se conhece em partes. Estas informações proporcionariam uma contribuição significativa para o entendimento da estrutura terciária e quaternária destas proteínas. Tais dados seriam de suma importância para o quadro de conhecimentos sobre a ação regulatória dos receptores nucleares.

Desta maneira realizou-se, tanto para a proteína hTR β 1 DBD-LBD, quanto para o hRXR α DBD-LBD (os quais contêm todas as funções requeridas para ligação do hormônio, interação com DNA e dimerização), as seguintes etapas de estudos:

- Transferência do inserto contendo a sequência codificante do RXR DBD-LBD para vetor de expressão em células procarióticas (a mesma construção já estava disponível para a proteína TR DBD-LBD).
- Ensaio para determinação de condições de expressão, expressão em larga escala e purificação das proteínas.
- Ensaio de cristalização das proteínas organizadas como homodímeros, heterodímeros, associadas e não associadas aos ligantes e aos HREs específicos.
- Determinação do envelope das proteínas em solução através do espalhamento de raios X a baixos ângulos (SAXS, *Small Angle X-Ray Scattering*).

- Estudos das condições de oligomerização em solução do receptor TR usando diferentes técnicas, explorando-se a influência do hormônio T3, dos domínios DBD e LBD e de mutações específicas.

1.2.2. Cristalização do domínio LBD de hTR β 1 com hormônios naturais e com um tiromimético β -seletivo

O potencial farmacológico dos receptores nucleares consiste, em parte, na habilidade de derivados sintéticos ou naturais de reproduzirem ou inibirem a atividade dos hormônios naturais. O uso dos ligantes naturais para propósitos terapêuticos é freqüentemente limitado devido a sua relativa especificidade ao alvo, o que resulta no desencadeamento de processos tóxicos quando esses ligantes são usados em doses farmacológicas. Desta maneira, agonistas e antagonistas sintéticos de muitos receptores nucleares já foram desenvolvidos e são constantemente usados como quimioterápicos de combate ao câncer, como fármacos imunossupressivos, antiinflamatórios, ou como reguladores de funções fisiológicas alteradas. A busca de agonistas e antagonistas seletivos tem se servido nos últimos tempos dos estudos cristalográficos. Estes, combinados com os estudos clássicos de busca de fármacos, é uma ferramenta poderosa e precisa para determinação de contatos moleculares cruciais entre ligante e proteína.

Dentro do contexto da busca de agonistas β -seletivos para o receptor TR, uma das plataformas de estudo do grupo do Prof. Igor Polikarpov, realizou-se a expressão, purificação, co-cristalização e resolução estrutural do domínio LBD de TR β 1 complexado com os agonistas naturais T3 e Triac e o tiromimético β -seletivo GC-1.

CAPÍTULO 2-DETERMINAÇÃO POR SAXS do ENVELOPE DO RECEPTOR hRXR α DBD-LBD

2.1. INTRODUÇÃO

2.1.1. OS RECEPTORES DO ÁCIDO RETINÓICO 9-*cis*

2.1.1.1. Caracterização e Expressão Diferencial das Isoformas

Existem três subtipos de receptores do ácido retinóico 9-*cis*. São eles os receptores RXR α , RXR β , RXR γ , cujos genes humanos estão localizados nos cromossomos 9, 6 e 1, respectivamente¹⁴.

A organização genômica e o promotor do gene RXR α não foram descritos até então¹⁴. Em camundongo, são conhecidas três isoformas deste subtipo (RXR α 1, RXR α 2 e RXR α 3), sendo elas divergentes no domínio A/B⁶⁶. As isoformas α 2 e α 3 são expressas especificamente nos testículos, sendo sua expressão neste tecido fortemente

⁶⁶ Brocard, J., Kastner, P., and Chambon, P. (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 229:211-8.

ativada durante a puberdade¹⁴. Não se conhece o mecanismo pelo qual estas isoformas são geradas, mas especula-se que seja em função do uso de promotores distintos.

Duas diferentes isoformas do subtipo RXR β foram identificadas em camundongos e em humanos (RXR β 1 e RXR β 2). Estas isoformas diferem na região A/B e são geradas através do uso alternativo de promotores^{67, 68}. Em humanos, identificou-se também uma terceira isoforma (RXR β 3), transcrita a partir de um promotor interno entre os exons 5 e 6⁶⁹. Não existe caracterização funcional destas isoformas.

Com relação subtipo RXR γ , até então foram identificadas duas diferentes isoformas em camundongos, chamadas RXR γ 1 e RXR γ 2, as quais diferem na região amino-terminal (A/B). Estas isoformas possuem expressão diferencial entre os tecidos. A isoforma RXR γ 1 é expressa em cérebro e tecido muscular, enquanto que a outra isoforma é altamente expressa nos músculos cardíacos e esqueléticos, mas muito pouco no fígado⁷⁰.

2.1.1.2. Os Elementos de Resposta ao 9-*cis* e a Ação dos RXRs

Estudos com receptores RXR produzidos *in vitro*, através do uso de lisados de reticulócitos, mostraram que estes receptores formam fortes homodímeros sobre elementos responsivos do tipo DR1. Entretanto, estas proteínas se ligam fracamente a elementos do tipo DR4 e DR5 baseados na sequência AGGTCA⁷¹. Esta propriedade de

⁶⁷ Fleischhauer, K., Park, J.H., DiSanto, J.P., Marks, M., Ozato, K., Yang, S.Y. (1992) *Nucleic Acids Res.* 20:1801.

⁶⁸ Nagata, T., Kanno, Y., Ozato, K., and Taketo, M. (1994) *Gene* 142:183-9.

⁶⁹ Rana, B., Pearson, A.D., and Redfern, C.P. (2001) *FEBS Lett.* 506:39-44.

⁷⁰ Liu, Q., and Linney, E. (1993) *Mol. Endocrinol.* 7:651-8.

⁷¹ Mader, S., Chen, J.Y., Chen, Z., White, J., Chambon, P., Gronemeyer, H. (1993) *EMBO J.* 12:5029-41.

ligação dos homodímeros foi confirmada com estudos realizados com proteína recombinante pura e funcionalmente homogênea (desprovidas da região A/B)⁷².

Um fato marcante no campo dos receptores nucleares foi a observação de que os receptores RXRs são parceiros de vários outros receptores nucleares, tais como o TR, RAR, VDR, PPARs, LXRs, FXR, PXR, CAR e alguns receptores órfãos¹⁴. A heterodimerização é importante para a função destes receptores. A ligação dos heterodímeros RXR/VDR, RXR/TR e RXR/RAR é feita em elementos do tipo DR com espaçamento de 3, 4 e 5 nucleotídeos, respectivamente. Os determinantes deste padrão de interação é dado não só pelo espaçamento, assim como também pelas seqüências dos meio-sítios. Outros elementos importantes são as regiões nas extremidades dos elementos responsivos^{20, 73, 74, 75}. A interface de dimerização, a qual está presente no domínio LBD, estabiliza, mas não muda o repertório de ligação que é ditado pelos DBDs¹⁴.

O RXR possui, portanto, a peculiaridade de estar envolvido em múltiplos mecanismos de transcrição, ora atuando como homodímeros ora como heterodímeros associado a parceiros diversos¹⁴.

A ligação dos homodímeros de RXR ao elemento DR1 acontece na ausência do ligante 9-*cis*, mas, contrariamente aos receptores TR, o *apo*-RXR não se associa ou se associa fracamente com correpressores, apresentando uma baixa atividade de repressão

76, 77, 78, 79, 80, 81

⁷² Chen, Z.P., Shemshedini, L., Durand, B., Noy, N., Chambon, P., Gronemeyer, H. (1994) *J. Biol. Chem.* 269:25770-6.

⁷³ Mader, S., Leroy, P., Chen, J.Y., Chambon, P. (1993) *J. Biol. Chem.* 268:591-600.

⁷⁴ Predki, P.F., Zamble, D., Sarkar, B., Giguere, V. (1994) *Mol. Endocrinol.* 8:31-9.

⁷⁵ Glass, C.K. (1994) *Endocr. Rev.* 15: 391-07.

⁷⁶ Schulman, I.G., Juguilon, H., Evans, R.M. (1996) *Mol. Cell Biol.* 16:3807-13.

Esta fraca ou inexistente interação se deve à posição da hélice 12 no receptor sem ligante, a qual impede estericamente a interação com CoRs. A deleção desta hélice torna o *apo*-RXR um repressor transcrricional^{82, 83}.

De fato, verificou-se a existência de uma região de interação com correpressores no RXR, mas esta região fica mascarada no contexto dos homodímeros de RXR. Mostrou-se também que, fisiologicamente, a heterodimerização do RXR com o *apo*-TR promove a liberação deste sítio de interação com CoRs em RXR. Este fato permite que o heterodímero TR/RXR reprima a transcrição gênica. Para explicar tal fenômeno propôs-se um mecanismo molecular que envolve a interação seqüência-específica entre a hélice H12 do RXR com a superfície de interação de CoAs do receptor TR. Neste modelo, a presença do T3 remove a H12 do RXR, em um processo que envolve a H12 do TR, e dissocia o CoR⁸². A hélice H12 possui uma seqüência tipo LXXML similar à região dos CoAs de associação aos receptores (**Figura 11**).

⁷⁷ Zhang, J., Zamir, I., Lazar, M.A. (1997) *Mol. Cell Biol.* 17:6887-97.

⁷⁸ Horlein, A.J., Naar, A.M., Heinzel, T., Torchia, J., Gloss, B., Kurokawa, R., Ryan, A., Kamei, Y., Soderstrom, M., Glass, C.K., Rosenfeld, M.G. (1995) *Nature* 377:397-404.

⁷⁹ Chen, J.D., and Evans, R.M. (1995) *Nature* 377:454-7.

⁸⁰ Seol, W., Mahon, M.J., Lee, Y.K., and Moore, D.D. (1996) *Mol. Endocrinol.* 10:1646-55.

⁸¹ Martin, B., Renkawitz, R., and Muller, M. (1994) *Nucleic Acids Res.* 22:4899-905.

⁸² Zhang, J., Hu, X., and Lazar, M.A. (1999) *Mol. Cell Biol.* 19:6448-57.

⁸³ Marimuthu, A., Feng, W., Tagami, T., HOA Nguyen, H., Jameson, J.L., Fletterick, R.J., Baxter, J.D., and West, B.L. (2002) *Mol. Endocrinol.* 16:271-86.

Figura 11. Mecanismo proposto para repressão transcricional exercida pelo heterodímero TR/RXR⁸².

Especula-se que a heterodimerização do receptor *apo*-RAR com RXR seja feita da mesma maneira, uma vez que estudos bioquímicos sugerem que a hélice H12 de RXR interage com o sítio de ligação de CoAs do RAR⁸⁴. Neste estudo, verificou-se que o recrutamento do peptídeo contendo o motivo LXXLL do coativador SRC-1 para o receptor RAR, na presença de ligante, promove a remoção da hélice 12 do RXR. O reposicionamento da H12 de RXR permite também a interação deste receptor com um ligante, o que por sua vez cria superfície para interação de outro peptídeo LXXLL no RXR. Este mecanismo explica o sinergismo que ocorre na ativação transcricional quando ambos receptores estão ligados, e porque o RAR deve ser o primeiro a se associar com o ligante⁸⁴.

Os complexos TR/RXR, RAR/RXR e VDR/RXR pertencem ao grupo dos chamados heterodímeros não-permissivos. Este tipo de heterodímero pode ser ativado

⁸⁴ Westin, S., Kurokawa, R., Nolte, R.T., Wisely, G.B., McInerney, E.M., Rose, D.W., Milburn, M.V., Rosenfeld, M.G., and Glass, C.K. (1998) *Nature* 395:199-02.

inicialmente somente pelo agonista do parceiro, não podendo ser ativado pelo 9-*cis* isoladamente; este último, entretanto, pode agir de maneira a aumentar a ativação. Uma peculiaridade destes heterodímeros é que o RXR encontra-se ligado ao hexâmero AGGTCA da posição 5'¹⁶.

No entanto, heterodímeros de RXR com os receptores PPAR γ ^{85, 86}, LXR⁸⁷, NGFI-B⁸⁸ e FXR⁸⁹ podem ser ativados pelo ácido 9-*cis* retinóico, pelo ligante do parceiro ou sinergicamente por ambos. Desta maneira considera-se que estes heterodímeros são permissíveis a ação do ácido retinóico 9-*cis*. Neste grupo de heterodímeros, a polaridade de ligação é invertida, ou seja, o RXR liga-se ao hexâmero AGGTCA situado na posição 3'. Uma exceção é o heterodímero LXR/RXR, que, apesar de permissivo, tem o RXR ocupando o hexâmero 5'^{87, 90}.

O receptor PPAR γ interagiu fracamente com os correpressores NCoR e SMRT em estudos de *GST pull-down*, não apresentando interação com estes correpressores quando heterodimerizado com RXR e associado ao DNA. Este receptor também não é capaz de reprimir a transcrição^{91, 92}. Estudos de complementação de função *in vivo* mostraram que o receptor RXR não possui a capacidade de tornar PPAR um repressor. De fato, verificou-se que a H12 do RXR não interage com PPAR. Em contrapartida, a deleção da H12, tanto do RXR, quanto dos RXR e PPAR, permitiu a interação com CoRs e

⁸⁵ Schulman, I.G., Shao, G., and Heyman, R.A. (1998) *Mol. Cell Biol* 18:3483-94.

⁸⁶ Kliewer, S.A., Umesono, K., Noonan, D.J., Heyman, R.A., Evans, R.M. (1992) *Nature* 358:771-4.

⁸⁷ Willy, P.J., Umesono, K., Ong, E.S., Evans, R.M., Heyman, R.A., and Mangelsdorf, D.J. (1995) *Genes Dev.* 9:1033-45.

⁸⁸ Perlmann, T., and Jansson, L (1995) *Genes Dev.* 9:769-82.

⁸⁹ Repa, J.J., and Mangelsdorf, D.J. (1999) *Curr. Opin. Biotechnol.* 10:557-63.

⁹⁰ Willy, P.J., and Mangelsdorf, D.J. (1997) *Genes Dev.* 11:289-98.

⁹¹ Reginato, M.J., Bailey, S.T., Krakow, S.L., Minami, C., Ishii, S., Tanaka, H., and Lazar, M.A. (1998) *J. Biol. Chem.* 273:32679-84.

⁹² Zamir, I., Zhang, J., and Lazar, M.A. (1997) *Genes Dev* 11:835-46.

repressão da transcrição⁸². É interessante notar que, contrariamente ao heterodímero RAR/RXR, onde a ligação de agonistas deve acontecer primeiramente no RAR e então no RXR^{16, 81}, fato que está associado com a interação da H12 de RXR com o sítio de CoAs de RAR, o heterodímero PPAR/RXR liga o agonista de um ou outro receptor de maneira independente¹⁶.

Os receptores RXR possuem duas funções de transativação autônomas: a AF-1 na região A/B, e a AF-2 no LBD^{93, 94}. A função AF-1 ocorre independente da presença de ligante, enquanto que a AF-2 depende da ligação do 9-*cis*. Em RXR γ verificou-se que tanto as funções AF-1 quanto AF-2 podem ser ativadas por fosforilação nestes sítios, e que estas duas funções agem de maneira cooperativa na ativação da transcrição⁹⁴. Dado que a região A/B é extremamente variável entre as diferentes isoformas, especulou-se, e de fato tem-se verificado, que estas isoformas possuem atividade dependente do tipo celular e da região promotora⁹⁴. RXR α também é uma fosfoproteína, sendo alvo da via da MAP quinase. A fosforilação em suas regiões A/B e D/E inibem a atividade transcricional deste receptor⁹⁵.

Devido ao amplo repertório de parceria que o receptor RXR apresenta, este receptor possui um grande número de alvos gênicos em potencial, além dos promotores controlados pelos homodímeros de RXR. Na presença de ligante, tanto o homodímero quanto os heterodímeros de RXR são ativadores da transcrição. Foi proposto que o

⁹³ Nagpal, S., Friant, S., Nakshatri, H., and Chambon, P. (1993) *EMBO J.* 12:2349-60.

⁹⁴ Dowhan, D.H., and Muscat, G.E. (1996) *Nucleic Acids Res.* 24:264-71.

⁹⁵ Lee, H.Y., Suh, Y.A., Robinson, M.J., Clifford, J.L., Hong, W.K., Woodgett, J.R., Cobb, M.H., Mangelsdorf, D.J., Kurie, J.M. (2000) *J. Biol. Chem.* 275:32193-9.

ligante 9-*cis* potencializa a ligação dos homodímeros de RXR aos elementos DR1⁹⁶, não tendo sido este comportamento confirmado com o estudo de proteínas recombinantes purificadas⁷².

A ativação requer o recrutamento de fatores gerais de transcrição e de coativadores, em um mecanismo comum aos outros receptores nucleares¹⁴. Os receptores RXR recrutam de maneira dependente de agonista os coativadores da família p160 SRC-1, TIF2 (*Transcription Intermediary Factor 2*), ACTR (*Acetyltransferase*, ou SRC-3), além de se ligarem à TRAP220, CBP/p300 e outras proteínas que podem ter efeito na atividade transcricional¹⁴. Como os receptores presentes nos heterodímeros interpretam a presença do agonista é ainda alvo de discussões e de grandes esforços científicos. Sabe-se que duas moléculas de TIF2 se ligam de maneira cooperativa no heterodímero TR/RXR, mesmo na presença de somente um ligante⁹⁷.

2.1.1.3. A Capacidade de Tetramerização do RXR α

Estudos de auto-associação do receptor RXR α em solução revelaram que este receptor forma homotetrâmeros em solução. Estes tetrâmeros se associam com alta afinidade e de uma maneira cooperativa, se tornando a espécie predominante em concentrações entre 50-100nM. Mostrou-se também que a ligação do agonista ao RXR leva a uma rápida dissociação dos tetrâmeros para monômeros e dímeros^{98, 99, 100}.

⁹⁶ Zhang, X.K., Lehmann, J., Hoffmann, B., Dawson, M.I., Cameron, J., Graupner, G., Hermann, T., Tran, P., Pfahl, M. (1992) *Nature* 358:587-91.

⁹⁷ Leers, J., Treuter, E., and Gustafsson, J.A. (1998) *Mol. Cell Biol.* 18:6001-13.

⁹⁸ Kersten, S., Kelleher, D., Chambon, P., Gronemeyer, H. and Noy, N. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92:8645-49.

⁹⁹ Kersten, S., Pan, L., Chambon, P., Gronemeyer, H., and Noy, N. (1995) *Biochemistry* 34:13717:721.

¹⁰⁰ Kersten, S., Pan, L., and Noy, N. (1995) *Biochemistry* 34:14263:69.

Tetrâmeros de RXR α e RXR γ possuem um papel funcional na regulação do gene CRBP II (*Cellular Retinol-Binding Protein II*)¹⁰¹. A regulação da expressão é feita por vários elementos de resposta que são fracamente reconhecidos por dímeros destes RXRs. Desta maneira, a formação cooperativa de tetrâmeros no promotor deste gene é essencial para a sua ativação via 9-*cis*¹⁰². Outro trabalho mostrou que os tetrâmeros de RXR exibem grande plasticidade funcional, podendo se ligar a elementos de resposta com diferentes orientações e espaçamento dos meio-sítios. Esta oligomerização contribui de maneira sinérgica para a ativação transcricional¹⁰³.

Demonstrou-se que tetrâmeros de RXR podem se ligar com alta afinidade a elementos de resposta contendo somente um DR1. A formação do complexo tetrâmero/DR1 requer uma estequiometria de ligação de 2 DR1/1 tetrâmero. A presença do agonista induz a dissociação do complexo tetrâmero/DNA, concomitantemente com o aumento da população de dímeros de RXR ligados à DR1¹⁰⁴. Outro trabalho, entretanto, forneceu evidências de que a ligação simultânea de dois elementos de resposta, por si, desestabiliza o complexo de tetrâmero com o DNA, resultando na formação de homodímeros de RXR ligado à DR1¹⁰⁵.

A região do RXR α de camundongo responsável por mediar a formação de tetrâmeros foi identificada através de estudos mutacionais e ensaios *in vitro*. Estes

¹⁰¹ Mangelsdorf, D.J., Umesono, K., Kliewer, S.A., Borgmeyer, U., Ong, E.S., Evans RM. (1991) *Cell* 66:555-61.

¹⁰² Chen, H., and Privalsky, M.L. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92:422-6.

¹⁰³ Lin, B.C., Wong, C.W., Chen, H.W., and Privalsky, M.L. (1997) *J. Biol. Chem.* 272:9860-7.

¹⁰⁴ Kersten, S., Gronemeyer, H., and Noy, N. (1997) *J. Biol. Chem.* 272:12771-77.

¹⁰⁵ Chen, Z.P., Iyer, J., Bougert, W., Held, P., Mioskowski, C., Lebeau, L., Noy, N. Chambon, P., and Gronemeyer, H. (1998) *J. Mol. Bio.* 275:555-65.

estudos indicaram duas fenilalaninas consecutivas, sendo elas a F443 e a F444 (F438 e F439 no RXR de humanos). Mutações nestes resíduos impediram a formação de tetrâmeros, mas prejudicaram a atividade transcricional do receptor RXR, conforme foi mostrado em estudos *in vivo*¹⁰⁶.

As conseqüências funcionais da propriedade de auto-associação do RXR α de camundongo também foram avaliadas por outro estudo envolvendo mutantes. Um destes mutantes (R321A) formou tetrâmeros que não se dissociam na presença de 9-*cis* e não se associam com coativador p/CIP, não ativando a transcrição mediante o ligante. O outro mutante (F318A) se associou como dímero, mas não como tetrâmero, apresentando alta atividade transcricional mesmo na ausência de ligante. Estes resultados apontaram que o processo de auto-inativação dos tetrâmeros é feito pelo mascaramento da região do RXR importante para a interação com CoAs¹⁰⁷. O mutante homólogo à este último em humano (F313A) mostrou ser constitutivamente ativo¹⁰⁸, enquanto que o mutante de camundongo apresentou, na ausência de ligante, uma atividade equivalente a 45% da atividade do receptor selvagem. Esta atividade foi aumentada pela presença do ligante até os níveis da proteína selvagem¹⁰⁷. O resíduo F313 de hRXR α estabiliza a porção carboxi-terminal do receptor, estando envolvido na manutenção do alinhamento espacial da hélice H11 com a H5¹⁰⁸.

Por fim, as estruturas cristalográfica e em solução (dada por SAXS) do tetrâmero do LBD do receptor RXR revelaram os detalhes moleculares da organização tetramérica

¹⁰⁶ Kersten, S., Reczek, P. and Noy, N. (1997) *J. Biol. Chem.* 272:29759-68.

¹⁰⁷ Kersten, S., Dong, D., Lee, W. Reczek, P. and Noy, N. (1998) *J. Mol. Biol.* 284:21-32.

¹⁰⁸ Vivat, V., Zechel, C., Wurtz, J.M., Bourguet, W., Kagechika, H., Unemiya, H., Shudo, K., Moras, D., Gronemeyer, H. and Chambon, P. (1997) *EMBO J.* 16, 5697-5709.

deste receptor^{109, 110}. Os resultados obtidos mostraram que os quatro monômeros se organizam em uma estrutura compacta em forma de disco, com dois homodímeros simétricos empacotados um contra o outro pelas regiões C-terminal dos monômeros (**Figura 12**). A estrutura obtida em solução difere da estrutura cristalográfica com relação à disposição relativa dos homodímeros. O modelo de tetrâmero construído com bases nos dados de SAXS apontou que os dímeros estão rotados 60° um em relação ao outro, enquanto que a estrutura cristalográfica apresentou um tetrâmero mais plano (**Figura 12C**).

Figura 12. Estrutura cristalográfica e proposta através de dados de SAXS do tetrâmero do LBD de RXR. (A) Estrutura cristalográfica representada como *cartoon* do LBD do RXR α 1 humano associado como tetrâmero; em vermelho a hélice H3, em azul a H11 e em magenta a H12, mostrando as regiões de contato tetramérico¹⁰⁹ (PDB ID 1G1U). (B) Mesma estrutura representada como superfície de *van der Waals* dos átomos que a compõe. (C) Modelo proposto para o tetrâmero do LBD do hRXR α 1 com base na estrutura cristalográfica do homodímero de LBD do apo-RXR e nos dados de espalhamento de raios X da molécula em solução¹¹⁰. Note a diferença na disposição relativa dos dois homodímeros que observa quando se compara a estrutura cristalográfica com a “estrutura” em solução. Para obtenção da melhor solução para o arranjo entre os dois dímeros, rotou-se 60° anti-horário o dímero superior em relação inferior (à partir do ponto onde alinhou-se os eixos de simetria de ordem 2 de ambos dímeros), e distanciou-se seus centros de massa em 41.5Å.

¹⁰⁹ Gampe, R.T., Montana, V.G., Lambert, M.H., Wisely, G.B., Milburn, M.V., Xu H.E. (2000) *Genes Develop.* 14:2229-41.

¹¹⁰ Egea, P.F., Rochel, N., Birck, C., Vachette, P., Timmins, P.A., Moras, D. (2001) *J. Mol. Biol.* 307:557-76.

Em adição à interface de dimerização, cada monômero contribui com três áreas distintas, as quais compõe a interface de tetramerização: o contato H3/H3, o contato H11/H11 e o contato AF2/sítio de coativador.

A interface H3/H3 é composta pelo amino-terminal do H3 de um monômero do dímero superior (em verde, **Figura 12A**), resíduos 264-269 do monômero B1, por exemplo, e o amino-terminal do H3 do monômero adjacente, resíduos 269-273 do monômero B2 (em branco, **Figura 12A**). O núcleo desta interface é composto pelos contatos de van der Waals entre a cadeia lateral de B1:V265 e os resíduos A272 e D273 do monômero B2 (**Figura 13A**). Estas interações hidrofóbicas centrais são cercadas pela interação polar entre cada C269 em ambos monômeros (de fato, é interessante notar que o arquivo de coordenadas do PDB evidencia uma ponte de sulfeto entre estas cisteínas), e as interações entre os prótons da amida da cadeia principal dos resíduos 265 e 266 da molécula B1:H3, com a cadeia lateral de B2:D273. Há ainda uma ponte de hidrogênio entre as cadeia laterais dos resíduos D273 e T266¹⁰⁹.

Figura 13. (A) Interação H3/H3 entre os monômeros B1 e B2. (B) Interação H11/H11 entre os monômeros B1 e B2. (C) Interação AF2/sítio de ligação do coativador entre os monômeros B1 e B2.

A estrutura cristalográfica mostrou que cada monômero ocupa um-quarto do complexo em forma de disco, sendo a interface dimérica constituída principalmente pela hélice H10 de cada monômero. A hélice H11 (em azul) de cada monômero do dímero superior (em verde, **Figura 12A**) está empacotada contra a correspondente H11 do dímero de baixo (em branco, **Figura 12A**), formando o núcleo da interface tetramérica. A hélice H12 (em magenta, **Figura 12A**), que contém a função AF-2, segue a H11 e se projeta dos monômeros de um dímero, fazendo contato com o sítio de ligação de coativador dos monômeros do outro dímero. Nesta configuração, cada monômero de um

dímero reprime a ligação de coativador no monômero correspondente do outro dímero. Desta maneira, evidencia-se o esquema de autorepressão do tetrâmero de RXR que já havia sido detectado pelos estudos funcionais¹⁰⁹.

A hélice H11 é composta pelos resíduos 436-442, sendo predominantemente formada por grandes resíduos hidrofóbicos. Quatro dos seis resíduos (F437, F438, L441 e I442) (**Figura 13B**) fazem face ao interior hidrofóbico da proteína, enquanto que os outros dois resíduos, L436 e F439, estão voltados para fora de proteína, fazendo parte da interface de tetramerização do complexo¹⁰⁹.

A interface AF2/sítio de interação de coativador é constituída pela hélice H12 de um monômero, a qual bloqueia o sítio de interação de coativador do monômero adjacente (**Figura 13C**). Os resíduos da AF2 (451 - LMEML - 455) formam um motivo semelhante ao motivo conservado encontrado nos coativadores (LXXLL), fazendo, inclusive, contatos semelhantes. Como no caso para a ligação do coativador, as cadeias laterais hidrofóbicas dos resíduos da hélice AF2 (L451, M454 e L455) se ajustam diretamente dentro da cavidade hidrofóbica formada pelas hélices H3 e H4. O grupo carbonil da L455 faz uma ponte de hidrogênio com a cadeia lateral do resíduo K284 da H3. Um par de pontes salinas também é formado entre o D448 da H12 e o R302 da H4. Estas pontes são responsáveis pela estabilização da interface de interação AF2/sítio de ligação de coativador¹⁰⁹.

O conjunto de todos estes estudos funcionais feitos *in vitro* e *in vivo* e das estruturas obtidas por cristalografia e por SAXS comprovam a capacidade do RXR de se autotetramerizar em solução. Alguns trabalhos também acenam para sua habilidade de formar tetrâmeros sobre o DNA, sendo os monômeros capazes de se associar

cooperativamente e atuando de forma sinérgica na função de ativação transcricional. A forma como estes tetrâmeros se organizam quando ligados ao DNA não é conhecida, mas parece envolver a região A/B¹⁰¹. Os tetrâmeros que se formam em solução, a que todos os dados indicam, funcionam como armazenadores transcricionalmente inativos de monômeros e dímeros. As bases moleculares na inatividade residem nas interações simultâneas da hélice H12 do monômero de um dímero com o sítio de ligação de CoAs do monômero do dímero adjacente. Na presença do ligante *9-cis*, a hélice H12 de cada monômero é reposicionada, se empacota contra o corpo do monômero, completando o bolsão de ligação (LBP) e formando a superfície de interação de CoAs. Desta maneira, dissociam-se os monômeros e/ou dímeros do tetrâmero, os quais estão aptos a ativar a transcrição.

Se os tetrâmeros que se formam em solução são diferentes dos que se associam ao DNA é uma questão intrigante a se responder. Uma das maneiras de se responder a esta e a outras perguntas é através da determinação da estrutura cristalográfica ou o envelope da proteína em solução (através de SAXS) do receptor RXR α contendo os domínios necessários à ligação ao DNA e ao ligante. Em ordem de precisão e riqueza de informações, certamente a cristalografia de proteínas se antevém ao SAXS ou qualquer outra técnica de determinação estrutural de baixa resolução (de cerca de 10Å ou mais). O SAXS fornece um envelope médio da estrutura protéica em solução, enquanto que a cristalografia de proteínas define coordenadas espaciais da posição de cada átomo dentro da estrutura. Idealmente, estas duas técnicas devem se complementar já que não se pode desconsiderar a possibilidade de mudanças na estrutura terciária ou quaternária, de uma proteína, induzidas pelo empacotamento cristalino.

Neste sentido, realizaram-se ensaios de cristalização do receptor hRXR α DBD-LBD. Paralelamente, determinou-se, pela técnica de SAXS, o envelope em solução do dímero e do tetrâmero deste receptor. Este último trabalho foi realizado em estreita colaboração com o então aluno de doutoramento do Instituto de Física da USP/SP Hannes Fischer, orientado pelo Prof. Aldo Craievich. Os resultados foram publicados na revista *Journal of Biological Chemistry*, estando o artigo referente anexado no **Anexo 1**. Uma vez que toda a metodologia empregada, assim como os resultados e conclusões, estão descritos no artigo, optou-se por não reproduzi-los neste capítulo.

Será feita neste capítulo uma breve descrição das metodologias relativas à cristalização de macromoléculas e de espalhamento de raios X a baixos ângulos. Além disto será relatado os ensaios de cristalização desta proteína e os resultados obtidos.

2.2. METODOLOGIA

2.2.1. CRISTALIZAÇÃO DE MACROMOLÉCULAS

Uma das partes críticas na resolução da estrutura por raios X de uma macromolécula biológica é a cristalização da mesma. A cristalização de proteínas, como qualquer cristalização, é um processo de múltiplos parâmetros, que envolve os três passos clássicos do processo, que são: nucleação, crescimento e cessação de crescimento. O que faz com que o processo de cristalização de macromoléculas biológicas seja diferente do processo de cristalização de moléculas pequenas é o envolvimento de um número de parâmetros muito maior, relativo às propriedades físico-químicas destes compostos. Mas a principal diferença entre crescimento de cristais de pequenas moléculas e cristais de macromoléculas biológicas é a flexibilidade conformacional e a versatilidade química dessas macromoléculas e, conseqüentemente, sua maior sensibilidade às condições externas. Por exemplo, a estabilidade ótima destas macromoléculas em meio aquoso depende de uma faixa estreita de pH.

A cristalização e precipitação de macromoléculas são processos relacionados. Ambos envolvem a diminuição da solubilidade das macromoléculas. Os dois processos diferem em suas cinéticas e este fato deve ser utilizado em favor da formação de cristais. A cristalização de uma macromolécula acontece através da diminuição lenta da solubilidade; se o processo ocorre muito rapidamente acontece a precipitação.

A estabilidade das macromoléculas biológicas em solução baseia-se na competição entre as interações solvente-soluto e as interações intramoleculares, as quais são necessárias para manter a estrutura da macromolécula. O balanço das interações que

controlam a solubilidade e/ou a conformação de uma macromolécula podem ser modificadas pelos seguintes parâmetros¹¹¹:

- Temperatura. O aumento da temperatura aumenta a desordem das moléculas de solvente e permite também que conformações da macromolécula de mais alta energia livre total se formem.
- pH. Como a temperatura, variações no pH afetam ambos soluto e solvente. Todavia, alterações das concentrações de H^+ e OH^- são minoritárias se comparadas com a protonação e desprotonação de grupos da macromolécula.
- Sais. Sais podem agir de diferentes formas. (i) Eles são responsáveis pela força iônica, e desta forma afetam as interações eletrostáticas da macromolécula por meio de blindagem de cargas. (ii) Eles podem formar interações eletrostáticas diretas com resíduos carregados na superfície das macromoléculas. (iii) Sais podem agir através de interações monopolo-dipolo com grupos dipolares da macromolécula biológica.
- Competidores de ligações de hidrogênio. Moléculas que possuem um potencial para formar ligações de hidrogênio competem, a alta concentração, com ligações de hidrogênio da água e ligações de hidrogênio intramoleculares na proteína.
- Aditivos hidrofóbicos. Eles podem agir diretamente com partes hidrofóbicas da macromolécula e podem também alterar a estrutura do solvente. Detergentes não-iônicos agem desta forma.
- Solventes orgânicos. A adição de solventes orgânicos implica na modificação da constante dielétrica e acarreta variações em diversas interações.

¹¹¹ von Hippel, P.H., and Schleich, T.W. *Biological Macromolecules Vol. II*, G.D. Fasman and S.N. Timasheff, eds., Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 417-584, 1969.

Em baixas concentrações o efeito do sal é conhecido como *salting in* e age no sentido de aumentar a solubilidade da proteína. Deste modo pode-se solubilizar uma proteína em uma solução com baixa força iônica. À medida que se aumenta a concentração de sal, diminui-se a solubilidade da proteína. Em altas concentrações de sal, a solubilidade torna-se uma função linear da força iônica da solução.

Além disto, as proteínas são polieletrólitos com uma carga líquida total que varia com o pH. Quando a carga é quase neutra (ponto conhecido como ponto isoelétrico ou PI) a proteína é menos solúvel. Deste modo pode ser útil trabalhar com valores de pH variando em torno do valor do PI da proteína.

Existem muitos métodos usados na cristalização de macromoléculas. Dentre todos esses, os métodos de cristalização mais frequentemente usados são as técnicas de difusão de vapor, em particular a técnica de *hanging drop* (gota pendurada)¹¹². Nesta técnica, uma pequena gota de cerca de 2-10 µl de proteína é misturada com um volume igual ou similar de solução de cristalização (formada usualmente por tampão, sal e precipitante) e colocada sobre uma lamínula siliconizada. A lamínula é invertida e selada sobre um reservatório contendo 500-1000µl de solução de cristalização. A diferença de concentração de solutos entre a gota e o reservatório direciona o sistema, devido à diferença de potencial químico, no sentido de um equilíbrio de concentração entre a gota e a solução do reservatório. Isto se dá por difusão através da fase de vapor da solução menos concentrada (da gota) para a de maior concentração (a do poço). O equilíbrio contra uma solução de sal é mais rápido (2 a 10 dias para uma gota de 10 µl) do que contra uma solução de PEG (Polietilenoglicol), o qual pode levar até 25 dias. Em um

¹¹² Hampel, A., Labananskas, M., Connors, P.G., Kirkegard, L., Raj Bhandary, U.L., Sigler, P.B., and Bock, R.M. (1968) *Science* 162:1384-87.

experimento perfeitamente delineado, a proteína se torna supersaturada e o cristal começa a se formar quando a gota e o reservatório estão perto, ou no equilíbrio (**Figura 14**).

Figura 14. Método da gota suspensa para a cristalização de proteínas.

A gota de cristalização é composta pela solução do poço (que contém, normalmente, um agente tamponante, sal e um precipitante) e a solução da proteína. Uma vez montada sobre uma laminula, a gota é colocada sobre o reservatório. A diferença na concentração de solutos entre a solução do poço e a da gota (a qual foi diluída pela solução do poço) induz a evaporação da água da gota, aumentando lentamente a concentração da proteína e podendo induzir a sua cristalização.

Uma vez que a temperatura também afeta a solubilidade de todas as substâncias em solução é importante preparar cristais à temperatura constante. A aparência dos cristais *não* é importante, cristais que parecem mais perfeitos macroscopicamente, isto é, como suas faces bem determinadas, podem não difratar e cristais que macroscopicamente não parecem excelentes podem difratar até alta resolução ($> 2\text{\AA}$).

Somente o experimento de difração pode determinar se um cristal é realmente apropriado para estudos cristalográficos.

2.2.2. ESPALHAMENTO DE RAIOS X A BAIXOS ÂNGULOS

2.2.2.1. Breve Teoria

Acompanhando os avanços na área experimental, verifica-se que novas abordagens teóricas e computacionais foram desenvolvidas recentemente para tratamento e interpretação de dados de espalhamento de raios X a baixos ângulos. Estas técnicas têm permitido uma análise detalhada da estrutura global das proteínas, assim como a determinação direta do envelope molecular¹¹³, predição de estruturas quaternárias em oligômeros¹¹⁴ e verificação de possíveis diferenças entre as estruturas no seu estado cristalino e em solução.

SAXS é uma técnica que nos fornece informações estruturais de flutuações ou heterogeneidades na densidade eletrônica com dimensões características da ordem de 10 a 1000Å. Numerosos tipos de materiais apresentam heterogeneidades nesta escala: ligas metálicas, copolímeros, colóides, micelas, micro-emulsões, materiais nanoporosos, cristais líquidos e soluções de macromoléculas biológicas (proteínas, ribossomos, DNAs, vírus). Em palavras simples, as pesquisas de macromoléculas biológicas em solução por SAXS fornecem informações sobre a forma externa das mesmas.

Em um experimento de SAXS, as ondas eletromagnéticas associadas aos raios X incidentes provocam oscilações dos elétrons dos átomos componentes da amostra

¹¹³ Svergun, D.I., Volkov, V.V., Kozin, M.B., and Stuhrmann, H.B. (1996) *Acta Cryst.* A52:419-26.

¹¹⁴ Svergun, D.I., Koch, M.H., and Serdyuk, I.N. (1994) *J. Mol. Biol.* 240:66-77.

irradiada. Quando a energia dos fótons incidentes é bem diferente da energia de ligação dos elétrons, estes elétrons comportam-se, então, como se fossem livres. As partículas livres carregadas oscilantes produzem ondas espalhadas coerentes com a onda incidente em todas as direções. A intensidade $I(q)$ produzida por um sistema monodisperso diluído de macromoléculas em solução é proporcional a amplitude de espalhamento da macromolécula, promediada para todas as orientações.

No caso dos raios X, o espalhamento dos elétrons é mais significativo que o dos prótons, uma vez que a massa dos prótons é muito maior. Por isso, somente o espalhamento pelos elétrons é considerado.

As macromoléculas biológicas são essencialmente compostas por átomos leves (H, C, N, O e P, no caso de ácidos nucleicos), e, uma vez estando solubilizadas em água, ocorre pouca diferença na densidade eletrônica (ou no contraste) entre a molécula e o solvente. Portanto, estes tipos de soluções produzem um espalhamento muito fraco. Isto explica imediatamente a grande vantagem de se usar feixes de raios X produzidos por fontes síncrotron. Estas fontes possuem um fluxo de fótons muito maior do que aparelhos de raios X convencionais.

No caso de espalhamento de partículas em solução, a amostra é isotrópica, ou seja, as partículas estão em movimento browniano e podem assumir todas orientações possíveis em relação ao feixe incidente. Assim, temos acesso experimental somente a média esférica para todas orientações da macromolécula.

Um parâmetro estrutural interessante utilizado na análise de mudanças conformacionais de macromoléculas em solução é o raio de giro (R_g). O R_g é definido

como sendo a raiz quadrada da distância quadrática média r entre os elétrons da partícula e o centro de massa eletrônico do objeto espalhador.

O valor de R_g pode ser obtido a partir da porção da curva de espalhamento a muito baixos q 's (o valor de q está relacionado ao ângulo de espalhamento), para a qual é válida a aproximação de Guinier¹¹⁵. O R_g é um parâmetro útil na investigação de proteínas em solução que sofrem variações conformacionais em função de, por exemplo, variação nas condições da solução. Um aumento ou diminuição do R_g pode indicar uma mudança nas posições relativas entre os átomos ou domínios que compõem a macromolécula. Note-se que para obter o raio de giro da proteína, utiliza-se apenas uma parte da informação experimental, correspondente ao limite de ângulos de espalhamento pequenos.

Muitas vezes interessa o estudo de variações rápidas de configuração molecular e são necessárias medidas de intensidade de espalhamento em tempos curtos, por exemplo 1 segundo ou menos. Nestes casos (estudos resolvidos no tempo), apenas na região de baixos q a intensidade é suficientemente precisa. Pode-se assim determinar a evolução do R_g no tempo, a partir da lei de Guinier, e isto, às vezes, é suficiente para detectar e caracterizar variações conformacionais rápidas. Esse mesmo parâmetro pode ser obtido a partir da função distribuição de distâncias $p(r)$.

Os dados coletados de intensidade de espalhamento de raios X em função do ângulo incidente podem também ser usados para o cálculo da função de distribuição de distâncias, ou função de distribuição de pares $p(r)$. Para partículas homogêneas, a $p(r)$ é

¹¹⁵ Guinier, A. (1939) Ann. Phys. 12, 161.

o histograma de distâncias entre todos pares de pontos (elementos de volume) da amostra (**Figura 15**). Uma boa análise da $p(r)$ pode-nos fornecer uma idéia do tamanho e a forma da proteína.

Figura 15. Função de distribuição de distâncias.

A função de distribuição de distâncias inclui toda a informação estrutural que é possível ser obtida a partir de uma curva de SAXS. Com esta função pode-se construir *ab initio* um envelope ou modelo de *beads*, por exemplo, da proteína. É possível calcular, então, o espalhamento teórico desta estrutura, e compará-lo com o obtido a partir da função experimental $I(q)$. Um bom acordo indicaria que o modelo proposto é aceitável. Alternativamente, pode-se propor um modelo estrutural da proteína, com base em estruturas cristalográficas, calcular a função $I(q)$ associada à mesma e compará-la com a obtida experimentalmente. Também neste caso um bom acordo indica que o modelo é consistente.

A **Figura 16** ilustra a relação entre a função $p(r)$ e a forma da partícula espalhadora. Nesta figura, foram selecionadas 10 macromoléculas diferentes, umas

esferoidais como a F e a I, outras com domínios afastados uns dos outros como A e J, outras prolatas como C, D, E e H e uma oblata (B).

Figura 16. Diversas macromoléculas e suas respectivas funções de distribuição de distâncias.

2.2.2.2. Determinação *ab initio* do Envelope Estrutural de Macromoléculas Biológicas

O programa DAMMIN¹¹⁶ permite a determinação de uma estrutura de baixa resolução, *ab initio*, da proteína em solução. Esta estrutura obtida corresponde a uma média das orientações desta proteína. O objetivo é encontrar uma solução que se ajuste aos dados experimentais, e, ao mesmo tempo, minimize a área interfacial (da partícula com o solvente).

O programa parte de uma proteína modelo esférica (de raio $R = D_{max}$) composto por N esferas menores (ou “pseudoátomos”, chamados de átomos *dummy*) de raio $r_0 \ll R$. Em seguida, começa o processo de minimização da curva de espalhamento gerado a partir do modelo e a curva experimental, utilizando-se do método de *simulated annealing*. Pretende-se encontrar no fim do processo de minimização (da diferença entre a curva experimental e a calculada a partir do modelo) uma forma o mais parecida possível da macromolécula.

Como a técnica de SAXS fornece somente uma resolução de no máximo 10Å, a resolução do envelope da proteína limita-se em torno deste valor, quando se consegue curvas de espalhamento de alta qualidade. Entretanto isto nem sempre é possível devido a problemas técnicos de ordem experimental ou estabilidade da proteína. Contornando as dificuldades, consegue-se facilmente uma resolução de 20-30Å que é suficiente para identificar inequivocamente, em muitos casos, a forma aproximada da proteína, bem como o volume ocupado por subdomínios e grupos atômicos da proteína.

¹¹⁶ Svergun, D. I. (1999) *Biophys. J.* 76:2879-86.

Outros procedimentos *ab initio* para determinação da forma de macromoléculas em solução têm sido propostos. Um destes usa um algoritmo genético para produzir modelos descritos por esferas densamente empacotadas¹¹⁷. Outro método constrói um envelope de baixa resolução em termos de esféricos harmônicos, sendo implementado pelo programa SASHA^{113, 118, 119}.

Uma nova metodologia representa a proteína através de um agrupamento de resíduos *dummy* (DR, *Dummy Residues*) centrados nos átomos de C_{α} , e usa *simulated annealing* para construir um modelo de DR de cadeias localmente compatíveis, dentro de uma esfera de diâmetro D_{max} . Comparado à determinação de envelope *ab initio*, a modelagem de DR (implementada no programa GASBOR) emprega menos parâmetros livres para responder a mais dados experimentais¹²⁰.

2.2.2.3. Modelagem de Movimentos de Domínios Utilizando Dados de SAXS

Com a técnica de SAXS é possível caracterizar variações conformacionais, como, por exemplo, rotações e translações de domínios de macromoléculas em solução. Quando dados de difração de raios X a altos ângulos de proteínas cristalizadas são combinados com dados de SAXS de proteínas em solução, informações mais precisas sobre eventuais rotações e movimentos de domínios podem ser obtidas.

No caso particular em que a estrutura da proteína é conhecida com alta resolução, a partir de experiências de difração de raios X de amostras cristalizadas, ou pela técnica

¹¹⁷ Chacon, P., Moran, F., Diaz, J.F., Pantos, E., Andreu, J.M. (1998) *Biophys. J.* 74:2760-75.

¹¹⁸ Svergun, D.I., and Stuhrmann, H.B. (1991) *Acta Cryst.* A47:736-44.

¹¹⁹ Svergun, D.I., Volkov, V.V., Kozin, M.B., Stuhrmann, H.B., Barberato, C., Koch, M.H.J. (1997) *J. Appl. Crystallogr.* 30:798-802.

¹²⁰ Svergun, D.I., Petoukhov, M.V., and Koch, M.H. (2001) *Biophys. J.* 80:2946-53.

de RMN, pode-se calcular a intensidade de SAXS que seria produzida pela mesma em solução e compará-la com os valores experimentais¹²¹. Comparações entre curvas experimentais de SAXS e curvas teóricas obtidas a partir de estruturas de alta resolução têm sido amplamente utilizadas para validar modelos teóricos, verificar diferenças estruturais entre proteínas e ácidos nucleicos no estado cristalino e em solução, e prever estruturas quaternárias^{122, 123, 124, 125, 126, 127}.

Utilizou-se o programa CRY SOL¹²¹ para a determinação das curvas de espalhamento teórico, tanto do envelope obtido *ab initio*, quanto da estrutura de alta resolução.

O programa *Modelling of Atomic Structures and Shape Analysis* (MASSHA)^{128, 129} é um programa utilizado para visualização e manipulação de estruturas de alta resolução e modelos de baixa resolução. Com este programa foi possível fazer-se um refinamento de corpo rígido das estruturas cristalográficas, de uma forma interativa e/ou automática. Para tal, empregou-se as curvas de espalhamento teórico da estrutura e a curva experimental.

Uma outra combinação de informações pode ser feita entre os dados de espalhamento obtidos pelo experimento de SAXS (através de, por exemplo, o envelope, seu modelo de *beads* ou DR gerados com esta curva) e a estrutura cristalográfica. A

¹²¹ Svergun, D.I., Barberato, C., and Koch, M.H.J. (1995) *J. Appl. Crystallogr.* 28:768-73.

¹²² Ninio, J., Luzzati, V., and Yaniv, M. (1972) *J. Mol. Biol.* 71:217-29.

¹²³ Fedorov, B.A., and Denesyuk, A.I. (1978) *FEBS Lett.* 88:114-7.

¹²⁴ Muller, M., Mackeben, S., and Muller-Goymann, C.C. (2004) *Int. J. Pharm.* 274:139-48.

¹²⁵ Pavlov, M.Iu., and Fedorov, B.A. (1983) *Biofizika* 28:931-6.

¹²⁶ Grossmann, J.G., Sharff, A.J., O'Hare, P., and Luisi, B. (2001) *Biochemistry* 40:6267-74.

¹²⁷ Scott, D.J., Grossmann, J.G., Tame, J.R., Byron, O., Wilson, K.S., and Otto, B.R. (2002) *J. Mol. Biol.* 315:1179-87.

¹²⁸ Konarev, P.V., Petoukhov, M.V., and Svergun, D.I. (2001) *J. Appl. Crystallogr.* 34:527-32.

¹²⁹ Svergun, D.I., and Koch, M.H. (2002) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12:654-60.

superposição do modelo cristalográfico com o modelo em baixa resolução, utilizando-se o programa SUPCOMB¹³⁰, permite a visualização da concordância do envelope da proteína em solução com a estrutura cristalográfica (modificada ou não conforme os dados de SAXS).

¹³⁰ Kozin, M.B., and Svergun, D.I (2001) *J. Appl. Crystallogr.* 34:33-41.

2.3. RESULTADOS

2.3.1. ENSAIOS DE CRISTALIZAÇÃO

Nos ensaios iniciais de cristalização da proteína RXR DBD-LBD foram utilizados os *kits* Cristal Screen I e II (Hampton Research, os componentes são descritos na página www.hamptonresearch.com) e amostras protéicas obtidas por purificação segundo princípios de afinidade por metais quelados (IMAC, *Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography*, com a resina Ni-NTA, Quiagen) e troca aniônica (resina Q-sepharose, Amersham Bioscience) às temperaturas de 18°C e 4°C, nas concentrações de 10mg/ml e 4mg/ml. As condições de purificação estão descritas no **Anexo 1**. Os ensaios à 4°C levaram invariavelmente à precipitação das proteínas na hora da montagem da gota. Não se verificou o surgimento de cristais no espaço de observação de 1 ano. O método empregado foi o de difusão de vapor com gota sentada (*sitting drop*). Os trabalhos de ensaios de cristalização desta proteína foram, após cerca de um ano de projeto, passados para outro componente do grupo. Até então não se obtiveram cristais de qualidade adequada para resolução estrutural.

2.3.2. DETERMINAÇÃO DOS ENVELOPES POR SAXS DO DÍMERO E TETRÂMERO DE hRXR α DBD-LBD

Vide **Anexo 1**

CAPÍTULO 3 – ESTUDOS EM SOLUÇÃO DO RECEPTOR hTR β 1 DBD-LBD E DETERMINAÇÃO DE SEU ENVELOPE POR SAXS

3.1. INTRODUÇÃO

3.1.1. OS RECEPTORES DOS HORMÔNIOS TIREOIDIANOS

3.1.1.1. Caracterização e Expressão Diferencial das Isoformas

Os receptores dos hormônios tireoidianos (TR) são codificados por dois genes diferentes. No genoma humano, um deles se localiza no cromossomo 17 e codifica para o subtipo TR α ^{131, 132}, enquanto que o outro gene está no cromossomo 3 e codifica para o

¹³¹ Spurr, N.K., Solomon, E., Jansson, M., Sheer, D., Goodfellow, P.N., Bodmer, W.F., and Vennstrom, B. (1984) *EMBO J.* 3:159-63.

¹³² Dayton, A.I., Selden, J.R., Laws, G., Dorney, D.J., Finan, J., Tripputi, P., Emanuel, B.S., Rovera, G., Nowell, P.C., and Croce, C.M. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81:4495-9.

subtipo TR β ^{133, 134}.

O gene que codifica para o subtipo TR α é o mais complexo e gera pelo menos 4 diferentes isoformas¹³⁵. Em humanos, as isoformas mais comuns (TR α 1 e TR α 2) são geradas através do *splicing* alternativo do transcrito primário¹³⁶. Desta maneira, a isoforma TR α 2 é idêntica a isoforma TR α 1, exceto pela sua porção C-terminal. TR α 2 é uma variante que não liga o hormônio T3 e se comporta como um inibidor dominante negativo da isoforma TR α 1¹³⁷. A isoforma TR α 2 existe em todos os mamíferos estudados¹³⁸, entretanto não está presente em outras espécies tais como galinha¹³⁹.

A expressão do subtipo TR α foi estudada em detalhes durante o desenvolvimento embrionário de galinhas. Verificou-se que TR α é expresso quase que de uma maneira geral em todos os tecidos, com algumas variações de níveis a partir dos primeiros estágios da embriogênese, até a terceira semana da fecundação¹³⁹. A expressão do TR α também foi observada em células eritrocíticas de galinha em estágios avançados de diferenciação, indicando que este subtipo pode estar envolvido com a diferenciação deste tipo de célula¹⁴⁰. A expressão dos transcritos pra TR α 1 e TR α 2 em mamíferos ocorre em um grande número de tecidos, tais como cérebro, rins, coração, entre

¹³³ Weinberger, C., Thompson, C.C., Ong, E.S., Lebo, R., Gruol, D.J., and Evans, R.M. (1986) *Nature*. 324:641-6.

¹³⁴ Drabkin, H., Kao, F.T., Hartz, J., Hart, I., Gazdar, A., Weinberger, C., Evans, R., and Gerber, M. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85:9258-62.

¹³⁵ Lazar, M.A. (1993) *Endocr. Rev.* 14:184-93.

¹³⁶ Mitsuhashi, T., Tennyson, G.E., Nikodem, and V.M. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85:5804-8.

¹³⁷ Izumo, S., and Mahdavi, V. (1988) *Nature* 334:539-42.

¹³⁸ Laudet, V. and Gronemeyer, H. *The Nuclear Receptor*, 1.ed. New York, Academic Press, 2002.

¹³⁹ Forrest, D., Sjöberg, M., and Vennstrom, B. (1990) *EMBO J.* 9:1519-28.

¹⁴⁰ Hentzen, D., Renucci, A., le Guellec, D., Benchaïbi, M., Jurdic, P., Gandrillon, O., and Samarut, J. (1987) *Mol. Cell Biol.* 7:2416-24.

outros^{141, 142}. Existe uma particular abundância na expressão deste subtipo na musculatura esquelética, tecido gorduroso marrom e cérebro. A taxa entre estes dois transcritos é variável de um tecido para outro, entretanto a isoforma TR α 2 é proeminente em muitos casos, especialmente no cérebro^{136, 143}.

O gene que codifica para o subtipo TR β é muito mais simples e somente duas isoformas são mais comuns¹³⁵. Este gene contém duas regiões promotoras, cada qual vital para a transcrição de um mRNA e de uma proteína diferente. Através do uso alternativo destas regiões promotoras, uma ou ambas proteínas são expressas^{144, 145}. As isoformas resultantes são designadas como TR β 1 e TR β 2. Ambas as isoformas são receptores autênticos uma vez que ligam aos hormônios e aos TREs com alta especificidade, e podem mediar a transcrição dependente de hormônio. As isoformas de rato TR β 1 e TR β 2 possuem 456 e 514 aminoácidos, respectivamente¹⁴⁶, sendo a segunda isoforma somente expressa na glândula pituitária¹⁴⁷. A isoforma TR β 2 difere da isoforma TR β 1 na região N-terminal, a qual possui uma similaridade de somente 15% entre estas isoformas¹⁴⁸. Contrário a TR β 1, esta região N-terminal divergente não contém uma função de transativação AF-1¹⁴⁸.

¹⁴¹ Thompson, C.C., Weinberger, C., Lebo, R., and Evans, R.M. (1987) *Science* 237:1610-4.

¹⁴² Nakai, A., Seino, S., Sakurai, A., Szilak, I., Bell, G.I., and DeGroot, L.J. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85:2781-5.

¹⁴³ Mitsuhashi, T., and Nikodem, V.M. (1989) *J. Biol. Chem.* 264:8900-4.

¹⁴⁴ Wood, W.M., Dowding, J.M., Bright, T.M., McDermott, M.T., Haugen, B.R., Gordon, D.F., and Ridgway, E.C. (1996) *J. Biol. Chem.* 271:24213-20.

¹⁴⁵ Wood, W.M., Ocran, K.W., Gordon, D.F., and Ridgway, E.C. (1991) *Mol. Endocrinol.* 5:1049-61.

¹⁴⁶ Murray, M.B., Zilz, N.D., McCreary, N.L., MacDonald, M.J., and Towle, H.C. (1988) *J. Biol. Chem.* 263:12770-7.

¹⁴⁷ Hodin, R.A., Lazar, M.A., Wintman, B.I., Darling, D.S., Koenig, R.J., Larsen, P.R., Moore, D.D., and Chin, W.W. (1989) *Science* 244:76-9.

¹⁴⁸ Tomura, H., Lazar, J., Phyllaier, M., and Nikodem, V.M. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92:5600-4.

A expressão da proteína TR β também foi verificada em detalhes durante o desenvolvimento embrionário de galinhas. Em contraste à ampla expressão do subtipo TR α , TR β é mais restrito ao cérebro, olhos, pulmões, e rins, sendo a expressão regulada durante o desenvolvimento do cérebro^{139, 149}. Nenhuma expressão deste subtipo foi detectada durante os estágios iniciais da embriogênese¹⁵⁰. Em rato, a isoforma TR β mostrou-se altamente expressa em cérebro, fígado e rins^{151, 152}. Ensaios funcionais têm contribuído com a idéia de que a proteína TR β 1 pode desempenhar uma função importante na diferenciação neuronal¹⁵³. A isoforma TR β 2 está relacionada com a supressão da liberação de TSH¹⁵⁴.

Os estudos de camundongos transgênicos têm trazido alguma luz sobre o papel relativo às diferentes isoformas. Camundongos deletados para a isoforma TR α 1 apresentam menor frequência cardíaca e baixa temperatura corporal em relação aos não-transgênicos, além de possuírem níveis de TSH e T4 ligeiramente abaixo do normal¹⁵⁵. A deleção da isoforma TR β promove níveis elevados de hormônios tireoidianos, bócio e supressão inapropriada de TSH¹⁵⁶.

Na **Figura 17** apresenta-se um esquema comparativo de algumas das diversas

¹⁴⁹ Forrest, D., Hallbook, F., Persson, H., and Vennstrom, B. (1991) *EMBO J.* 10:269-75.

¹⁵⁰ Flamant, F., and Samarut, (1998) *J. Dev. Biol.* 197:1-11.

¹⁵¹ Hodin, R.A., Lazar, M.A., and Chin, W.W. (1990) *J. Clin. Invest.* 85:101-5.

¹⁵² Strait, K.A., Schwartz, H.L., Perez-Castillo, A., Oppenheimer, J.H. (1990) *J. Biol. Chem.* 265:10514-21.

¹⁵³ Lebel, J.M., Dussault, J.H., Puymirat, J. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91:2644-8.

¹⁵⁴ Apriletti, J.W., Ribeiro, R.C.J., Wagner, R.L., Feng, W., Webb, P., Kushner, P.J., West, B.L., Nilsson, S., Scanlan, T.S., Fletterick, R.J., and Baxter, J.D. (1998) *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. Suppl.* 25: S2-S11.

¹⁵⁵ Wikstrom, L., Johansson, C., Salto, C., Barlow, C., Campos, B.A, Baas, F., Forrest, D., Thoren, P., and Vennstrom, B. (1998) *EMBO J.* 17:455-61.

¹⁵⁶ Forrest, D., Hanebuth, E., Smeyne, R.J., Everds, N., Stewart, C.L., Wehner, J.M., and Curran, T. (1996) *EMBO J.* 15:3006-15.

isoformas do receptor tireoideano de rato, em termos das regiões presentes e de suas propriedades de ação.

Figura 17. Comparação das homologies de aminoácido e das propriedades funcionais entre as diversas isoformas do receptor TR de rato.

O tamanho da isoforma (em número de aminoácidos) é dado acima dos diagramas, e a porcentagem de similaridade de aminoácido, para cada domínio e em relação a isoforma TR β 2, está incluída dentro dos diagramas¹⁵⁷.

3.1.1.2. Localização Celular

Os receptores esteroidianos, na ausência de seu hormônio, são encontrados no citoplasma, associados em um grande complexo de chaperonas. A interação com o hormônio induz mudanças conformacionais que resultam na dissociação das proteínas do complexo. Com a dissociação das chaperonas, tem-se a exposição de sinais de translocação que estavam mascarados, de maneira que os receptores podem ser reconhecidos pelo maquinário de transporte nuclear¹⁵⁸.

Os receptores tireoideanos, desde sua primeira identificação como receptor nuclear, têm sido caracterizados como presentes no núcleo, tanto na ausência quanto na presença

¹⁵⁷ Yen, PM (2001) *Physiol. Rev.* 81:1097-142.

¹⁵⁸ Hager, G.L., Lim, C.S., Elbi, C., and Baumann, C.T. J. (2000) *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol* 74:249–54.

do ligante¹⁵⁸. Várias observações têm sugerido que a associação do TR com o DNA e correpressores, na ausência de hormônio, é o fator responsável pela localização nuclear deste receptor.

Estudos em sistemas celulares, entretanto, têm revelado que uma porção significativa do receptor TR β 1 está localizada no citoplasma na ausência de T3, sendo que a presença do ligante promove o direcionamento do receptor para o núcleo¹⁵⁹. Outro estudo mostrou que esta isoforma se move rapidamente entre o núcleo e o citoplasma, e que são interações do receptor com correpressores e com o RXR, e não interações do TR com o DNA, o fator importante na determinação da distribuição intracelular do TR. De fato, são estas interações proteína-proteína que mantêm o receptor sem ligante no núcleo^{160, 161}.

Estudos, também *in vivo*, sobre o transporte núcleo-citoplasma da isoforma TR α 1 revelaram que esta proteína se acumula no núcleo (principalmente na presença do T3), mas se movimenta rapidamente entre estes compartimentos. Mutações que afetam a ligação ao DNA e a função de transativação fazem a isoforma acumular no citoplasma¹⁶². Estudos bem recentes desta isoforma apontaram o fato de que a fosforilação da mesma aumenta sua retenção nuclear e/ou inibe sua exportação para fora do núcleo¹⁶³.

¹⁵⁹ Zhu, X., Hanover, J.A., Hager, G.L., and Cheng, S.-Y. (1998) *J. Biol. Chem.* 273:27058–63.

¹⁶⁰ Baumann, C.T., Maruvada, P., Hager, G.L., and Yen, P.M. (2001) *J. Biol. Chem.* 276:11237-45.

¹⁶¹ Maruvada, P., Baumann, C.T., Hager, G.L., and Yen, P.M. (2003) *J. Biol. Chem.* 278:12425-32.

¹⁶² Bunn, C.F., Neidig, J.A., Freidinger, K.E., Stankiewicz, T.A., Weaver, B.S., McGrew, J., and Allison, L.A. *Mol. Endocrinol.* 15: 512-33.

¹⁶³ Nicoll, J.B., Gwinn, B.L., Iwig, J.S., Garcia, P.P., Bunn, C.F., and Allison, L.A. (2003) *Mol. Cel. Endocrinol.* 205:65-77

3.1.1.3. Os Elementos de Resposta aos Hormônios Tireoidianos e a Ação dos TRs

Análises mutacionais da região promotora do gene para o hormônio de crescimento do rato, além de comparações entre seqüências de TREs que regulam outros genes, têm sugerido uma seqüência consenso para o hexâmero que forma o meio sítio dos TREs. Esta seqüência é a (G/A)GGT(C/G)A¹⁵⁷.

Os receptores dos hormônios tireoidianos podem se ligar a TREs com meios sítios arranjados como palíndromos (TREpal), repetições diretas (DR) e palíndromos invertidos (IP). Os espaçamentos ótimos entre estes diferentes arranjos são zero, quatro e seis, respectivamente¹⁵⁷. Paralelo a isto, monômeros de TRs (TR α e TR β) podem ativar a transcrição através de um regulador contendo somente um meio sítio com 8 nucleotídeos¹⁶⁴. Até então já foram descritos cerca de 30 TREs naturais, sendo os DRs, seguido dos IPs os motivos mais comuns¹⁵⁷.

Vários experimentos realizados por volta dos últimos 15 anos têm revelado que o receptor TR pode se ligar aos TREs, *in vitro*, como monômero, homodímero e heterodímeros¹⁵⁷. Vários grupos têm observado que o TR liga-se como homodímero e heterodímeros (com RXR e RAR) com mais preferência em IP e DR, do que em TREpal¹⁵⁷. A isoforma TR β 1 aparenta ter, em relação à TR α 1, uma tendência maior de formar homodímeros em diferentes TREs, indicando que estas duas isoformas possuem diferentes potenciais de dimerização^{165, 166}.

¹⁶⁴ Katz, R.W., and Koenig, R.J. (1994) *J. Biol. Chem.* 269:18915-20.

¹⁶⁵ Darling, D.S., Carter, R.L., Yen, P.M., Welborn, J.M., Chin, W.W., Umeda, P.K. (1993) *J. Biol. Chem.* 268:10221-7.

¹⁶⁶ Zhu, X.G., McPhie, P., Lin, K.H., and Cheng, S.Y. (1997) *J. Biol. Chem.* 272:9048-54.

Inicialmente, acreditava-se que os TRs mediavam seus efeitos sobre a transcrição gênica da mesma maneira que os receptores esteroidianos, ou seja, na forma de homodímeros. Entretanto, dois grupos observaram que os TRs se heterodimerizam com proteínas de extratos nucleares do fígado e da pituitária^{157, 167}. Estas proteínas foram chamadas de TRAPs (*TR Auxiliary Proteins*), tendo sido verificado que elas aumentaram a ligação dos TRs aos TREs^{168, 169}. Dado que os heterodímeros de TR são mais estáveis que os homodímeros, especulou-se que eles seriam os principais responsáveis pela regulação transcricional dirigida pelos hormônios tireoidianos.

Várias linhas de evidências sugerem que os receptores RXR são um dos principais TRAPs, e desempenham um papel importante na transcrição mediada por T3. Primeiramente, porque RXR aumenta a ligação do TR aos TREs¹⁷⁰. Segundo, porque estudos realizados com anticorpos anti-RXR identificaram os RXRs, e proteínas relacionadas, como os principais TRAPs endógenos^{171, 172, 173}. Terceiro, porque tanto TR/TRAP, assim como TR/RXR, permanecem ligados aos TREs na presença do ligante T3¹⁵⁷. Quarto, porque mutantes seletivos para o rompimento da heterodimerização prejudicam as propriedades de transativação do receptor TR¹⁵⁷. E, por último, porque RXR aumenta a transcrição mediada por T3 em sistemas de transcrição *in vitro*¹⁷⁴.

¹⁶⁷ Forman, B.M., Casanova, J., Raaka, B.M., Ghysdael, J., and Samuels, H.H. (1992) *Mol. Endocrinol.* 6:429-42.

¹⁶⁸ Burnside, J., Darling, D.S., Chin, W.W. (1990) *J. Biol. Chem.* 265:2500-4.

¹⁶⁹ Murray, M.B., and Towle, H.C. (1989) *Mol. Endocrinol.* 3:1434-42.

¹⁷⁰ Zhang, X.K., Hoffmann, B., Tran, P.B., Graupner, G., and Pfahl, M. (1992) *Nature* 355:441-6.

¹⁷¹ Lazar, M.A., and Berrodin, T.J. (1990) *Mol. Endocrinol.* 4:1627-35.

¹⁷² Ribeiro, R.C., Apriletti, J.W., Yen, P.M., Chin, W.W., and Baxter, J.D. (1994) *Endocrinology* 135:2076-85.

¹⁷³ Sugawara, A., Yen, P.M., Darling, D.S., and Chin WW. (1993) *Endocrinology* 133:965-71.

¹⁷⁴ Lee, I.J., Driggers, P.H., Medin, J.A., Nikodem, V.M., and Ozato, K. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91:1647-51.

De fato uma visão mais atual do complexo TRAP o caracteriza como um complexo coativador da família TRAP/DRIP. Este complexo tem atividade sobre os receptores nucleares ativados por ligantes, e agem promovendo o recrutamento da polimerase ao complexo geral de transcrição^{16, 175}. Estudos envolvendo sistemas de transcrição reconstituídos *in vitro* verificaram que o conjunto TR-T3/TRAP é capaz de ativar a transcrição somente quando RXR é adicionado ao sistema¹⁷⁶. Desta maneira, o RXR não é mais considerado um TRAP, uma vez que ele é um receptor nuclear.

Sobre a ativação dos receptores que formam o heterodímero, alguns estudos mostraram que as adições dos ligantes 9-*cis* e T3 ativaram a transcrição em elementos DR4 e IP de maneira sinérgica^{177, 178}. Entretanto, em outros casos, verificou-se que o TR bloqueou a ligação do RXR ao ligante 9-*cis*¹⁵⁷.

Um fato interessante é que se tem verificado que TR é capaz de heterodimerizar, *in vitro*, também com outros membros da superfamília dos receptores nucleares, tais como o RAR, PPAR, COUP-TF e VDRs¹⁵⁷. Entretanto, a significância funcional destes complexos ainda não é conhecida.

Embora, como já comentado, os receptores TR possam formar monômeros, homodímeros e heterodímeros sobre TREs, conforme verificado em estudos de *gel shift*, a função, *in vivo*, dos monômeros e homodímeros ainda não é entendida. Sabe-se que, *in*

¹⁷⁵ Glass, C.K. (1994) *Endocr. Rev.* 15: 391-07.

¹⁷⁶ Fondell, J.D., Ge, H., and Roeder, R.G. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:8329-33.

¹⁷⁷ Jeyakumar, M., Tanen, M.R., and Bagchi, M.K. (1997) *Mol. Endocrinol.* 11:755-67.

¹⁷⁸ Rosen, E.D., O'Donnell, A.L., and Koenig, R.J. (1992) *J. Biol. Chem.* 267:22010-3.

vitro, homodímeros de *apo*-TR interagem melhor com correpressores do que heterodímeros TR/RXR desligados de seus hormônios^{179, 180}.

Entretanto, diferente dos receptores esteroidianos, para os quais a presença do hormônio aumenta a ligação dos homodímeros aos seus HREs, a presença do ligante T3 enfraquece a associação dos homodímeros de TR α 1 e TR β 1 aos elementos DRs e IPs^{181, 182, 183, 184}. A propriedade de interação dos homodímeros sobre o elemento TREpal, em alguns estudos, não sofreu alteração em relação à presença de T3¹⁸¹. Em outros estudos a interação ficou fortalecida na presença deste ligante¹⁸³.

Atualmente não se sabe a natureza dos complexos de TR dentro das células. Estes complexos podem depender da estequiometria e compartimentalização dos TRs e RXRs dentro do núcleo de um dado tipo celular. Estudos de *crosslinking* e coimunoprecipitação, além de ensaios *in vivo*, sugerem que as formas predominantes do receptor TR que existem em solução são monômeros e heterodímeros TR/RXR, uma vez que os homodímeros se formam fracamente^{185, 186, 187, 188}.

¹⁷⁹ Hollenberg, A.N., Monden, T., Madura, J.P., Lee, K., and Wondisford, F.E. (1996) *J. Biol. Chem.* 271:28516-20.

¹⁸⁰ Liu, Y., Takeshita, A., Misiti, S., Chin, W.W., and Yen, P.M. (1998) *Endocrinology*. 139:4197-204.

¹⁸¹ Andersson, M.L., Nordstrom, K., Demczuk, S., Harbers, M., and Vennstrom, B. (1992) *Nucleic Acids Res.* 20:4803-10.

¹⁸² Miyamoto, T., Suzuki, S., and DeGroot, L.J. (1993) *Mol. Endocrinol.* 7:224-31.

¹⁸³ Ribeiro, R.C., Kushner, P.J., Apriletti, J.W., West, B.L., and Baxter, J.D. (1992) *Mol. Endocrinol.* 6:1142-52.

¹⁸⁴ Yen, P.M., Darling, D.S., Carter, R.L., Forgione, M., Umeda, P.K., Chin, W.W. (1992) *J. Biol. Chem.* 267:3565-8.

¹⁸⁵ Kurokawa, R., Yu, V.C., Naar, A., Kyakumoto, S., Han, Z., Silverman, S., Rosenfeld, M.G., and Glass, C.K. (1993) *Genes Dev.* 7:1423-35.

¹⁸⁶ Lazar, M.A., Berrodin, T.J., and Harding, H.P. (1991) *Mol. Cell Biol.* 11:5005-15.

¹⁸⁷ Yen, P.M., Brubaker, J.H., Apriletti, J.W., Baxter, J.D., and Chin, W.W. (1994) *Endocrinology* 134:1075-81.

¹⁸⁸ Qi, J.S., Desai-Yajnik, V., Greene, M.E., Raaka, B.M., and Samuels, H.H. (1995) *Mol. Cell Biol* 15:1817-25.

Especula-se que são as interações proteína – proteína que determinam a forma como os TRs se ligam aos seus genes alvo e regulam a resposta transcrricional. Tem-se verificado que o receptor TR possui o domínio DBD rotacionado 180° em relação ao domínio LBD, considerando-se a posição do mesmo quando dimerizado com RXR¹⁸⁵. Em função disto, explica-se o porquê do heterodímero TR/RXR possuir maior afinidade de interação com TREs organizados como repetições diretas, e do homodímero TR/TR ligar-se preferencialmente a elementos do tipo palíndromo invertido, considerando-se que as interfaces de homo e heterodimerização no LBD são equivalentes (**Figura 18**).

Figura 18. Modelo para a interação do heterodímero TR/RXR e do homodímero TR/TR aos seus TREs de maior afinidade.

Um estudo mais aprofundado sobre as preferências de ligação de homodímeros e heterodímeros sobre elementos do tipo DR4 avaliou 10 destes elementos naturalmente encontrados no promotor de diversos genes. Estes elementos variavam consideravelmente em sequência. O estudo mostrou um espectro contínuo de ativação gênica independente de ligante (utilizando-se a função AF-1, na ausência de correpressores) que variou da total dependência da presença do RXR até a

independência completa deste receptor, sendo a preferência por um ou outro complexo dependente da sequência dos meio-sítios e da afinidade ao elemento responsivo¹⁸⁹.

Foi feita uma série de estudos envolvendo mutações de superfície (que não afetam a estrutura global da proteína), combinados com dados oriundos de cristais do domínio LBD do receptor TR β , assim como do modelo predito para o heterodímero do LBD de TR β -RXR α . Estes estudos levaram a conclusão de que os mesmos resíduos encontrados nas hélices 10 e 11 estão envolvidos, tanto na heterodimerização do TR com RXR em solução, assim como na homodimerização do TR na presença dos elementos DR-4 e de um palíndromo invertido espaçado por 6 bases (F2). Estes resíduos, porém, não são importantes para a associação com um TREpal, onde, aparentemente, os dois monômeros se ligam ao DNA de maneira independente¹⁹⁰.

Nenhum dos mutantes pontuais do domínio LBD que impediram a formação de homodímeros de TR em DR4, nem o mutante duplo L422R/M423R, foram capazes de romper o heterodímero TR-RXR em DR4. Entretanto, o mutante L422R enfraqueceu a formação de heterodímeros em F2 e aboliu a formação dos mesmos em TREpal¹⁹⁰.

Uma vez que as mutações avaliadas não foram capazes de abolir a heterodimerização em DR4 e somente a enfraqueceu em F2, postulou-se que os heterodímeros sejam mais estáveis que os homodímeros. Esta estabilidade talvez seja determinada pela interface de dimerização observada na estrutura cristalográfica dos DBDs do complexo TR-RXR/DR4⁴⁵. Para averiguar-se a importância da superfície de dimerização do DBD, fez-se mutações e avaliou-se a interferência na capacidade de

¹⁸⁹ Wu, Y., Xu, B., and Koenig, R.J. (2001) *J. Biol. Chem.* 276:3929-36.

¹⁹⁰ Ribeiro, R.C., Feng, W., Wagner, R.L., Costa, C.H., Pereira, A.C., Apriletti, J.W., Fletterick, R.J., and Baxter, J.D. (2001) *J. Biol. Chem.* 276:14987-95.

heterodimerização de TR/RXR em DR4. O resultados mostraram que mutações no DBD de TR ou RXR, por si, não foram capazes de romper a heterodimerização. Entretanto, a combinação de mutações no LBD de um receptor com mutações no DBD do outro receptor aboliu a heterodimerização de TR/RXR em DR4¹⁹⁰.

3.1.1.3.1. Mecanismo de Repressão Transcricional Dependente de Ligante

Os receptores tireoidianos possuem dois tipos básicos de função: Repressão transcricional dependente de ligante e ativação transcricional dependente de ligante.

A repressão da transcrição dependente de hormônio de genes regulados negativamente é uma propriedade muito importante dos receptores tireoidianos. Por exemplo, vários genes regulados negativamente, tais como os que codificam para as subunidades α e β da tireotropina (TSHA e TSHB, respectivamente), e para o hormônio liberador da tireotropina (TRH), são alvos cruciais para o *feedback* negativo fisiológico do T3. Este mecanismo permite que o próprio hormônio T3 controle seus níveis no plasma sanguíneo¹⁹¹.

Em contraste aos TREs positivos, ainda não se definiu uma sequência consenso para estes elementos regulatórios de ação inibitória. Várias linhas de evidência têm apontado para o fato de que diferentes alvos gênicos adotam distintos mecanismos de repressão, e que, de fato, a interação TR-DNA pode não ser requerida para a ação de repressão gênica do hormônio T3¹⁹¹.

Em geral, tem-se observado que genes que são reprimidos pelos hormônios tireoidianos são ativados pelo *apo*-TR. De maneira surpreendente verificou-se que

¹⁹¹ Wu, Y., and Koenig, R.J. (2000) *Trends Endocrinol. Metab.* 11:207-11.

correpressores (NCoR e SMRT) estão envolvidos na indução da expressão das proteínas TSH α , TSH β , e TRH, via TRs sem ligante. A presença do ligante inibiu a expressão deste genes, possivelmente via dissociação dos correpressores¹⁹².

Um trabalho posterior do mesmo grupo, concentrado no controle da expressão do gene TSHA, revelou fatos interessantes e propôs um mecanismo para a regulação negativa efetuada pelo T3 sobre este gene¹⁹³. O trabalho verificou que: 1) As propriedades de regulação negativa dependem do promotor; 2) A interação direta do TR com o promotor de TSH não é necessária para este controle, revelando que interações proteína-proteína estão envolvidas no mecanismo primário de regulação; 3) A estimulação independente de ligante do promotor envolve CoRs e está associada com o aumento da acetilação de histonas; 4) O CRE (*cAMP Response Element*) é um elemento regulatório crítico que contribui para o padrão reverso de regulação pelos CoRs e CoAs (suas propriedades foram confirmadas com o uso de Gal4-CREB e promotores heterólogos); 5) Em adição ao CRE, o promotor basal de TSHA está intrinsecamente sujeito à regulação negativa; 6) Mudanças no balanço de acetilação de histonas, através da inibição da deacetilação de histonas com TSA (*Trichostatin A*) ou estimulação da acetilação com PKA (*Protein Kinase A*) aumentou em muito a ativação do promotor de TSHA e aboliu a repressão dependente de T3. Tomados em conjunto, estes dados suportam um mecanismo no qual o gene TSHA é controlado por um balanço, mediado por TR, entre HATs e HDACs (**Figura 19**).

¹⁹² Tagami, T., Madison, L.D., Nagaya, T., and Jameson, J.L.. (1997) *Mol. Cell Biol.* 17:2642-8.

¹⁹³ Tagami, T., Park, Y., and Jameson, J.L. (1999) *J. Biol Chem.* 274:22345-53.

Figura 19. Modelo em dois passos da regulação negativa do gene TSH pelo ligante T3.

À esquerda, expressão basal do gene TSH. No estado basal os fatores de transcrição recrutam desacetilases de histonas, as quais causam repressão transcricional. Por outro lado, a ligação de CREB (*cAMP Response Element Binding Factor*) ao CRE recruta para o promotor CBP e HAT associadas. A transcrição basal do gene é, portanto, regulada pelo grau de acetilação de histonas e outros fatores, o qual é determinado por um balanço entre HAT e HDAC. No centro, na presença de *apo*-TR. Interações diretas entre o TR e os elementos regulatórios do promotor podem não ser requeridas para o controle negativo deste gene. Sítios de interação ao TR ou qualquer de seus parceiros não têm sido encontrados na região regulatória do gene TSHA. Na ausência do T3, TR se liga a CoRs, tais como NCoR, SMRT e Sin3, os quais recrutam HDAC. Este complexo TR-CoR sequestra HDAC do promotor, resultando no aumento da acetilação e ativação transcricional. À direita, na presença de TR ligado à T3. Na presença de T3, TR se dissocia dos CoRs, tornando a HDAC disponível para o promotor. *Holo*-TR também se liga à CoAs, as quais competem pela associação com CBP, levando-o para fora do promotor. Este dois eventos resultam na deacetilação e repressão transcricional. GTFs, *General Transcription Factors*¹⁹³; PKA (*Protein Kinase A*); TSA (*Trichostatin A*).

Em consistência com este modelo, tem-se a revelação de que camundongos com nocaute do gene SRC-1 apresentam quadro de resistência central ao hormônio tireoidiano, manifestado pela perda da habilidade do T3 de suprimir a síntese e secreção de TSH¹⁹⁴. Verificou-se também em experimentos de transfecção que mutações no TR, que abolem a interação com CoAs da família p160, abolem a repressão mediada por T3 do promotor TSHA, mas não impede a ativação gênica via *apo*-TR¹⁹³.

¹⁹⁴ Weiss, R.E., Xu, J., Ning, G., Pohlenz, J., O'Malley, B.W., and Refetoff, S. (1999) *EMBO J.* 18:1900-4.

Contrariamente a TSHA, a regulação negativa do gene TSHB requer a ligação do receptor TR ao promotor do gene¹⁹⁵. Na presença do ligante T3, o receptor TR β e HDACs são recrutados diretamente para o elemento de resposta do promotor e promovem alterações na cromatina; a inibição da atividade da HDAC reduz em muito a repressão mediada pelo hormônio¹⁹⁵.

Estudos com o promotor do gene que codifica para TRH revelaram que a regulação deste gene é isoforma-específica, sendo o receptor TR β 1 o responsável por esta regulação. Foram encontrados dois tipos de TREs negativos estruturalmente diferentes e que agem de maneira cooperativa. Um dos sítios liga monômeros de TR enquanto que o outro pode ligar monômeros, homodímeros e heterodímeros TR/RXR. Neste último, a presença do RXR aumenta a ação regulatória negativa do TRE¹⁹⁶.

3.1.1.3.2. Mecanismo de Ativação Transcricional Dependente de Ligante

O mecanismo de ativação transcricional dependente da ligação dos hormônios tireoidianos ainda não é completamente compreendida. Propõe-se que, na ausência do ligante T3, o que existe são monômeros de TR, assim como heterodímeros TR/RXR em solução, além de monômeros, homodímeros e heterodímeros ligados a TREs¹⁵⁷. Vários laboratórios mostraram, através de ensaios de cotransfecção, que *apo*-TRs reprimem a transcrição basal de TREs positivamente regulados^{197, 198, 199}.

¹⁹⁵ Sasaki, S., Lesoon-Wood, L.A., Dey, A., Kuwata, T., Weintraub, B.D., Humphrey, G., Yang, W.M., Seto, E., Yen, P.M., Howard, B.H., and Ozato, K. (1999) *EMBO J.* 18:5389-98.

¹⁹⁶ Hollenberg, A.N., Monden, T., Flynn, T.R., Boers, M.E., Cohen, O., Wondisford, F.E. (1995) *Mol. Endocrinol.* 9:540-50.

¹⁹⁷ Baniahmad, A., Kohne, A.C., and Renkawitz, R. (1992) *EMBO J.* 11:1015-23.

¹⁹⁸ Brent, G.A., Dunn, M.K., Harney, J.W., Gulick, T., Larsen, P.R., and Moore, D.D. (1989) *New Biol.* 1:329-36.

Estas observações associadas à constatação de que o ligante T3 diminui a ligação dos homodímeros de TR aos TREs e não afeta a ligação dos heterodímeros^{181, 182, 183, 184}, levou à hipótese de que *apo*-TRs, organizados como homodímeros ou heterodímeros com RXR, seriam os mediadores da repressão basal. TRs não ligados aos hormônios reprimem a transcrição basal através do recrutamento de correpressores tais como NCoR e SMRT^{200, 157} (**Figura 20**). Dentro do domínio de interação com receptores nucleares destes correpressores está a sequência consenso LXXI/HIXXXI/L^{201, 202}.

Figura 20. Modelo de ativação da transcrição gênica via elementos responsivos ao T3 (TREs) de resposta positiva à presença do ligante. TRE (*Thyroid Response Element*), CoRs (correpressores) e CoAs (coativadores).

¹⁹⁹ Zhang, X.K., Wills, K.N., Graupner, G., Tzukerman, M., Hermann, T., and Pfahl, M. (1991) *New Biol.* Feb 3:169-81.

²⁰⁰ Tong, G.X., Jeyakumar, M., Tanen, M.R., and Bagchi, M.K. (1996) *Mol. Cell Biol.* 16:1909-20.

²⁰¹ Hu, X., and Lazar, M.A. (1999) *Nature* 402:93-6.

²⁰² Nagy, L., Kao, H.Y., Love, J.D., Li, C., Banayo, E., Gooch, J.T., Krishna, V., Chatterjee, K., Evans, R.M., and Schwabe, J.W. (1999) *Genes Dev.* 13:3209-16.

Na presença do hormônio, homodímeros de TR se dissociam de TREs, tais como F2 e DR4, e passam a se ligar como monômeros mas com baixa afinidade. O complexo TR/RXR, na presença do T3, permanece ligado aos TREs (TREpal, DR4 e F2)^{181, 182, 183, 184, 203}. Como consequência das mudanças nos complexos de TR mediada pela presença do T3, a dissociação dos homodímeros levaria a desrepressão da transcrição basal, enquanto que a ligação do heterodímero *holo*-TR/RXR, acoplado a proteínas coativadoras, seria essencial para a ativação transcricional acima dos níveis da transcrição basal (**Figura 20**).

Alguns estudos têm sugerido que esta sensibilidade dos homodímeros à ligação do T3 é um fator importante da resposta ao hormônio, e um defeito neste mecanismo pode levar, ou contribuir, para a síndrome generalizada de resistência ao hormônio tireoidiano^{204, 205, 206}.

O domínio de ligação a receptores nucleares dos correpressores é muito similar ao domínio de ligação dos coativadores. Estes coreguladores, inclusive, interagem com resíduos similares das hélices 3, 4, 5 e 6. Em muitos casos, o que determina se serão correpressores ou coativadores que irão se ligar ao receptor TR são diferenças no tamanho e especificidades na sequência de interação dos correpressores e coativadores, acoplados às mudanças conformacionais na região AF-2 associadas com a ligação ao hormônio²⁰⁷.

²⁰³ Yen, P.M., Sugawara, A., and Chin, W.W. (1992) *J. Biol. Chem.* 267:23248-52.

²⁰⁴ Refetoff, S. (1982) *Am. J. Physiol.* 243:E88-98.

²⁰⁵ Cooper, D.S., Ladenson, P.W., Nisula, B.C., Dunn, J.F., Chapman, E.M., and Ridgway, E.C. (1982) *Metabolism.* 31:504-9.

²⁰⁶ Piedrafita, F.J., Bendik, I., Ortiz, M.A., and Pfahl, M. (1995) *Mol. Endocrinol.* 9:563-78.

²⁰⁷ Perissi, V., Staszewski, L.M., McInerney, E.M., Kurokawa, R., Krones, A., Rose, D.W., Lambert, M.H., Milburn, M.V., Glass, C.K., and Rosenfeld, M.G. (1999) *Genes Dev.* 13:3198-208.

Estudos de *Far-Western* e coimunoprecipitação mostraram que *holo*-TR pode interagir com várias proteínas nucleares. Estas proteínas são necessárias para formar um complexo transcricionalmente ativo^{176, 208}.

Os trabalhos de vários laboratórios têm mostrado que os TRs podem interagir com fatores gerais de transcrição¹⁵⁷, sendo esta interação dependente de ligante. Este dado sugere que estes contatos são importantes para desrepressão e ativação transcricional¹⁵⁷. Outros estudos apontaram para a existência de proteínas adaptadoras, ou coativadores, que tem a função de conectar o receptor TR ativado pelo hormônio com os componentes do maquinário geral de transcrição, sendo também essenciais para a ativação da transcrição.

Até então já se identificaram diversos coativadores com atividade sobre os TRs, sendo eles o SRC-1²⁰⁹, o TIFII/GRIP-1/SRC-2^{210, 211} e o AIB1/pCIP/ACRT/TRAM1/RAC3/SRC-3^{212, 213}. Diversos estudos têm identificado nestes coativadores os sítios de interação com os receptores nucleares, os quais se caracterizam, como já comentado, por um motivo formado pela sequência LXXLL, sendo esta uma espécie de “assinatura” para estas proteínas¹⁵⁷.

Estes coativadores fazem contacto com o cointegrador CBP/p300, os quais se ligam às PCAF, que possuem atividade de acetilação de histonas e intermedeiam a interação com maquinário basal de transcrição^{16, 157}.

²⁰⁸ Petty, K.J. (1995) *Mol. Cell Endocrinol.* 108:131-42.

²⁰⁹ Onate, S.A., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., and O'Malley, B.W. (1995) *Science* 270:1354-7.

²¹⁰ Hong, H., Kohli, K., Garabedian, M.J., and Stallcup, M.R. (1997) *Mol. Cell Biol.* 17:2735-44.

²¹¹ Voegel, J.J., Heine, M.J., Zechel, C., Chambon, P., and Gronemeyer, H. (1996) *EMBO J.* 15:3667-75.

²¹² Chen, H., Lin, R.J., Schiltz, R.L., Chakravarti, D., Nash, A., Nagy, L., Privalsky, M.L., Nakatani, Y., and Evans, R.M. (1997) *Cell* 90:569-80.

²¹³ Li, H., Gomes, P.J., and Chen, J.D. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:8479-84.

Os TRs também fazem contato com as proteínas do complexo DRIP/TRAP. Estas proteínas também possuem a sequência “assinatura” LXXLL e interagem com o maquinário basal da RNA polimerase, não apresentado, entretanto, atividade de acetilase^{16, 157}.

Uma revisão sobre o mecanismo molecular da ação do hormônio tireoidiano é apresentada no **Anexo 2**.

3.1.1.3.3. Interação da H12 com o Sítio de Coativador: Mecanismo de Repressão na Ausência de Ligante Comum aos Receptores Nucleares?

O envolvimento da hélice H12 do domínio de ligação de ligante dos receptores nucleares nos processos de repressão transcricional de heterodímeros de RXR e na autorepressão do receptor RXR foi detalhado no **Capítulo 2**, itens **2.1.1.2.** e **2.1.1.3.** O primeiro caso propõe uma explicação bem fundada para a repressão transcricional mediado por alguns heterodímeros de RXR, enquanto que o mecanismo de autorepressão do RXR ainda não encontrou similares na literatura.

A atuação dos heterodímeros de RXR como repressores na ausência de ligante, tanto para o RXR quanto para seu parceiro, foi explicada segundo um mecanismo molecular que envolve a interação sequência-específica entre a hélice H12 do RXR com a superfície de interação de CoAs do outro receptor. Isto se dá porque a hélice H12 do RXR possui uma sequência similar à sequência dos CoAs responsável pela associação com os receptores. Desta maneira, o RXR fica possibilitado de interagir com CoRs, uma vez que a H12, na posição *apo*, causa impedimento estérico para esta associação. Na presença do ligante do parceiro de heterodimerização, ocorre o desligamento da H12 do

RXR do sítio de CoAs do parceiro, o reestabelecimento de sua conformação *apo*, e, assim, a dissociação dos CoRs e o fim da repressão transcricional (veja **Figura 11 do Capítulo 2**).

Já a estrutura cristalográfica do homotetrâmero do domínio LBD do RXR α por fim comprovou o mecanismo de autorepressão desta proteína, já anteriormente demonstrado por estudos funcionais. A hélice H12 contém a função AF-2 (essencial para interação com CoAs) e se projeta dos monômeros de um dímero, fazendo contato com o sítio de ligação de coativador dos monômeros do outro dímero. Nesta configuração, cada monômero de um dímero reprime a ligação de um coativador no monômero correspondente do outro dímero (veja **Figura 12 do Capítulo 2**). Na presença do ligante 9-*cis* ocorre a remoção das H12 das suas posições de inibição mútua, o empacotamento destas hélices contra o corpo dos monômeros, e, assim, a liberação de dímeros e/ou monômeros ativos.

Dentro deste contexto, surge uma observação interessante com relação à estrutura cristalográfica reportada para o homodímero de *apo*-PPAR γ , mais especificamente com relação ao empacotamento cristalino desta proteína. Primeiramente, observou-se diferenças conformacionais entre as hélices H12 dos dois monômeros do dímero. Em um monômero ela está empacotada contra o corpo da proteína, em uma conformação muito similar à da estrutura *holo*²¹⁴. No outro monômero, entretanto, a hélice H12 adota uma conformação estendida, que se projeta ligeiramente do restante da proteína. A observação mais interessante, porém, vem de um exame mais cuidadoso dos contatos

²¹⁴ 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* 395:137:43

feitos pela H12 estendida de um monômero com o *charge clamp* (elemento estrutural de suma importância para a interação dos receptores com os coativadores) do monômero de um outro dímero relacionado por simetria cristalográfica²¹⁴. Nesta configuração, a H12 estendida (ou “inativa”) de um monômero faz contatos com a H12 recolhida (ou “ativa”) de outro monômero, simulando a interação de um coativador. Os resíduos E471 e K301 da hélice “ativa” fazem pontes de hidrogênio com a H12 “inativa” relacionada por simetria cristalográfica (**Figura 21**).

Embora não avaliada em profundidade, poderia-se elaborar a hipótese de um mecanismo de autorepressão do PPAR γ que poderia explicar porque o PPAR γ , assim como RXR α , apresenta fraca associação com correpressores (vide item 2.1.1.2. do **Capítulo 2**).

Figura 21. Contato da H12 com o sítio de ligação de coativadores entre homodímeros de PPAR γ relacionados por simetria cristalográfica. Aminoácidos L465-K474 da hélice H12 dos monômeros do homodímero *apo* de PPAR γ são mostrados em amarelo (como superfície de van der Waals - H12 “ativa”- ou como *cartoon* e *sticks* – H12 “inativa”). Em vermelho, oxigênio e em azul, nitrogênio. À esquerda tem-se, representado como *cartoon*, o monômero “inativo” de um homodímero. Esta figura mostra como que este monômero orienta a sua H12

dentro do sítio de interação com CoAs do monômero “ativo” (à direita, representado como superfície) de um outro homodímero relacionado por simetria. As cadeias laterais dos resíduos E471 e K301 resultam nas cargas negativas (vermelho) e positivas (azul), definindo o *charge clamp* da superfície de associação com CoAs.

A estrutura cristalográfica do LBD do complexo ER α -estradiol também revela esta interessante associação da hélice H12 de um monômero com sítio de CoAs de outro monômero²¹⁵. A conformação estrutural do LBD de ER α é bastante similar às verificadas para as estruturas de outros *holo*-LBDs. Entretanto, no caso da estrutura cristalográfica do receptor ER α ligado a estradiol, a hélice 12, a qual não é essencial para a propriedade de ligação de hormônio deste receptor, se estende para distante do corpo da proteína e se liga à superfície da molécula vizinha (de um dímero relacionado por simetria). Nesta estrutura verifica-se que os homodímeros de ER α formam tetrâmeros de uma maneira similar aos tetrâmeros já descritos de RXR (veja **Figura 12, Capítulo 2**), mas sua natureza foi considerada um artefato e atribuída a pontes de sulfeto entre os *loops* dos dímeros que antecedem a H12, os quais seriam responsáveis por “amarrar” este tetrâmero²¹⁵.

Uma outra estrutura cristalográfica do LBD de *holo*-ER feita a partir de proteína carboximetilada, processo o qual altera os resíduos de cisteína, não forma este tipo de tetrâmero²¹⁶. Entretanto, fica a dúvida: a carboximetilação impediu contatos que formariam um tetrâmero fisiologicamente significativo (que não seria amarrado por pontes de sulfeto, dado o ambiente redutor intracelular), ou de fato esta tetramerização é uma artefato do processo de purificação da proteína?

²¹⁵ Tanenbaum, D.M., Wang, Y., Williams, S.P., Sigler, P.B. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95:5998-6003.

²¹⁶ Brzozowski, A.M., Pike, A.C., Dauter, Z., Hubbard, R.E., Bonn, T., Engstrom, O., Ohman, L., Greene, G.L., Gustafsson, J.A., Carlquist, M. (1997) *Nature* 389:753-8.

O contato intermolecular H12/sítio CoAs é similar ao modo de ligação intramolecular da H12 verificado nas estruturas do hER α LBD ligado ao antagonista raloxifene²¹⁶ ou ao antagonista OHT²¹⁷. Estes antagonistas bloqueiam a atividade do receptor por causarem um deslocamento da H12 para a região de contato com os CoAs (Figura 22).

Figura 22. A Comparação entre as estruturas do complexo ternário ER α LBD/agonista/GRIP1 BoxII (A) e do complexo ER α LBD/antagonista (B) revela que, no complexo contendo o antagonista, a H12 (que possui uma sequência LXXML parecida com a sequência LXXLL de interação dos CoAs com receptor nuclear) mimetiza a hélice do coativador (em amarelo)²¹⁷.

Portanto, seja para viabilizar a repressão transcricional realizada por alguns heterodímeros de RXR, seja para explicar a autorepressão do RXR α (ou talvez de outros receptores nucleares) ou para explicar o antagonismo causado por determinados ligantes, a interação intra ou intermolecular H12/sítio CoAs aparenta ser um mecanismo amplamente empregado entre os receptores nucleares. De fato, uma comparação de sequência primária entre o domínio AF-2 das hélices 12 de alguns receptores com os motivos de ligação a receptores de alguns CoAs revela algumas similaridades (Tabela 1).

²¹⁷ Shiau, A.K., Barstad, D., Loria, P.M., Cheng, L., Kushner, P.J., Agard, D.A., Greene, G.L. (1998) *Cell* 95:927-37.

Tabela 1. Alinhamento entre AF-2 e as hélices RID

receptor/CoAs	alinhamento de sequência de aminoácidos	
	Motivo	LXXLL
SRC-1	RID 1	TSHKLVQLLTTT
NCoA-2	RID 1	GQTKLLQLLTTK
P/CIP	RID 1	GHKLLQLLTCS
SRC-1	RID 2	RHKILHRLLQEG
NCoA-2	RID 2	KHKILHRLLQDS
P/CIP	RID 2	KHRILHKLLQNG
SRC-1	RID 3	DHQLLRYLLDKD
NCoA-2	RID 3	ENALLRYLLDKD
P/CIP	RID 3	NNALLRYLLDRD
PPAR γ		LHPLLQEIIYKDL
TR α		FPPLFLEVFEQ
TR β		FPPLFLEVFE
RXR α		IDTFLMEMLEAP
RAR γ		MPPLIREMLENP
ER α		LYDLLLEMLDAH
GR		FPEMLAEIITNQ
PR		FPEMMSEVIAAQ

Tabela 1. Comparação sequencial entre a hélice AF-2 (pertencente à H12) de receptores nucleares com a sequência responsável por promediar a ligação dos CoAs aos receptores nucleares (RID, *Nuclear Receptor Interacting Domain*). Está delineada a região central de resíduos hidrofóbicos que se liga à superfície formada pelas hélices H3, H4, H5 e, nos caso dos CoAs, a H12.

O receptor para os hormônios tireoidianos $\beta 1$ tem sido alvo, há vários anos, de intensas pesquisas sobre seu mecanismo de regulação transcricional. Estes estudos têm, sistematicamente, procurado averiguar a natureza dos seus elementos de resposta ao hormônio, além da maneira como ele se associa ao DNA e ativa a transcrição, procurando entender o papel dos TREs e dos hormônios neste processo.

Até então já se acumularam diversas informações sobre o modo de associação do receptor TR ao DNA e a forma como ele responde aos hormônios no processo de estimulação transcricional. Entretanto, pouco se sabe sobre seu estado oligomérico em solução. Alguns estudos baseados em ensaios de *cross-linking*, coimunoprecipitação e

GST-pulldown têm apontado para um quadro onde o receptor TR encontra-se em solução preferencialmente como monômero e/ou heterodimerizado ao receptor RXR, independente da presença de T3^{185, 186, 187, 188}. Outro estudo, entretanto, propôs que o receptor TR associa-se em solução como homodímeros metaestáveis (portanto fracamente detectáveis). Esta conclusão foi tomada devido a existência de um mutante, o qual não se liga ao DNA, e é capaz de seqüestrar e inibir a atividade (e ligação ao DNA) de receptores selvagens^{167, 218}.

Não existe também nenhum relato sobre a capacidade deste receptor formar oligômeros em solução maiores que homodímeros. O alinhamento seqüencial do domínio LBD do receptor hTRβ1 com o mesmo domínio do receptor hRXRα revelou interessantes similaridades em regiões importantes para tetramerização do receptor RXR (Figura 23).

Figura 23. Comparação entre as seqüências primárias dos LBDs dos receptores *holo*-hTRβ1 e *apo*-hRXRα feita pelo programa ClustalW v1.82.

²¹⁸ Forman, B.M., Yang, C.R., Au, M., Casanova, J., Ghysdael, J., and Samuels, H.H. (1989) Mol. Endocrinol. 3:1610-26.

Os elementos de estrutura secundária observados para os receptores são mostrados acima da sequência de aminoácidos para o TR (boxes em branco, H para hélices e S *-strands-* para fitas) e abaixo da sequência para o RXR (boxes em cinza, H para hélices e S *-strands-* para fitas). “*” significa que os resíduos são idênticos entre as sequências alinhadas, “.” significa que há substituições conservativas e “:” indica substituições semiconservativas. Dentro dos boxes não preenchidos estão as sequências similares ao domínio RID de CoAs, estando a de RXR envolvida no contato de tetramerização H12:H3-H4. Os boxes preenchidos em cinza evidenciam os resíduos responsáveis pela estabilização do contato H12:H3-H4 em RXR. O box azul evidencia resíduos em RXR cujas mutações aboliram a tetramerização deste receptor (veja item **2.1.1.3 do Capítulo 2**).

Com o objetivo de avaliar-se o comportamento de auto-associação em solução do receptor hTR β 1, empregou-se diversas técnicas biofísicas e bioquímicas qualitativas de verificação de estado oligomérico. Avaliou-se com estes estudos a influência dos domínios, do hormônio T3 e de mutações específicas sobre o estado de oligomerização deste receptor. Por fim, com o intuito de determinar-se a relação espacial entre os módulos DBD e LBD empregou-se a técnica de SAXS. O objetivo foi determinar o envelope em solução deste receptor. Paralelo, realizou-se diversas tentativas de cristalização do mesmo. Abaixo seguem as descrições das técnicas empregadas e os resultados obtidos.

3.2. METODOLOGIA

3.2.1. OBTENÇÃO DOS CLONES

As construções hTR β 1 Δ AB aa102-461 (com deleção da porção amino-terminal AB), hTR β 1LBD aa202-461 (contendo somente o LBD), além do hTR β 1 Δ AB L422R e hTR β 1LBD L422R (que rompe a superfície de dimerização) e hTR β 1 Δ AB F451X e hTR β 1LBD F451X (que elimina a hélice H12) foram inseridas em pET 28a(+) (Novagem) e gentilmente cedidas à nós pelo grupo do Dr. Jonh Baxter (Unidade de Pesquisa Metabólica, Centro de Diabetes, Universidade da Califórnia, São Francisco, EUA). Para simplificação, as construções hTR β 1 Δ AB e hTR β 1LBD serão chamadas de TR DBD-LBD e TR LBD, respectivamente. As construções TR DBD-LBD e TR LBD, apesar de truncadas para o domínio N-terminal e N-terminal e DBD, respectivamente, serão referidas como selvagens, enquanto a que as construções com a mutação pontual e a deleção de hélice serão referidas como mutantes.

3.2.2. TRANSFORMAÇÃO DE *E. coli*

3.2.2.1. Preparação de Células Competentes

Uma única colônia de *E. coli* das cepas para expressão gênica [BL21(DE3) ou B834] ou de propagação de plasmídeos (DH5 α) foi inoculada em 10ml de LB (1% Triptose, 0.5% Extrato de Levedura, 1% NaCl) sem antibiótico, durante a noite à 37°C. Um mililitro dessa cultura foi colocado em 200ml de meio LB, o qual foi incubado a 37°C até obter-se DO₆₀₀ = 0.3. Após este passo, a cultura foi rapidamente colocada em gelo por 15min.. O volume total foi vertido em frasco, previamente resfriado, de 250ml e a cultura foi

centrifugada a 5.000rpm (rotor GSA-Sorval) por 10min. a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 10ml de solução de CaCl₂ gelado, filtrado e autoclavado (60μM de CaCl₂, 15% de Glicerol e 10μM de MOPS pH7.0). A cultura foi centrifugada novamente a 5.000rpm por 5min. a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 8ml de solução de CaCl₂. A solução contendo as bactérias competentes foi aliquotada em tubos *eppendorfs* previamente resfriados e estéreis (200μl por tubo) e armazenados a -80°C.

3.2.2.2. Transformação de Bactérias

Os clones foram diluídos 5X em solução de CaCl₂ (60μM de CaCl₂, 15% de Glicerol e 10μM de MOPS pH7.0) e utilizados para transformação de 200μl de bactérias competentes, preparadas pelo método descrito no item acima. Essa mistura foi adicionada às bactérias e mantida no gelo por 30 min. Em seguida, os tubos foram retirados do gelo e mantidos a 42°C por 1 min. Após isto ficaram 2min. em gelo, e, por fim, 2min. em temperatura ambiente. Depois foi acrescentado 1ml de LB sem antibiótico e incubou-se a cultura a 37°C por 1 hora para que as bactérias se multiplicassem e expressassem a resistência ao antibiótico. Trezentos microlitros de cada cultura foram espalhadas em placas de Petri contendo meio de cultura LB sólido e antibiótico adequado. As placas foram incubadas a 37°C por 16 horas para o crescimento das colônias transformadas.

As colônias foram propagadas e utilizadas para minipreparação de plasmídeos, utilizando-se o *Kit* Qiaprep Spin (Qiagen), segundo especificações do fabricante. Os plasmídeos purificados foram digeridos para liberação dos insertos, e analisados através de eletroforese em gel de agarose e visualização das bandas por coloração com Brometo de

Etídeo e luz UV. Além disto, os clones foram seqüenciados utilizando-se do *Kit* Big Dye Terminator (Perkin Elmer) e do seqüenciador automático ABI PRISM/Modelo 377 (Perkin Elmer).

3.2.3. EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS

3.2.3.1. Expressão do TR DBD-LBD (Selvagem e Mutantes)

As condições para expressão deste receptor em *E. coli* foram estabelecidas através de uma série de ensaios padrão de determinação de temperatura, concentração de IPTG (Isopropil- β -D-tiogalactopiranoside) e tempo de indução. A melhor condição verificada é a que descreve-se abaixo.

Inoculou-se o meio de cultura 2XYT (1.6% triptona, 1% extrato de levedura e 0.5% NaCl) contendo 50 μ g/ml de Kanamicina com 1 a 5% de seu volume utilizando-se de pré-cultura crescida ON (*overnight*) a 37°C. A cultura foi incubada a 22°C até a DO₆₀₀ = 1.2-1.3, tendo sido induzida com 1mM de IPTG e suplementada com 5-10 μ M de sulfato de zinco. Manteve-se o crescimento por três a quatro horas e centrifugou-se a cultura por 10min. 6.000rpm à 4°C (rotor GS3-Sorval). O sedimento foi ressuspendido em solução inicial para coluna de afinidade (20ml/litro cultura) contendo 50mM Fosfato Sódio pH7.4, 300mM NaCl, 10% Glicerol, 10mM Imidazol e 2mM de β -mercaptoetanol. Adicionou-se ao homogeneizado: Lisozima (10mg/litro cultura) e PMSF (Fenilmetilsulfonil Fluoride, 1mM final). Deixou-se a Lisozima agir por 20-30min. no gelo. O extrato foi sonificado e depois centrifugado a 14.000rpm por 1 hora à 4°C. O sobrenadante clarificado foi

congelado com nitrogênio líquido e conservado a -80°C ou imediatamente usado para purificação. Todos os passos foram executados mantendo-se as soluções no gelo.

Para preparação de proteína com ligante, adicionou-se o mesmo em um excesso molar de 20-30X e incubou-se por 1 hora com rotação à 4°C . O sobrenadante foi congelado com nitrogênio líquido e armazenado à -80°C para posterior purificação, ou usado imediatamente.

3.2.3.2. Expressão do TR LBD (Selvagem e Mutantes)

As condições para expressão deste receptor em *E. coli* foram estabelecidas através de uma série de ensaios padrão de determinação de temperatura, concentração de IPTG e tempo de indução. A melhor condição verificada é a que descreve-se abaixo.

Inoculou-se um litro de meio de cultura 2X LB (2% Triptona, 2% Extrato de Levedura e 1% NaCl) com pré-cultura crescida ON à 37°C , utilizando-se o volume de pré-cultura determinado pela divisão: $2/\text{Abs}_{600}$ pré-cultura. Cresceu-se à 22°C até $\text{DO}_{600} = 1.5 - 1.6$. Depois de atingida esta DO, induziu-se a expressão da proteína com 0.5mM de IPTG e manteve-se o crescimento das bactérias por 4-6 horas. Após isto, sedimentou-se as bactérias por centrifugação a 5.000rpm (rotor GS3-Sorval) 10min., 4°C . Todos os procedimentos a seguir foram feitos com soluções geladas e mantendo-se os frascos no gelo. O sedimento foi ressuspendido em solução TST (50mM Tris-HCl pH 8.0, 150mM NaCl, 0.05% Tween20, 20mM β -mercaptoetanol), na quantidade 20ml/6g células. Adicionou-se ao homogeneizado: Lisozima (1.4mg/grama de células) e PMSF (1mM final). Deixou-se a Lisozima agir por 20-30min em gelo. O extrato foi sonicado e depois centrifugado a 14.000rpm (rotor SS34-Sorval) por 30min à 4°C .

Para preparação de proteína com ligante adicionou-se o mesmo em um excesso molar de 20-30X e incubou-se por 1 hora com rotação à 4°C. O sobrenadante foi congelado com nitrogênio líquido e armazenado à -80°C para posterior purificação, ou usado imediatamente.

3.2.4. PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA TR DBD-LBD (SELVAGEM E MUTANTES)

3.2.4.1. Purificação por Afinidade

As proteínas foram expressas com uma cauda N-terminal contendo 6 histidinas codificadas pelo plasmídeo pET 28a (+). A presença desta cauda confere à proteína alta afinidade para ligação em resinas de cromatografia contendo íons de metal (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{3+}) quelados, sendo esta técnica conhecida como IMAC (*Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography*). Portanto, o primeiro passo de purificação empregado, para ambas proteínas, foi a técnica de IMAC, tendo sido a eluição da proteína feita com um doador de elétrons que competiu com a proteína pela interação com o metal quelado na resina. O doador empregado foi o Imidazol, o qual é análogo ao anel imidazólico da cadeia lateral do aminoácido histidina.

Incubou-se o extrato preparado com 1ml resina / litro de cultura da resina Talon Superflow (Clontech) equilibrada com solução inicial (50mM Fosfato Sódio pH7.4, 300mM NaCL, 10% Glicerol, 10mM Imidazol), por 30min a 4°C e com agitação. A mistura foi centrifugada por 10min., 500rpm 4°C (centrífuga Eppendorf 5810R rotor A-4-62) e o sobrenadante descartado. Lavou-se a resina com solução inicial contendo 2mM β -mercaptoetanol (utilizando-se bomba peristáltica, o HPLC Akta Purifier - Amersham-

Bioscience - ou rodadas de centrifugação). A eluição foi feita com solução 50mM Fosfato de Sódio pH7.4, 300mM NaCl, 10% Glicerol, 300mM Imidazol e 2mM β -mercaptoetanol. Logo após, as frações foram coletadas, congeladas com nitrogênio líquido e guardadas a -80°C, ou imediatamente submetidas a outro passo cromatográfico.

3.2.4.2. Purificação por Interação Hidrofóbica

Após a purificação por afinidade, as proteínas foram submetidas à purificação por princípios de interação hidrofóbica utilizando-se a coluna Phenyl 5PW 8/7 (TosoH Biosep) e empregando-se o equipamento Akta Purifier (Amersham-Bioscience).

A fração de proteína aplicada na coluna foi previamente acrescida de Sulfato de Amônio para condutividade próxima do tampão inicial (20mM Hepes-Na pH 8.0, 600mM $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$, 1mM DTT - Ditioneitol, em alguns casos, 0.5mM EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético). Após injeção, a resina foi lavada com tampão inicial por 10-20min, fluxo 0.75ml/min. A eluição se deu em passo único 0-100% de solução 20mM Hepes-Na pH 8.0, 1mM DTT, 20% Glicerol, 10% Acetonitrila, e, em alguns casos, 0.5mM EDTA, 0.75ml/min, por 60min.

3.2.4.3. Purificação por Exclusão Molecular

Em alguns casos fez-se mais um passo de purificação da proteína TR DBD-LBD. Empregou-se uma coluna de gel filtração Superdex 200 HR 10/30 (Amersham-Bioscience), a qual foi pré-equilibrada com tampão 20mM Hepes-Na pH 8.0, 1mM DTT, 200 ou 300mM NaCl, e, em algumas vezes, 0.5mM EDTA. As amostras contendo TR

(*apo* ou *holo*) foram reunidas, concentradas até 100 ou 250µl e aplicadas. Realizou-se eluição isocrática com 1.5 volume total de coluna, em taxa de fluxo de 0.5ml/min.

As amostras obtidas foram analisadas em SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) com 10% poliacrilamida. As bandas de proteínas foram visualizadas através de coloração com Coomassie Blue [0.25% de Coomassie Brilliant Blue R-250 (BioRad), 90% de etanol absoluto e 10% de Ácido Acético Glacial]. A quantificação foi feita utilizando-se o método colorimétrico de Bradford empregando-se o *kit* Protein Assay da BioRad (Albumina de Soro Bovino como padrão), segundo especificações do fabricante. Quando necessário, as proteínas foram concentradas através de centrifugação a 1500 x g, 4°C, pelo tempo necessário, utilizando-se do concentrador Amicon Ultra 10MWCO (Millipore).

3.2.5. PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA TR LBD (SELVAGEM E MUTANTES)

3.2.5.1. Purificação por Afinidade

Incubou-se o extrato com 1ml resina Talon Gravity Flow (Clontech) / 6g células, por 1 hora com agitação a 4°C. A resina foi pré-equilibrada com tampão TST contendo 25mM Imidazol. Após a incubação, extrato e resina foram centrifugados a 500rpm (centrifuga Eppendorf 5810R rotor A-4-62), 4min. a 4°C, tendo sido descartado o sobrenadante. Acrescentou-se 20ml tampão 1 (50mM Fosfato de Sódio pH8.0, 300mM NaCl, 10% Glicerol, 0.05% Tween 20, 10mM β-mercaptoetanol) / ml resina. Centrifugou-se e repetiu-se o procedimento de lavagem. A resina foi lavada mais duas vezes da mesma maneira usando-se, entretanto, o tampão 2 (50mM Fosfato de Sódio pH8.0, 300mM NaCl, 10% Glicerol, 10mM β-mercaptoetanol). Após a lavagem, a resina foi transferida para

coluna de plástico Poly-Prep (Bio-Rad), onde deixou-se eluir o restante do tampão de lavagem. Após isso, foram adicionados 3ml de tampão 1 acrescidos de 500mM Imidazol / ml resina. Incubou-se por 10min a 4°C e deixou-se eluir por gravidade.

3.2.5.2. Purificação por Interação Hidrofóbica

A proteína foi submetida, em alguns casos, à coluna de interação hidrofóbica Phenyl 5PW 8/7 (TosoH Biosep) para aumentar o grau de pureza, empregando-se o equipamento Akta Purifier (Amersham-Bioscience).

As frações aplicadas foram acrescidas de Sulfato de Amônio para condutividade próxima do tampão inicial (20mM Hepes-Na pH8.0, 0.5mM EDTA, 600mM $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$, 1mM DTT) e aplicadas na coluna em fluxo de 0.75ml/min. Após isto, lavou-se a resina com tampão inicial por 10min, fluxo 0.75ml/min. A eluição se deu em passo único 0-100% tampão 20mM Hepes-Na pH 8.0, 0.5mM EDTA, 1mM DTT, 20% Glicerol e 10% Acetonitrila, mesmo fluxo, por 60min.

3.2.5.3. Purificação por Exclusão Molecular

Para purificação dos mutantes L422R e F451X, combinou-se as técnicas de purificação por afinidade com a de filtração em gel, tendo sido empregada a coluna Superdex 200 HL 26/60 (Amersham-Bioscience). Aplicou-se 3 ml de amostra e empregou-se eluição isocrática a 2ml/min. com solução 20mM Hepes-Na pH8.0, 300mM NaCl, 3mM DTT. Em alguns casos o receptor selvagem também foi purificado por esta técnica.

As amostras obtidas foram analisadas em SDS-PAGE (concentração de poliacrilamida de 10%) e coradas com Coomassie Blue. A quantificação foi feita utilizando-se o método colorimétrico de Bradford. Quando necessário, as proteínas foram concentradas através de centrifugação a 1500 x g, 4°C, pelo tempo necessário, utilizando-se o concentrador Amicon Ultra 10MWCO (Millipore).

3.2.6. ENSAIOS DE ATIVIDADE

Os ensaios de atividade foram realizados no departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade de Brasília (UNB), Distrito Federal, sob orientação do Prof. Dr. Ralff C. J. Ribeiro. As proteínas foram levadas congeladas e armazenadas em isopor fechado contendo gelo seco, tendo permanecido, portanto, congeladas.

Os ensaios de atividade foram feitos utilizando-se a técnica do *gel shift*, já muito bem estabelecida neste laboratório para estudo das proteínas TR e RXR. O ensaio revela se a proteína conserva as atividades de ligação ao DNA e ao hormônio. Para avaliação dos resultados utilizou-se o que se conhece da literatura sobre associação do TR homodímero em um dado elemento responsivo, e a resposta da proteína à presença do ligante, no referente às propriedades de dimerização dependente do DNA.

3.2.6.1. Marcação Radioativa dos TREs

Para obtenção de fitas dupla de DNA (TRE), os oligonucleotídeos, dissolvidos em TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA), foram misturados na proporção molar 1:1. Colocou-se a solução em banho-maria a 75°C, desligou-se o banho, e deixou-se a solução atingir a temperatura ambiente.

Preparou-se a reação de marcação da seguinte forma: foram misturados 1µg dos oligos anelados com 2µl (10mCi/ml) de γ ATP³², tampão NE T4 Kinase 1X (Biolab), 10U de T4 Polinucleotideo Kinase (Biolab), e água q.s.p. para 20µl. Deixou-se a 37°C por pelo menos 2 horas.

As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 10% preparado com tampão TBE 1X (90mM Tris-Borato, 2mM EDTA), por 1 hora a 200V (40mA). Após migração, expôs-se o gel a um filme autoradiográfico por poucos minutos. Identificou-se no filme autoradiográfico a posição dos oligos marcados e, orientando-se pelo filme, recortou-se do gel os fragmentos que continham o DNA marcado. Os fragmentos de gel foram colocados em *eppendorfs* e acrescidos de TE para a eluição do DNA. Mediu-se a incorporação de radioatividade utilizando-se um equipamento de cintilação líquida.

3.2.6.2. Gel Shift

Para os ensaios de *gel shift* incubou-se, quando necessário, cerca de 2000fmoles de TR com seu respectivo hormônio T3 (3,5,3'-triiodo-L-tironina, Amersham-Bioscience), na concentração final de 10^{-7} M, deixando no gelo por 20-30min. Em seguida, acrescentou-se a proteína com ou sem hormônio a uma mistura contendo solução de ligação 0.2mM de Na₂HPO₄, 0.2mM de NaH₂PO₄, 1mM MgCl₂, 0.5mM EDTA, 20mM NaCl, 5% Glicerol (concentrações finais), 1µg de poli dI-dC (Pharmacia LKB), 2500cpm de TRE marcado e água q.s.p. 25µl. A mistura foi incubada por 20min. a temperatura ambiente (24°C). Submeteu-se as amostras à eletroforese em gel de poliacrilamida 5% não desnaturante, o qual foi previamente submetido a uma corrida por 20min., 200V a 4°C.

Para separar os complexos TR-DNA realizou-se a eletroforese a 4°C por 120-240min., a 220-240V. O tampão de corrida continha 6.7mM Tris-base (pH 7.5), 1mM EDTA e 3.3mM de Acetato de Sódio.

Após eletroforese o gel foi envolto em plástico fino, seco em um secador de gel e exposto a filme autoradiográfico.

3.2.7. ESTUDOS DE OLIGOMERIZAÇÃO EM SOLUÇÃO

3.2.7.1. Eletroforese em Condições Não Desnaturantes

A eletroforese em condições nativas (*Native-PAGE*, *Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) é uma poderosa técnica para o estudo da composição e estrutura de proteínas nativas, uma vez que ambas conformação e atividade biológica permanecem intactas durante este ensaio. A técnica separa as proteínas com base em seu tamanho, carga resultante e conformação.

Géis formados por gradiente de poliacrilamida comprimem as bandas de proteína e permitem boa resolução para a análise dos tipos presentes. O gradiente no gel de separação determina o campo de separação por massa molecular (ou R_h) que é possível analisar em uma corrida. O gradiente de 8-25% de poliacrilamida é adequado para dar uma relação linear entre a distância de migração das proteínas (na forma do coeficiente de retardação $R_f = \text{distância migrada pela proteína} / \text{distância migrada pelo corante Bromophenol Blue}$) e o logaritmo de suas massas moleculares, para proteínas nativas e globulares de tamanho entre 50-750kDa. Da mesma forma, o R_h destas proteínas é diretamente proporcional ao valor de $100[\log(100R_f)]$. A distância de migração de

proteína não globulares ou com cargas muito extremas pode não ser proporcional ao logaritmo da massa molecular.

Para a realização destes estudos, empregou-se o PhastSystem (Amersham-Bioscience) e géis prontos do tipo PhastGel Gradient Media 8-25% de acrilamida. Estes géis possuem uma zona de empilhamento de 13mm e uma zona de separação de 32mm. A espessura é de 0.45mm. O sistema de tampão no gel é de 0.112M Acetato e 0.112M Tris, pH6.4. São também fornecidas tiras de tampão geleificado em agarose contendo 0.88M L-alanina e 0.25M Tris pH 8.8. As condições das corridas são descritas na **Tabela 2**.

Tabela 2. Condições da eletroforese não desnaturante					
Passo	Voltagem	Amperagem	Potência	Temperatura	Vh
Pré-corrida	400V	10 mA	2.5 W	6 °C	10
Aplicação da amostra	400V	1 mA	2.5 W	6 °C	2 a 5
Corrida	400V	10 mA	2.5 W	6 °C	268

Tabela 2. Condições empregadas para eletroforese em condições não desnaturantes no equipamento Phast System (Amersham-Bioscience).

Este experimento foi efetuado a 6°C para a verificação das formas oligoméricas presentes em solução, em uma dada concentração de proteína, e em função da presença de ligante.

Juntamente às amostras, um conjunto de proteínas de peso molecular conhecido, contendo Tireoglobulina, Ferritina, Catalase, Aldolase e Albumina (*kit* SDS-PAGE Molecular Weight Standards High Range, Amersham-Bioscience), foi submetido à eletroforese. Os géis foram corados com Comassie Blue, conforme o fabricante descreve.

Os fatores de retardação (R_f) das proteínas utilizadas como padrões foram graficados como $100[\log(100R_f)]$ *versus* raio hidrodinâmico (R_h). Visto que há uma relação linear

entre estes valores, obteve-se uma equação de reta que foi usada para calcular o R_h das bandas do TR.

3.2.7.2. *Crosslinking* Químico

A técnica de *crosslinking* envolve a reação química de um reagente bifuncional com dois resíduos de aminoácidos dentro de uma mesma proteína, em subunidades adjacentes, ou entre duas proteínas que associam entre si. O tamanho do braço espaçador entre os dois grupos funcionais pode ser ajustado de maneira a favorecer ligações intramoleculares (espaçadores curtos, em geral 5Å) ou produtos intermoleculares (espaçadores longos, tipicamente 11 a 16Å). Os grupos funcionais em cada extremidade podem ser o mesmo (homobifuncional) ou diferentes (heterobifuncional). Os grupos funcionais do reagente de ligação podem ser designados a reagir com grupamentos aminas (K, R), sulfidrilas (C), carboxilas (D, E), entre outros.

Apesar de haver muitas opções de agentes para *crosslinking* disponíveis, um ponto de partida freqüentemente usado é testar a reatividade de grupamentos aminas das proteínas com agentes direcionados para cadeias laterais de lisina e/ou arginina. Para estes resíduos, o grupo reativo reside na extremidade da cadeia lateral, uma posição um tanto quanto remota em relação à cadeia principal da proteína, sendo, portanto, mais acessível a reagentes extrínsecos. Reagentes do tipo succinimidil (DSS, por exemplo) oferecem bons resultados na ligação de proteínas.

Pelos motivos citados acima, escolheu-se o reagente homobifuncional *Suberic Acid bis (N-hydroxysuccinimide Ester)* (DSS- Sigma Aldrich) para os ensaios. Os grupos

reativos deste composto são ésteres de NHS os quais são reativos através de aminas primárias.

Para este experimento, 1µl do reagente DSS diluído em Dimetil Sulfoxide, em diversas concentrações, foi adicionado em 9µl de proteínas a 1mg/ml. As concentrações finais de DSS utilizadas foram 0.02µM, 0.05µM, 0.2µM, 0.5µM, 1µM e 2.5µM.

A mistura foi incubada a temperatura ambiente (25°C) por 15min. tendo sido a reação encerrada com 3µl de Etanolamina a 1M. Todos os passos foram realizados em temperatura ambiente para que não ocorresse hidrólise do DSS, somente a proteína foi mantida no gelo até que a mistura fosse preparada.

As amostras foram submetidas a SDS-PAGE com 10% de poliacrilamida e as bandas visualizadas com Coomassie Blue. Aplicou-se, juntamente às amostras, marcadores de alto peso molecular (*kit* Molecular Weight High Range, BioRad).

Como controle do experimento, outras proteínas, como a Albumina Bovina (67kDa) e a Transtirretina (16kDa), foram submetidas ao *crosslinking*. Observou-se, com estes experimentos, as bandas correspondentes aos estados oligoméricos esperados para as mesmas.

3.2.7.3. Gel Filtração Analítica

Através da técnica de gel filtração, as moléculas em solução são separadas, enquanto migram pela matriz, de acordo com diferenças em seus tamanhos. Os poros presentes no gel da matriz são preenchidos pela fase líquida e devem ser comparáveis em tamanho às moléculas que se deseja separar. Moléculas relativamente pequenas podem se difundir para dentro dos poros, enquanto que moléculas maiores terão maior dificuldade de se

difundir para dentro do gel. Moléculas suficientemente grandes serão completamente incapazes de penetrar nos poros e ficarão confinadas à solução que cerca os poros. Desta forma, moléculas muito grandes (fora do limite de separação da resina) sairão no volume equivalente ao *void volume* da coluna (líquido intersticial) e as demais serão separadas segundo sua capacidade de ficarem retidas nos poros.

Para os estudos de oligomerização das proteínas TR LBD e TR DBD-LBD, nas formas *apo* e *holo*, empregou-se, respectivamente, as colunas de gel filtração Superdex 75 HR 10/30 (Amersham-Bioscience), e Superdex 200 HR 10/30 (Amersham-Bioscience). As colunas foram pré-equilibradas com o tampão 20mM Hepes-Na pH 8.0, 0.5mM EDTA (para TR LBD), 1mM DTT, 300mM NaCl. Realizou-se eluição isocrática com 1.5-2 volumes total de coluna em taxa de fluxo de 0.5ml/min., tendo sido aplicado 0.25ml de proteína.

Para verificação dos raios hidrodinâmicos (R_h) das proteínas separadas por esta técnica, realizou-se uma “calibração” das colunas. Para tal, foram utilizados os *kits* de calibração de coluna de gel filtração para alto e baixo peso molecular (Amersham-Bioscience). Desta forma, aplicou-se um conjunto de proteínas de baixo molecular contendo Ribonuclease A (1.64nm), Quimiotripsinogênio A (2.09nm), Ovalbumina (3.05nm) e Albumina (3.55nm), e um conjunto de alto de peso molecular contendo Aldolase (4.81nm), Catalase (5.22nm), Ferritina (6.1nm). Empregou-se a concentração protéica, volume e fluxo indicados pelo fabricante. Blue Dextran foi utilizado para determinar o V_o (*void volume*) da coluna. Sabendo-se o V_e (volume de eluição) das proteínas calculou-se o K_{av} sendo ele dado por:

$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$, onde V_t é o volume total da coluna. Os valores obtidos foram plotados

como $\sqrt{-\log(K_{av})}$ versus o R_h das proteínas padrão. Obteve-se uma equação de reta, a qual foi empregada para o cálculo do R_h das proteínas em estudo.

3.2.7.4. Espalhamento de Luz Dinâmico

A Espectroscopia de Fotocorrelação (PCS) ou DLS (*Dynamic Light Scattering*) investiga a correlação entre o espalhamento de fótons por uma partícula no tempo. O espalhamento de luz é uma técnica alternativa para caracterização de perturbação de sistemas protéicos, como equilíbrio de sedimentação, espectroscopia de fluorescência e UV, cromatografias, viscometria, NMR e espectroscopia de massa, entre outras.

Lasers podem fornecer luz de alta intensidade, monocromático e pouco divergente. No experimento de DLS, a luz da fonte de laser é enviada através de uma amostra líquida contendo as partículas de interesse, sendo espalhada por estas partículas. O espalhamento de luz pela matéria ocorre devido à interação dos elétrons com a radiação incidente. A interação induz a conversão desses elétrons em dipolos oscilantes que re-emitem a radiação.

Para estudar a luz espalhada, um detector é colocado em uma dada posição, de maneira que uma região bem definida do espalhamento possa ser detectada, por exemplo, aquela perpendicular ao laser incidente. A intensidade da luz detectada, que é proporcional, entre outros, à distância do objeto espalhador em relação ao detector, é

transformada em um sinal elétrico e enviada para um correlator para análise de suas propriedades estatísticas.

O auto-correlator leva em conta o sinal que chega e multiplica-o pelo sinal que chega instantes depois. Desta maneira, a técnica de espalhamento de luz dinâmico mede as flutuações na intensidade de luz espalhada pela amostra, em função do movimento da mesma. Pelo tempo de duração da aquisição de dados estes valores multiplicados são somados. A função de correlação da intensidade resultante descreve a aleatoriedade do sinal de luz espalhado. Isto pode ser comparado a olhar-se uma sobreposição de figuras tomadas em tempos um pouco diferentes. Se nada na figura se mover, a sobreposição de duas figuras não mostrará mudanças. Entretanto se o objeto na figura anterior se mover significativamente da sua posição original, a sobreposição de figuras mostrará um borrão, terá uma aparência difusa. Pode-se pensar a função de correlação como descrevendo o “esfumaçamento” da luz espalhada. Quando as partículas ou moléculas em uma solução se moverem em aproximadamente um comprimento de onda (uma distância característica da luz de laser), então a figura de sobreposição será limpa. A função de autocorrelação terá decaído o seu valor para um sinal totalmente randômico.

A luz espalhada por uma amostra de proteína, mais especificamente a função de autocorrelação obtida com a variação do espalhamento com o tempo, contém informações sobre sua taxa de difusão. Esta informação é bastante valiosa para caracterização de tamanho hidrodinâmico, conformação, interações ou agregação de biomoléculas e podem ser estudados como uma função de vários parâmetros de preparação.

O movimento de partículas é caracterizado por uma equação de difusão no espaço real. Se a função P descreve qual a probabilidade de se achar uma partícula próxima de outra, então esta função pode obedecer à equação de difusão $\nabla^2 P - \frac{1}{D} \frac{\partial}{\partial t} P = 0$.

A transformada de Fourier de P é uma função exponencial com uma taxa de decaimento negativa igual à Dq^2 , onde D é o coeficiente de difusão da partícula e q o vetor de onda incidente (que é constante). Esta transformada de Fourier pode ser ajustada à função de correlação da luz espalhada. Se as moléculas são lentas (maiores), elas apresentarão um decaimento da função de correlação mais demorado que o de moléculas mais rápidas (menores).

Obtendo-se o valor de coeficiente de difusão, pode-se calcular o raio hidrodinâmico que uma esfera equivalente deveria possuir para se mover com a mesma constante de difusão que os espalhadores na amostra, utilizando-se a equação de Stokes Einstein

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta Rh}, \text{ onde } k_B \text{ é a constante de Boltzmann, } T \text{ a temperatura absoluta em Kelvin, } \eta$$

é a viscosidade do solvente e o Rh é o raio hidrodinâmico da partícula em solução. O raio hidrodinâmico dá uma boa indicação do tamanho do objeto.

A inversão matemática de Laplace da função de correlação pode prever a distribuição de tamanhos dos objetos que contribuem para a medida. Isto pode ser útil para encontrar pequenas quantidades de agregados em uma amostra. Espalhamento de luz é muito sensível para detectar qualquer grande espalhador, porque o sinal espalhado por uma grande espalhador é muito mais forte que o sinal de um pequeno espalhador. Entretanto isto também é uma limitação da técnica: se há muito agregados eles irão sobrepujar o sinal de espalhamento das partículas menores.

A técnica de DLS foi empregada para estudar o estado de oligomerização em solução dos receptores purificados, em função da concentração de proteína e da presença de T3. Empregou-se o equipamento DynaPro MS200 (Protein Solutions) e os dados foram analisados pelo programa Dynamics V5.26 (Protein Solutions). As medidas foram realizadas a 4°C com tempo de aquisição de 2.5 segundos, 30 aquisições por medida, utilizando-se cubetas de quartzo de 12µl. Foram feitas 3-5 medidas sequenciais para cada concentração das formas *apo* e *holo*, tanto para o TR LBD, quanto para o DBD-LBD, selvagens e mutantes. As características do solvente foram consideradas no cálculo do *R_h*. As medidas foram promediadas para os valores de raio hidrodinâmico ($\pm$ SD). Todas as amostras foram centrifugadas a 10.000rpm por 10min. a 4°C antes de serem medidas.

3.2.8. ESPALHAMENTO DE RAIOS X A BAIXOS ÂNGULOS

Descrito no Capítulo 2.

3.2.9. CRISTALIZAÇÃO DE MACROMOLÉCULAS

Descrito no Capítulo 2.

Os ensaios de cristalização foram conduzidos para a proteína TR DBD-LBD (ligada ao T3 ou na forma *apo*) utilizando-se os *kits* Cristal Screen I e II, Grid Screens NaCl, MPD, PEG 6000, NH₄SO₄ e Cristal Screen Lite (Hampton Research), *kits* JBScreen e da Molecular Dimension, assim como soluções preparadas para refinamentos de condições dos *kits* que aparentaram serem promissoras.

Também foram feitos ensaios utilizando-se *screens* de Fosfato de Potássio em diferentes pH e força iônica, porém concentração fixa de PEG 3350. A concentração de

PEG foi determinada previamente por um teste de precipitação que consistiu em misturar o PEG à proteína para determinadas concentrações finais e verificação, após 30min - 1 hora, da presença de precipitado na solução. Gotas com volumes de 5-10 μ l contendo proteína e PEG foram dispostas em lamínulas e as mesmas foram dispostas sobre um recipiente fechado para evitar-se evaporação durante o tempo de espera. Uma vez detectada a concentração de PEG que gerou precipitado, passou-se a empregar, nos ensaios de cristalização, a concentração imediatamente menor. Portanto, variou-se, nas gotas, a força iônica, na forma de concentração de Fosfato de Potássio (ou Sódio), e o pH da solução, mantendo-se fixa a concentração de PEG. A idéia deste tipo de experimento é diminuir-se o número de parâmetros em teste durante o ensaio de cristalização, o que pode facilitar na escolha do caminho a seguir.

As técnicas *de hanging drop* e *sitting drop* foram empregadas com soluções de poço de 1 ou 0.5ml, concentrações variadas de proteína, proteína com diferentes graus de pureza e temperaturas de 4°C e 18°C.

3.3. RESULTADOS

3.3.1. PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS

3.3.1.1. Receptor Tireoidiano

O seqüenciamento dos vetores contendo os insertos que codificam para as proteínas estudadas (selvagens e mutantes) confirmaram a seqüência prevista para os mesmos (dados não mostrados).

A proteína TR DBD-LBD, nas formas *apo* e *holo*, foi purificada pelas técnicas de IMAC, e interação hidrofóbica. A última coluna garantiu a homogeneidade das amostras purificadas com T3, quanto à presença de somente proteína ligada ao hormônio, dado que este passo cromatográfico promove a separação entre as formas *apo* e *holo* (dados não mostrados)²¹⁹.

O domínio LBD selvagem foi purificado pelas técnicas IMAC e interação hidrofóbica, enquanto que os mutantes foram submetidos às colunas de afinidade e gel filtração. O comportamento desta proteína na coluna de gel filtração garante a separação entre as formas *apo* e *holo* do receptor. Na **Figura 24**, são mostrados géis de eletroforese das proteínas selvagens purificadas tipicamente obtidas com as cromatografias descritas.

²¹⁹ Apriletti, J.W., Baxter, J.D., Lau, K.H., and West, B.L. (1995) *Protein Expr. Purif.* 6:363-70.

Figura 24. SDS-PAGE corado com Comassie Blue de *pools* de frações de processos de purificação contendo a proteína TR DBD-LBD e TR LBD.

TR DBD-LBD (A) e TR LBD (B) após cromatografia de afinidade, fenil e gel filtração. Marcadores de peso molecular: BSA (67kDa), Ovalbumina (45kDa), Anidrase Carbônica (30kDa), Inibidor de Tripsina de Soja (22.4kDa). As mutações não modificaram o perfil de purificação normalmente obtido com as proteínas selvagens. As massas calculadas com base na sequência de aminoácidos (segundo programa ProtParam toll, www.expasy.org) para as proteínas TR DBD-LBD e TR LBD são 43.4kDa e 31.7kDa, respectivamente.

3.3.1.2. Heterodímero TR DBD-LBD (T3) / *apo*-RXR DBD-LBD

Dada a grande tendência para formação de heterodímeros entre TR e RXR em solução, em detrimento à formação de homodímeros TR/TR e RXR/RXR^{172, 183}, para produção do heterodímero *holo*-TR DBD-LBD / *apo*-RXR DBD-LBD o procedimento adotado foi simplesmente a mistura de ambas proteínas. Procurou-se partir de condições iniciais tais que ambas proteínas estivessem com o equilíbrio entre as formas oligoméricas deslocado para presença de dímeros e monômeros.

Assim, TR complexado com T3 em concentração menor que 1mg/ml (produzido por purificação em coluna de afinidade ou afinidade e interação hidrofóbica, segundo descrito em **Metodologia**) foi misturado a RXR sem hormônio, na mesma concentração e volume, eluído de coluna de Q-sepharose (**Anexo 1**). Dado que o tamanho destas proteínas é muito próximo (cerca de 40kDa para RXR e 43.4kDa para TR) assumiu-se que se teria a mesma quantidade em moles das duas proteínas se misturássemos ambas

na mesma concentração e volume. Após a mistura, o complexo foi incubado por 1 hora à 4°C e aplicado em gel filtração.

Utilizou-se a coluna Superdex 75 HR 10/30, em solução 20mM Hepes-Na pH 8.0, 0.5mM EDTA, 1mM DTT, 300mM NaCl, injeção de 500µl de amostra, e eluição isocrática a 0.5ml/min. Escolheu-se esta coluna pois ela possui uma gama de separação mais estreita (3-80kDa), o que propicia melhor resolução para proteínas nesta faixa. Esperava-se, desta forma, separar melhor os monômeros dos dímeros. A **Figura 25** ilustra o resultado obtido em conjunto com a verificação do perfil cromatográfico de cada proteína quando aplicada na coluna isoladamente e nas mesmas condições.

Figura 25. (A) Cromatogramas superpostos mostrando perfis de eluição da proteína TR DBD-LBD ligada ao T3 (linha azul), da proteína *apo*-RXR DBD-LBD (linha verde) e do complexo TR (T3) + *apo*-RXR (linha vermelha) da coluna de gel filtração Superdex 75 HR 10/30.

Experimento monitorado pela absorvância no ultravioleta, a 280 nm, no eixo vertical, *versus* volume no eixo horizontal. O segundo eixo Y indica o *Rh* de proteínas padrões aplicadas na coluna, estando o volume de eluição das mesmas indicado por pontos pretos no gráfico (Catalase, 5.22nm, Aldolase, 4.81nm, Ovoalbumina, 3.05nm, Quimiotripsinogênio, 2.09nm, e Ribonuclease A, 1.64nm). (B) SDS-PAGE das frações coletadas (9-12, cada fração contendo 1ml) após cromatografia da mistura TR+RXR, corado com Coomassie Blue. M = marcador de peso molecular BSA (67kDa), Ovalbumina (45kDa), Anidrase Carbônica (30kDa), Inibidor de Tripsina de Soja (22.4kDa). A massa calculada com base na sequência de aminoácidos (segundo programa ProtParam tool, www.expasy.org) da proteína RXR DBD-LBD é de 40.5kDa.

A **Figura 25A** mostra os cromatogramas obtidos após a passagem dos receptores na coluna de gel filtração, isoladamente, e depois de combinados e incubados por 1 hora. É visível o deslocamento de pico referente à cromatografia da mistura TR+RXR em relação à posição dos picos obtidos com passagem de TR e RXR isoladamente. Em **25B** tem-se SDS-PAGE das frações obtidas após passagem da mistura TR + RXR. Nota-se no gel a presença de duas bandas com ligeira diferença de tamanho e visualmente com mesma intensidade. Estes dados parecem apontar para a formação de heterodímeros entre TR e RXR. Os estudos de cristalização foram realizados somente com a fração inicial do pico obtido.

Alguns experimentos de purificação do complexo TR/RXR foram feitos utilizando-se a coluna Superdex 200 HL 26/60, injeção de 3ml e taxa de fluxo 2ml/min. (dados não mostrados).

3.3.1.3. Complexos Proteína-DNA

O heterodímero TR DBD-LBD (T3) / *apo*-RXR DBD-LBD foi preparado conforme descrito no item anterior. O heterodímero foi incubado com o elemento responsivo DR4 em excesso molar de cerca de 2X por 1 hora à 4°C em agitação, e novamente aplicado na gel filtração. Utilizou-se Superdex 200 HL 26/60 (Amersham-Bioscience), em solução Fosfato de Potássio pH 7.8, 5mM MgCl₂, 1mM DTT.

Para verificar o comportamento das proteínas em solução, na presença do DNA, fez-se eletroforese em condições nativas em gradiente linear de poliacrilamida de 8-25% (descrito na **Metodologia**). Desta maneira, aplicou-se na eletroforese o heterodímero TR/RXR antes da adição do DR4 e após adição e purificação do complexo proteína-DNA. O pico eluído que continha TR/RXR+DR4 foi analisado por *Native-PAGE* em duas canaletas. Uma porção do gel, que continha o marcador, o heterodímero TR/RXR sem o DNA e uma das amostras de heterodímero TR/RXR ligado ao DNA foi corada com Comassie Blue. Outra porção que continha o complexo TR/RXR+DR4 foi corada com Brometo de Etídeo, um corante tipicamente usado para identificar fragmentos de DNA (**Figura 26**).

Figura 26. *Native- PAGE* (gradiente linear 8-25%) do heterodímero TR/RXR sem DNA (TR/RXR) a 1.4mg/ml, TR/RXR ligado à DR4 (TR/RXR+DR4) a 0.5mg/ml, corado com Comassie Blue ou com Brometo de Etídeo. M = marcadores de peso molecular, Tireoglobulina (*Rh* 8.5nm), Ferritina (440kDa, *Rh* 6.5nm), Catalase (*Rh* 5.22nm), Lactato Desidrogenase (*Rh* 4.3nm) e Albumina (*Rh* 3.55nm).

Os resultados revelaram que o complexo TR/RXR, na ausência do DNA, migrou no experimento de *Native*-PAGE como duas bandas com raios aproximados do esperado para o dímero dos receptores (4.3nm, veja item 3.3.3.), sendo eles 4.46nm e 4.03nm, e uma banda com *Rh* igual a 3.38nm (próximo ao esperado para o monômero destes receptores, 3.4nm, veja item 3.3.3.). Na presença de DNA, a banda de migração mais lenta desapareceu e uma nova banda, mais intensa e mais rápida, se formou. O raio calculado para esta banda foi de 3.96nm, um tanto menor que o raio do dímero, talvez por uma questão do efeito de carga do DNA (que é negativa, para as condições do ensaio - pH8.8). Além desta banda, uma outra de raio monomérico também foi revelada. A presença de DNA nestas duas bandas foi confirmada pela coloração com Brometo de Etídeo. Também foi realizado um controle negativo de coloração com o Brometo, o qual revelou que a coloração com este elemento é específica para a presença do DNA (dados não mostrados).

Com o objetivo de separar-se melhor o complexo proteína-DNA do DNA livre em excesso realizou-se outro experimento de purificação empregando-se desta vez a coluna Superdex 75 HR 10/30, solução 20mM Hepes-Na pH8.0, 300mM NaCl, 5mM MgCl₂, 3mM DTT, injeção de 250μl, fluxo 0.5ml/min. O receptor TR DBD-LBD foi produzido na forma *holo* purificando-se pelas colunas de afinidade e fenil. O receptor RXR DBD-LBD foi obtido purificando-se pelas técnicas de afinidade e gel filtração. Ambas proteínas foram misturadas na proporção molar 1:1 e incubadas 1 hora à 4°C. Misturou-se DR4 dupla fita na proporção molar 2:1, incubou-se mais 1 hora à 4°C e aplicou-se na coluna.

Obteve-se um cromatograma com dois picos bem distintos, cujos conteúdos foram verificados por *Native-PAGE*, corada primeiramente com Brometo e posteriormente com Comassie Blue para localização simultânea da proteína e do DNA. Esta eletroforese indicou a separação do complexo proteína-DNA do DNA livre (dados não mostrados).

3.3.2. ESTUDOS FUNCIONAIS

As proteínas empregadas nos estudos foram expressas em sistema heterólogo (*E.coli*), tendo sido produzidas com uma cauda de histidina N-terminal. As proteínas selvagens foram expressas com deleção do domínio amino terminal (TR DBD-LBD) ou com deleção dos domínios amino terminal e de ligação ao DNA (TR LBD). Apesar das deleções e da cauda de histidina, as proteínas mostraram atividade relativa aos domínios presentes. TR DBD-LBD apresentou as apropriadas funções de ligação de ligante e DNA (**Figura 27**). A atividade do TR LBD foi provada pela cristalização deste domínio com diferentes ligantes (**Capítulo 4**). As mutações L422R e F451X também não interferiram com a atividade das proteínas^{190, 220}. A construção TR DBD-LBD é similar à usada para as análises do estado de oligomerização do RXR^{221, 222, 223}. As atividades das proteínas TR DBD-LBD e TR LBD foram verificadas somente de maneira

²²⁰ Marimuthu, A., Feng, W., Tagami, T., HOA Nguyen, H., Jameson, J.L., Fletterick, R.J., Baxter, J.D., and West, B.L. (2002) *Mol. Endocrinol.* 16:271–86.

²²¹ Kersten, S., Kelleher, D., Chambon, P., Gronemeyer, H. and Noy, N. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92:8645-49.

²²² Kersten, S., Pan, L., Chambon, P., Gronemeyer, H., and Noy, N. (1995) *Biochemistry* 34:13717:721.

²²³ Kersten, S., Pan, L., and Noy, N. (1995) *Biochemistry* 34:14263:69.

qualitativa, não tendo sido feito ensaios que, por exemplo, caracterizassem porcentagem de proteínas purificadas ativas.

Figura 27. Ensaios de *Gel Shift* do receptor TR DBD-LBD com os elementos responsivos F2 e DR4.

TR expresso em bactéria e contendo a cauda de histidina se liga a TREs específicos e altera seu padrão de ligação em resposta ao hormônio T3. (A) Sequência de oligonucleotídeos correspondente aos TREs usados no ensaio de *gel shift*. (B) Autoradiograma do ensaio de *gel shift*. A proteína expressa em *E.coli* foi incubada 20min. a 24°C com [P^{32}]DR-4 (2500cpm) sem T3 (linha 1) e com T3 (concentração de ligante de 10^{-7} M) (linha 2), [P^{32}]F2 (2500cpm) sem T3 (linha 3) e com T3 (concentração de ligante de 10^{-7} M) (linha 4). Os complexos TR-DNA foram resolvidos em gel de poliacrilamida 5% não desnaturante. As setas indicam os complexos TR-DNA monomérico (M) e dimérico (D).

3.3.3. ESTUDOS DE OLIGOMERIZAÇÃO EM SOLUÇÃO DAS PROTEÍNAS SELVAGENS

Recentemente nosso grupo publicou o envelope do receptor nuclear RXR DBD-LBD nas formas dimérica e tetramérica (**Capítulo 2**).

Através do programa HydroPro²²⁴, o qual computa as propriedades hidrodinâmicas de macromoléculas rígidas (proteína globulares, pequenos ácido nucléicos) a partir de suas estruturas atômicas, especificada por coordenadas que podem ser fornecidas por um modelo cristalográfico (ou até mesmo um gerado por SAXS), pode-se calcular, entre outros valores, o *Rh* destas partículas. Assim, utilizando-se dos modelos de *dummy*

²²⁴ García de la Torre, J., Huertas, M.L. and Carrasco, B. (2000) *Biophys. J.* 78:719-30.

(feitos pelo programa DAMMIN a partir dos dados de SAXS) do RXR DBD-LBD, calculou-se os R_h para a forma monomérica, dimérica e tetramérica desta proteína. Os valores obtidos foram, respectivamente, 3.37nm, 4.15nm e 5.6nm. Dados prévios de SAXS do tetrâmero do próprio receptor TR DBD-LBD indicaram um R_h de 6.0nm. Estes valores foram assumidos como sendo próximos aos valores de R_h para as mesmas formas oligoméricas do receptor TR DBD-LBD, dado que ambas proteínas possuem mesma massa molecular e a estrutura dos domínios serem altamente conservadas.

Com a utilização deste programa e o arquivo depositado no banco de dados para a estrutura do tetrâmero do RXR LBD (PDB ID 1G1U), pôde-se calcular os R_h do monômero, dímero e tetrâmero deste LBD. Os valores obtidos foram 2.6nm, 3.32nm e 3.98nm, os quais foram assumidos como sendo os R_h esperados para a forma monomérica, dimérica e tetramérica, respectivamente, da proteína TR LBD.

Estes valores de R_h teóricos foram usados como guias para determinação dos estados oligoméricos do receptor TR.

3.3.3.1. Eletroforese em Condições não Desnaturantes

3.3.3.1.1. TR DBD-LBD

No intuito de se examinar os possíveis estados de oligomerização do receptor TR DBD-LBD em solução, nas formas *apo* e *holo* TR (12μM), submeteu-se esta proteína à eletroforese sob condições não desnaturantes. Três bandas distintas foram observadas para a forma *apo* da proteína (**Figura 28**). Em contraste, para o *holo*-TR, foi observada somente uma banda, a qual correspondeu a banda intermediária da forma *apo*.

Com as análises da migração de cada uma das amostras foi possível obter os raios hidrodinâmicos correspondentes à cada banda. Para o *apo*-TR, a banda mais rápida apresentou um raio hidrodinâmico de 3.5nm, a intermediária apresentou um raio de 4.02nm, enquanto a banda mais lenta apresentou um raio de 4.86nm. A única banda encontrada na análise do *holo*-TR apresentou um valor de raio hidrodinâmico de 3.95nm. Baseando-se nos valores de *Rh* esperado para as diferentes formas oligoméricas do TR DBD-LBD, concluiu-se que a banda de 3.5nm corresponde ao monômero, a de 4.02nm (e 3.95nm) ao dímero e a de 4.86 provavelmente se refere ao tetrâmero.

De acordo com esses resultados obtidos pode-se afirmar que o TR DBD-LBD apresenta-se em solução como uma mistura de formas oligoméricas e que a adição do ligante promove a estabilização de dímeros, nas condições analisadas.

Figura 28. Eletroforese do TR DBD-LBD sob condições não desnaturantes em géis de gradiente 8-25% no sistema *PhastSystem*, pH8.8, 6°C e corados com prata.

A concentração de TR aplicado foi de 12µM tanto na ausência do T3 (-T3) como na presença (+T3). Proteínas padrão de raios hidrodinâmicos conhecidos (Tireoglobulina, 8.5nm, Ferritina, 6.1nm, Catalase, 5.22nm, Lactato Desidrogenase, 4.3nm e Albumina Bovina, 3.55nm) foram submetidos a eletroforese, juntamente com o TR, e seus fatores de retardação (*Rf*) foram medidos e plotados como $[100\text{Log}(100 R_f)]$ versus *Rh*. A equação de reta obtida foi empregada para o cálculo do *Rh* das bandas de TR. T, tetrâmero; D, dímero; M, monômero.

3.3.3.1.2. TR LBD

A análise da segunda banda que migra mais rapidamente na eletroforese da porção *apo*-LBD sugere que ela seja relativa à forma dimérica (raio de 3.6nm) (**Figura 29**). O gel empregado, no gradiente utilizado, não apresenta proporção linear entre a migração e *Rh* (ou logaritmo do peso molecular) para proteínas menores que 50kDa. Desta forma, os valores de *Rh* e MW obtidos para a forma monomérica não são coincidentes com o esperado (2.6nm), tendo sido 3.16 e 3.34nm para as formas *holo* e *apo*, respectivamente. A migração acelerada da forma *holo* é esperada, uma vez que se sabe que a presença do ligante induz mudanças conformacionais na porção LBD dos receptores de maneira a compactá-lo. Ambas proteínas foram analisadas a 16.5μM.

Em resumo, a proteína TR DBD-LBD, na concentração analisada no gel (12μM) apresenta-se como dímero na presença do ligante T3, e monômero, dímero e tetrâmero na ausência do mesmo. O domínio LBD (16.5μM) mostrou estar na forma monomérica, quando ligado ao hormônio, e ser uma mistura de dímero e monômero, quando sem ligante.

Figura 29. Eletroforese do TR LBD sob condições não desnaturantes em géis de gradiente 8-25% no sistema *PhastSystem*, pH8.8, 6°C e corados Coomassie.

Aplicou-se 16.5μM da proteína na forma *apo* (-T3) e *holo* (+T3). Proteínas padrão de raios hidrodinâmicos conhecidos (Ferritina, 6.1nm, Catalase, 5.22nm, Lactato Desidrogenase, 4.3nm e Albumina Bovina, 3.55nm) foram submetidas a eletroforese, juntamente com o TR, e seus fatores de retardação (*Rf*) foram medidos e plotados como [100Log(100 *Rf*)] versus *Rh*. A equação de reta obtida foi empregada para o cálculo do *Rh* das bandas de TR. D, dímero; M, monômero.

3.3.3.2. *Crosslinking* Químico

Para confirmar a composição de oligômeros do TR, este receptor, tanto contendo seus dois domínios (DBD-LBD), quanto com somente o domínio LBD, foi covalentemente ligado com o reagente DSS e analisado por eletroforese do tipo SDS-PAGE.

Quando na ausência do ligante, TR DBD-LBD apresentou uma banda relativa à massa esperada para monômero (43.4kDa) nas mais baixas concentrações de DSS, havendo, com o aumento da concentração deste reagente, um deslocamento para a presença de dímero e tetrâmero, segundo a massa verificada para cada banda (próximo de 86.8kDa e 173.6kDa, respectivamente) (**Figura 30A**). A proteína TR DBD-LBD, ligado a T3, apresentou bandas de monômero, dímero e, a altas concentrações de DSS (quando o gel foi corado intensamente), de tetrâmero (**Figura 30B**).

Segundo os estudos de *crosslinking*, a forma *apo* do domínio LBD está em solução como uma mistura entre dímero e monômero, podendo-se observar tetrâmero nas altas concentrações de DSS (**Figura 30C**). Observou-se que, mesmo nas mais altas concentrações de DSS usadas, não houve a formação de tetrâmero de *holo*-TR LBD (**Figura 30D**), tendo sido observado monômero e uma fraca banda de dímero.

O ensaio de *crosslinking* confirmou a capacidade do TR DBD-LBD de se associar como tetrâmero na ausência do T3 e revelou uma fraca capacidade de tetramerização do TR LBD.

Figura 30. Crosslinking químico de TR DBD-LBD sem ligante (A) e ligado ao T3 (B); TR LBD sem T3 (C) e com T3 (D).

1mg/ml de cada proteína reagiu com DSS e as amostras foram resolvidas por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 10%, pH8.8. Paralelo às amostras migrou-se proteínas com massa conhecida. As concentrações finais de DSS, em μM , estão indicadas nas figuras. Os géis foram corados com *Coomassie blue*, em tempos diferentes, por isso a diferença de intensidade das bandas.

3.3.3.3. Gel Filtração Analítica

3.3.3.3.1. TR DBD-LBD

Os raios hidrodinâmicos calculados para os volumes de eluição da proteína sem ligante, aplicada em diversas concentrações (entre 23-230 μM), variaram de 4.4 a 5.2nm.

O R_h cresceu à medida que se aumentou concentração de proteína aplicada.

Os valores de R_h indicaram que a proteína eluiu como dímero quando aplicada na concentração de $23\mu\text{M}$ e como tetrâmero quando aplicada na concentração de $230\mu\text{M}$. Nas concentrações intermediárias foram verificados valores intermediários de R_h (4.65nm para $69\mu\text{M}$ e 4.9nm para $138\mu\text{M}$ injetado), além de picos alargados e assimétricos, dados estes indicativos da mistura de dímero com tetrâmero nas frações eluídas (**Figura 31A**).

Figura 31. Experimento de gel filtração analítica da proteína TR DBD-LBD.

Cromatogramas superpostos mostrando perfis de eluição isocrática de experimentos independentes (monitorada pela absorbância no ultravioleta, a 280 nm, no eixo vertical, *versus* volume no eixo horizontal) da proteína TR DBD-LBD sem ligante (A) ou ligada ao T3 (B) aplicada nas diversas concentrações indicadas nas figuras. Utilizou-se a coluna de gel filtração Superdex 200 HR 10/30. Eluição com tampão 20mM Hepes-Na pH 8.0, 0.5mM EDTA, 300mM NaCl, 1mM DTT. O segundo eixo Y indica o R_h de proteínas padrões aplicadas na coluna, estando o volume de eluição das mesmas indicado por pontos pretos no gráfico. Aplicou-se Ferritina (6.1nm), Catalase (5.22nm), Aldolase (4.81nm), Albumina (3.55nm), Ovalbumina (3.05nm), Quimiotripsinogênio A (2.09nm) e Ribonuclease A (1.64nm).

Quando a proteína foi preparada com o ligante T3, de maneira a obterem-se preparações homogêneas quanto à presença de somente proteína ligada, verificou-se que, aplicando-se a concentração de 23 μ M, somente eluiu monômero (3.2nm). As aplicações de proteína nas concentrações 69 μ M e 138 μ M resultaram na eluição de dímero (4.4 e 4.2nm, respectivamente). Quando injetou-se 230 μ M de proteína observou-se um grande pico de dímero (4.1nm) e um pequeno pico de tetrâmero (5.7nm) (**Figura 31B**). Em todas as frações eluídas verificou-se a presença do TR através de SDS-PAGE (dados não mostrados).

Os resultados indicaram claramente que o receptor TR DBD-LBD, na ausência de ligante, tende a se associar como dímero e tetrâmero de uma maneira dependente de concentração protéica. A presença do tetrâmero foi fortemente prejudicada pela presença do ligante, indicando uma relação direta entre a presença do hormônio e a capacidade de tetramerização. A associação como dímero não foi impedida pela presença do ligante, mas foi enfraquecida, uma vez que, por exemplo, na aplicação da proteína *apo* a 23 μ M, mesmo após a diluição de cerca de 10 vezes que se observa com passagem pela coluna, observou-se a eluição de dímero, enquanto que a proteína *holo* se dissociou em monômero, para o ensaio nas mesmas condições.

3.3.3.3.2. TR LBD

Na **Figura 32A** apresentam-se os cromatogramas obtidos com a passagem da porção LBD sem ligante. Quando a concentração aplicada foi de 333 μ M o pico eluído indicou um raio de 3.34nm, próximo ao esperado para dímero. À medida que se diminuiu a concentração aplicada, um “ombro” à direita foi surgindo. O raio equivalente

aos picos eluídos foi diminuindo para valores intermediários entre o raio dimérico e o monomérico, com a diminuição da concentração. Obteve-se 3.29nm, 3.23nm e 3.05nm, para as respectivas concentrações de 200 μ M, 100 μ M e 33.3 μ M. Na concentração de 16.6 μ M de TR aplicado, este segundo pico se “desprende” e apresentou um valor de raio de 2.18nm.

Figura 32. Experimento de gel filtração analítica da proteína TR LBD.

Cromatogramas superpostos mostrando perfis de eluição isocrática de experimentos independentes (monitorada pela absorbância no ultravioleta, a 280 nm, no eixo vertical, *versus* volume no eixo horizontal) da proteína TR LBD sem ligante (A) ou ligada ao T3 (B) aplicada nas diversas concentrações indicadas na figura. Utilizou-se a coluna de gel filtração Superdex 75 HR 10/30. Eluição com tampão 20mM HEPES-Na pH 8.0, 0.5mM EDTA, 300 mM NaCl, 3mM DTT. O segundo eixo Y indica o *Rh* de proteínas padrões aplicadas na coluna, estando o volume de eluição das mesmas indicado por pontos pretos no gráfico. Aplicou-se Albumina (3.55nm), Ovalbumina (3.05nm), Quimiotripsinogênio A (2.09nm) e Ribonuclease A (1.64nm).

Verificou-se que, na presença do ligante T3, mesmo até na maior concentração utilizada (333 μ M), a porção LBD do receptor TR eluiu com raio característico esperado para o monômero (2.6nm, 2.65nm, 2.66nm e 2.7nm para as concentrações de 33.3 μ M, 100 μ M, 200 μ M e 333 μ M, respectivamente). Entretanto, à medida que a concentração aumentou, este raio sofreu um ligeiro aumento e o pico perdeu simetria. Uma “protuberância” ficou aparente no lado esquerdo do pico, indicando que formas oligoméricas maiores também eluíram, porém não foram resolvidas pela coluna (**Figura 32B**).

Portanto, somente nas concentrações extremas de 33.3mM (para o TR ligado com T3) e 333 μ M (para TR sem ligante) que se obteve raios mais próximos aos esperados para a forma monomérica e dimérica, respectivamente. Nas concentrações intermediárias, verificou-se valores intermediários de raios, provavelmente indicando deslocamento de equilíbrio para a forma dimérica, no caso do *holo*-TR, à medida que se aumentou a concentração, e para a forma monomérica, à medida que se diminuiu a concentração do *apo*-TR. Em todas as frações eluídas verificou-se a presença do TR através de SDS-PAGE (dados não mostrados).

Os resultados obtidos com os ensaios de gel filtração analítica concordam os estudos de gel nativo. A proteína TR DBD-LBD eluiu da coluna de gel filtração, quando aplicadas a 138 μ M (concentração de saída de cerca de 14 μ M), como uma mistura de dímero e tetrâmero (TR DBD-LBD *apo*, **Figura 31A**) e somente como dímero (TR DBD-LBD *holo*, **Figura 31B**). O gel nativo também apresentou estas formas oligoméricas quando se aplicou 12 μ M de proteína (**Figura 29**). A proteína TR LBD eluiu, quando aplicada a 200 μ M (concentração de saída foi cerca de 20 μ M) como uma

mistura de dímero e monômero (TR LBD *apo*, **Figura 32A**) e predominantemente como monômero (TR LBD *holo*, **Figura 32B**). A análise do gel nativo, a 16.5 μ M, apresentou os mesmos resultados (**Figura 10**).

3.3.3.4. Espalhamento de Luz Dinâmico

Esta técnica permite conhecer, entre outros valores, o raio hidrodinâmico de partículas em solução. Partindo-se do suposto que se conhece as formas oligoméricas existentes em solução (por exemplo, dímero e tetrâmero, ou monômero e dímero) pode-se calcular, à partir do *Rh* medido, que porcentagem de cada espécie deve haver em solução para obter-se o raio medido. Este cálculo foi feito pelo programa Dynamics 5.26.60 (Protein Solution), tendo sido fornecido os valores de massa e *Rh* esperado para cada forma oligomérica. Entretanto, é importante ressaltar que os valores obtidos com estes cálculos são meramente especulativos, se referindo à apenas uma possível interpretação dos resultados obtidos.

Outro tratamento que se fez com os dados de DLS foi um ajuste (sigmoidal ou polinomial) dos diversos raios obtidos com o incremento da concentração, utilizando-se o programa Origin v7.0. Uma vez que se acredita que a técnica de DLS não é a ferramenta ideal para caracterização quantitativa de transições de estados oligoméricos de proteínas, como a caracterização de constantes de associação, por exemplo, o ajuste dos dados foi feito meramente para a facilitação visual das diferenças de comportamento das proteínas dado as diferentes condições analisadas.

3.3.3.4.1. TR DBD-LBD

Os resultados demonstrados na **Figura 33** e **Tabela 3** referem-se à proteína TR DBD-LBD na presença e ausência de ligante T3. TR DBD-LBD sem ligante apresenta, na concentração de $2.3\mu\text{M}$, o raio próximo ao esperado para o tetrâmero, indicando uma provável mistura entre dímero e tetrâmero. Na concentração de $46\mu\text{M}$ os tetrâmeros predominam. Dado que a sensibilidade do equipamento não permitiu medidas muito abaixo de $2.3\mu\text{M}$, não foi possível determinar se existem monômeros de *apo*-TR DBD-LBD em solução.

Na presença do ligante nota-se que na mínima concentração observada ($1.61\mu\text{M}$) a espécie predominante é a monomérica. Entre $2.07\mu\text{M}$ e $11.5\mu\text{M}$ verifica-se um equilíbrio entre monômero e dímero havendo um deslocamento para a forma dimérica com o incremento da concentração, de maneira que em $11.5\mu\text{M}$ a forma predominante é a dimérica. Entre $13.8\mu\text{M}$ e $276\mu\text{M}$ os tetrâmeros começam a se formar, mas até a última concentração medida eles não predominam.

Os resultados de DLS repetem o que foi anteriormente verificado com os demais estudos. O receptor TR DBD-LBD, na ausência de T3, tende a se associar como tetrâmeros em solução. A presença do ligante promove a dissociação da proteína para dímero e monômero.

Tabela 3. Medidas de Rh de TR DBD-LBD obtidas com ensaios de DLS

Proteína	Concentração (μ M)	Rh (nm) ¹ $\pm$ SD	%Monomero ²	%Dímero ³	%Tetramero ⁴
Apo-TR DBD-LBD	2.3	4.95 $\pm$ 0.31	0	82.2	17.8
	6.9	5.36 $\pm$ 0.17	0	63.4	36.6
	11.5	5.31 $\pm$ 0.03	0	66.2	33.8
	23	5.70 $\pm$ 0.39	0	38.1	61.9
	46	6.01 $\pm$ 0.10	0	0	100
	92	6.46 $\pm$ 0.20	0	0	100
	115	6.35 $\pm$ 0.33	0	0	100
	170.2	6.60 $\pm$ 0.11	0	0	100
Holo-TR DBD-LBD	1.61	3.63 $\pm$ 0.13	90.72	9.79	0
	2.07	3.76 $\pm$ 0.38	82.6	17.4	0
	4.6	4.14 $\pm$ 0.33	40.6	59.4	0
	11.5	4.30 $\pm$ 0.10	0	100	0
	13.8	4.32 $\pm$ 0.20	0	99.6	0.4
	23	4.54 $\pm$ 0.13	0	94.6	5.4
	27.6	4.62 $\pm$ 0.14	0	92.5	7.5
	34.5	4.60 $\pm$ 0.05	0	93	7
	73.6	4.79 $\pm$ 0.09	0	87.6	12.4
	144.9	5.11 $\pm$ 0.13	0	75.9	24.1
	209.3	5.25 $\pm$ 0.23	0	69.4	30.6
	276	5.36 $\pm$ 0.16	0	63.4	36.6

Tabela 3. ¹ Raio hidrodinâmico (Rh) expresso $\pm$ desvio padrão (SD) das medidas. ^{2, 3, 4} Porcentagens de monômero, dímero e tetramero, calculadas pelo programa Dynamics 5.26.60 (Protein Solutions) a partir da média de Rh obtida.

3.3.3.4.2. TR LBD

Os resultados obtidos com os ensaios com o domínio LBD na forma *apo* revelaram que a mais baixa concentração analisada ($1.58\mu\text{M}$) já apresenta uma mistura entre dímero e tetrâmero e, com o aumento da concentração, o tetrâmero rapidamente predomina ($6.3\mu\text{M}$) (**Figura 34 e Tabela 4**).

Na presença do ligante, verificou-se que, mesmo na mais baixa concentração medida ($2.52\mu\text{M}$) a presença de dímeros já é pronunciada, e em $6.5\mu\text{M}$ eles predominam. Tetrâmeros começam a aparecer a partir de $25.2\mu\text{M}$, e até a última concentração analisada ele representa somente uma menor fração da mistura.

Figura 34. Gráfico indicando relação do raio hidrodinâmico ($\pm$ SD) medido pela técnica de *Dynamic Light Scattering* (DynaPro -Protein Solutions) com a concentração da proteína TR LBD na ausência (pontos azuis) e presença de ligante (pontos vermelhos). As linhas pontilhadas pretas indicam um ajuste sigmoidal feito para os dados pelo Origin Pro v7.0.

Tabela 4. Medidas de Rh de TR LBD obtidas com ensaios de DLS

Proteína	Concentração (μM)	Rh (nm) ¹ ± SD	%Monomero ²	%Dímero ³	%Tetramero ⁴
Apo-TR LBD	1.58	3.76±0.00	0	62.5	37.5
	6.3	4.05±0.14	0	0	100
	15.75	4.19±0.02	0	0	100
	25.2	4.23±0.01	0	0	100
	31.5	4.20±0.14	0	0	100
	63	4.25±0.19	0	0	100
	126	4.39±0.10	0	0	100
	189	4.36±0.14	0	0	100
	252	4.50±0.19	0	0	100
	315	4.58±0.07	0	0	100
	409.5	4.73±0.02	0	0	100
Holo-TR LBD	2.52	3.09±0.27	59.5	40.5	0
	3.15	3.23±0.22	30.9	69.1	0
	6.3	3.31±0.20	4.23	95.8	0
	25.2	3.38±0.06	0	97.1	2.91
	31.5	3.34±0.02	0	99.1	0.9
	63	3.50±0.09	0	89.9	10.1
	94.5	3.45±0.08	0	93.2	6.85
	157.5	3.48±0.03	0	91.2	8.75
	189	3.59±0.11	0	82.8	17.2
	220.5	3.67±0.19	0	74.7	25.3
	252	3.78±0.08	0	59.2	40.8
	299.25	3.78±0.16	0	59.2	40.8

Tabela 4. ¹ Raio hidrodinâmico (Rh) expresso ± desvio padrão (SD) das medidas. ^{2, 3, 4} Porcentagens de monômero, dímero e tetrâmero, calculadas pelo programa Dynamics 5.26.60 (Protein Solutions) a partir da média de Rh obtida.

Contrariamente aos demais experimentos, os resultados de DLS mostraram que o receptor TR LBD, na ausência de T3, se associa como tetrâmero em solução, enquanto que a presença do ligante promove a dissociação do domínio para dímero e monômero. Outra constatação da técnica é a de que o LBD, na presença do T3, ainda é capaz de dimerizar.

A técnica de DLS é a menos perturbativa entre todas as empregadas, sendo, por este motivo, a que melhor descreve o verdadeiro equilíbrio entre as formas oligoméricas

em solução. Devido a esta propriedade da técnica, interpretou-se os resultados assumindo-se que o domínio LBD apresenta superfície(s) envolvida(s) com o processo de tetramerização. Entretanto, por algum motivo, o tetrâmero formado quando a proteína possui somente o domínio de ligação a hormônio associa-se mais fracamente em relação ao tetrâmero formado pela proteína contendo também o domínio DBD. Por este motivo, acredita-se que o tetrâmero de LBD se dissociou durante as análises por gel filtração e gel nativo e não pôde ser detectado. O dímero do *holo*-LBD também deve se associar fracamente, tendo sido possível detectá-lo somente pelos ensaios de DLS.

3.3.4. ESTUDOS DE OLIGOMERIZAÇÃO EM SOLUÇÃO DAS PROTEÍNAS MUTANTES

Os estudos anteriores realizados com o receptor TR contendo os domínios DBD e LBD ou somente LBD apontaram inequivocamente para a capacidade deste receptor formar homotetrâmero em solução. Além disto, a formação deste tetrâmero mostrou ser condicionada pelo aumento da concentração da proteína e pela ausência de seu ligante específico, revelando similaridades entre os comportamentos de homotetramerização dos receptores TR e RXR. Também foi mostrado com os experimentos, que existe(m) superfície(s) de tetramerização no domínio LBD, sendo o domínio DBD de alguma maneira importante para estabilização do tetrâmero.

As constatações de que o ligante T3 é capaz de provocar a dissociação do tetrâmero de TR e que o domínio LBD é importante para a tetramerização, levantaram a hipótese de que o homotetrâmero de TR seria formado de maneira similar ao tetrâmero de RXR. Vale lembrar que o tetrâmero de RXR é formado por um dímero de

homodímeros; estes últimos se associam por uma superfície (compreendida principalmente por uma porção da hélice H10 do LBD) que também está envolvida com a dimerização de outros receptores nucleares, inclusive de TR. Esta superfície é chamada de superfície de dimerização, e é essencial para a função de ativação transcricional dirigida pelo homodímero de RXR. Os homodímeros associam entre si de uma maneira simétrica, através das chamadas superfícies de tetramerização, presentes no domínio LBD e que compreendem os contatos recíprocos H11/H11, H3/H3 e H12/H3-H4 (sítio de ligação de CoAs) entre os monômeros de um dímero com os monômeros do outro dímero¹⁰⁹. Este último contato explica o mecanismo de autorepressão do homotetrâmero de RXR, e está envolvido com a dissociação do tetrâmero na presença de 9-*cis*.

Com o intuito de verificar a superfície envolvida na homodimerização do receptor TR em solução, e a influência da hélice H12 do domínio LBD na homotetramerização deste receptor, realizou-se estudos de oligomerização em solução do TR DBD-LBD e TR LBD contendo mutações. Uma das mutações é pontual e chave para a dimerização deste receptor sobre seus elementos responsivos, enquanto que a outra mutação promove a deleção da hélice H12.

3.3.4.1. Superfície de Dimerização

Foi mostrado que o resíduo de leucina na posição 422 é um resíduo essencial para heterodimerização do receptor TR (**Figura 35**) com a proteína RXR em solução, e para homodimerização do TR na presença dos elementos responsivos F2 e DR4. A

substituição deste resíduo pelo de arginina rompe a capacidade do receptor de se dimerizar nestas circunstâncias¹⁹⁰.

Figura 35. Estrutura do LBD de hTR β 1 (PDB ID 1BSX) evidenciando os aminoácidos importantes para heterodimerização TR-RXR em solução (resíduos E393 e L400 na H10, em verde, e P419, L422, M423, T426, e M430 na H11, em azul), sendo alguns destes também importante para homodimerização do TR em F2 e DR4 (L400, L422 e M423)¹⁹⁰.

O comportamento de oligomerização em solução do receptor TR LBD contendo a mutação pontual L422R foi avaliado pela técnica de espalhamento de luz dinâmico, na presença e ausência de T3. A influência da mutação L422R fica evidente quando se analisa sua influência no comportamento de auto-associação do *apo*-LBD (**Figura 36A**). Verificou-se que *apo*-TR LBD selvagem se associa em solução como dímero e tetrâmero, havendo um deslocamento do equilíbrio para a formação de tetrâmero com o incremento da concentração. O mutante L422R apresenta raios próximos ao esperado para o dímero até as mais altas concentrações analisadas.

Figura 36. Gráfico indicando relação do raio hidrodinâmico medido ($\pm$ SD) pela técnica de *Dynamic Light Scattering* (DynaPro -Protein Solutions) com a concentração do receptor. (A) TR LBD L422R sem ligante (triângulos em azul claro) em comparação com a proteína *apo* selvagem (pontos azuis escuros). (B) TR LBD L422R ligado à T3 (triângulos rosa) em comparação com a proteína *holo* selvagem (pontos vermelhos). As linhas pontilhadas pretas indicam um ajuste sigmoidal ou polinomial feito para os dados pelo Origin Pro v7.0.

TR LBD L422R ligado a T3 apresentou capacidade de dimerização diminuída em relação ao LBD *holo* selvagem e, até a concentração de cerca de 55 μ M, apresentou raios bem próximos ao do monômero (**Figura 36B**). Isto se deve, provavelmente, a

combinação das forças dissociativas representadas pelo ligante T3 e pela quebra da interface de dimerização.

Os resultados obtidos com os ensaios de DLS apontam o resíduo da L422 como sendo importante para a interface de dimerização de homodímeros de TR em solução. O mesmo tipo de estudo também foi feito com a proteína *holo*-TR DBD-LBD L422R. Os dados indicaram que, devido à mutação, alguma forma oligomérica com *Rh* intermediário entre dímero e tetrâmero se formou em solução (dados não mostrados). Embora seja difícil precisar o que de fato se formou em solução, uma hipótese é de que se trata de alguma forma dimérica alongada, propiciadas por outra interface de associação que não a que tem sido discutida aqui. Outra proposição é a de que, apesar da mutação, os dímeros de TR ainda se associam, talvez devido à presença do DBD. Os raios intermediários obtidos seriam resultantes de uma mistura entre dímero e tetrâmero, proveniente da constante de dissociação de ligante alterada que este mutante apresenta (afinidade relativa igual 69% da K_d - constante de dissociação - do TR selvagem¹⁹⁰).

3.3.4.2. Superfície de Tetramerização

A **Figura 37** mostra o mapa topográfico do LBD de TR (PDB ID 1BSX) evidenciando as estruturas secundárias presentes e ilustrando os aminoácidos deletados na construção F451X. Este mutante foi criado colocando-se um códon *stop* na posição 451.

Figura 37. Mapa topográfico do LBD de TR (PDB ID 1BSX).

O mutante F451X apresenta um códon *stop* na posição 451 e, portanto, possui a hélice 12 deletada (resíduos a partir da seta). As setas verdes indicam resíduos de interação com CoAs, enquanto que os pontos vermelhos marcam os resíduos que fazem contato com o hormônio T3.

O estudo por DLS do TR LBD F451X sem ligante mostrou que a mutação promoveu um deslocamento do equilíbrio entre dímero e tetrâmero para o favorecimento da formação de dímero. O tetrâmero é formado, mas em mais altas concentrações de proteína. O que contrasta com o comportamento do *apo*-LBD selvagem, para o qual a tetramerização é propiciada mesmo nas concentrações protéica menores (**Figura 38A**).

O LBD mutante F451X *holo* segue a tendência do LBD selvagem *holo* de se apresentar em um equilíbrio entre monômero e dímero que se desloca para a formação dimérica com o incremento da concentração (**Figura 38B**).

Figura 38. Gráfico indicando relação do raio hidrodinâmico medido ($\pm$ SD) pela técnica de *Dynamic Light Scattering* (DynaPro -Protein Solutions) com a concentração do receptor.
(A) TR LBD F451X sem ligante (quadrados em azul claro) em comparação com a proteína *apo* selvagem (pontos azuis escuros). (B) TR LBD F451X ligado à T3 (quadrados rosa) em comparação com a proteína *holo* selvagem (pontos vermelhos). As linhas pontilhadas pretas indicam um ajuste sigmoidal ou polinomial feito para os dados pelo Origin Pro v7.0.

Estudos de DLS do receptor mutante F451X, contendo os domínios DBD-LBD e sem o ligante T3, mostrou que, apesar da mutação, o receptor continuou tetramerizando, aparentemente da mesma maneira que o receptor DBD-LBD selvagem sem ligante (dados não mostrados). Este resultado evidenciou que, diferentemente da mutação no receptor contendo somente o LBD, a deleção da hélice 12, somente, não foi capaz de

romper a tetramerização do DBD-LBD. Este resultado corrobora para a hipótese de que o domínio DBD estabiliza o tetrâmero.

3.3.5. ESTUDOS DE SAXS

3.3.5.1. Metodologia

Estes estudos foram realizados em estreita colaboração com os alunos de doutoramento Hannes Fischer, e Mario de Oliveira Neto, do Instituto de Física da USP/SãoCarlos, orientado pelo Prof. Igor Polikarpov.

Os dados de SAXS foram coletados na linha SAS do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas, Brasil) utilizando-se de um detector unidimensional (1D) sensível à posição²²⁵. O receptor TR DBD-LBD, em várias concentrações e na ausência e presença de T3, foi medido utilizando-se o comprimento de onda $\lambda=1.488\text{\AA}$ e distância amostra-detector de 1033mm. Desta maneira foi possível cobrir o momento de transferência de $0.01\text{\AA}^{-1} < q < 0.35\text{\AA}^{-1}$ ($q=4\pi\sin\theta/\lambda$, onde θ é metade do ângulo de espalhamento).

As concentrações empregadas foram, para o TR DBD-LBD com T3, 2.75mg/ml, 5.5mg/ml, 8.75mg/ml e 11mg/ml. A proteína sem ligante foi medida a 2.3mg/ml, 6.3mg/ml e 9.5mg/ml. As proteínas foram produzidas por purificação segundo os princípios de afinidade e interação hidrofóbica (descritos em **Metodologia**).

As curvas de espalhamento da solução de proteína e da mesma solução contendo todos os componentes, exceto a proteína, foram coletadas em várias etapas de 1-2

²²⁵ Kellermann, G., Vicentin, F., Tamura, E., Rocha, M., Tolentino, H., Barbosa, A., Craievich, A.F., Torriani, I. (1997) *J. Appl. Crystallog.* 30:880-3.

minutos para monitorar-se os danos causados pela radiação à amostra, além da estabilidade do feixe. Os dados foram divididos pela intensidade do feixe incidente e multiplicados pela absorção da amostra. O espalhamento da solução contendo todos os componentes, exceto a proteína, foi subtraída da curva de espalhamento da solução contendo a proteína, e a curva de diferença foi normalizada pela concentração protéica e pela resposta não homogênea do detector.

O efeito de *smearing*, o qual é causado pela janela de entrada de 8mm de altura do detector, foi corrigido pelo programa de transformada inversa de Fourier GNOM²²⁶. Este programa também calculou as funções de distribuição de distâncias $p(r)$ e os raios de giro (R_g) da proteína nas diversas concentrações. As massas moleculares dos oligômeros de TR β em solução foram estimadas pela comparação das intensidades de espalhamento extrapoladas para $q=0$, $I(0)$, com aquela extrapolada para o espalhamento da solução de referência contendo Albumina de Soro Bovino (BSA, 66kDa). Antes das análises de forma, um valor de intensidade constante foi subtraído da curva experimental para se assegurar que a intensidade a altos ângulos decaísse como q^{-4} , seguindo, portanto a lei de Porod²²⁷.

O valor desta constante foi calculado verificando-se a inclinação da porção linear assintótica ($q \rightarrow \infty$) obtido de um gráfico $q^4 I(q)$ versus q^4 , o qual foi feito pelo programa de determinação de modelos de átomos *dummy* (feito pelo DAMMIN)¹¹⁶. Este procedimento reduz a contribuição do espalhamento produzido pelas pequenas flutuações de densidade eletrônica dentro da proteína e produz a função de espalhamento de forma. Esta função é o que se espera de um modelo de duas densidades

²²⁶ Svergun, D.I. (1992) *J. Appl. Crystallog.* 25:495-503.

²²⁷ Porod, G. *Small-angle X-ray Scattering* London, Academic Press, pp. 17-51, 1982.

eletrônicas (isto é, moléculas de proteína embebidas em um solvente, ambas as fases possuindo densidade eletrônica constante).

As formas do dímero e tetrâmero de TR foram restauradas a partir dos dados experimentais usando um método *ab initio* implementado pelo programa DAMMIN¹¹⁶.

As coordenadas atômicas cristalográficas para ambos domínios LBD e DBD do TR foram obtidas a partir de resultados do nosso grupo (estrutura cristalográfica do LBD de TR α humano resolvido pelo grupo, dados em publicação²²⁸) e do banco de dados PDB (ID 2NLL, estrutura do DBD e *hinge* de TR). Os modelos foram construídos utilizando-se o programa MASSHA¹²⁸.

Os valores de R_g , D_{max} , e curvas de espalhamento foram calculados a partir das coordenadas atômicas (DBD e LBD combinados), ou dos modelos médios de *dummy*, utilizando-se o programa CRY SOL, levando-se em conta a influência da camada de solvatação¹²¹. As discrepâncias entre os modelos cristalográficos em relação aos dados experimentais foram calculadas também por este programa. Já o SUPCOMB¹³⁰ foi usado para sobrepor o modelo *ab initio* de baixa resolução com a estrutura cristalográfica “montada”.

3.3.5.2. Resultados

O receptor TR β encontra-se em solução em um equilíbrio entre as formas monomérica, dimérica e tetramérica, ditado pela concentração protéica e presença de

²²⁸Nunes, F.M., Aparicio, R., Santos, M.A.M, Portugal, R.V., Dias, S.M.G., Neves, F.A.R., Simeoni, L.A., Baxter, J.D., Webb, P. and Polikarpov, I. (2004) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* (em publicação).

ligante. Em função disto, procurou-se verificar através do programa OLIGOMER²²⁹ as porcentagens relativas à presença de cada forma oligomérica, dado os parâmetros citados.

Os valores calculados indicaram que (1) o TR DBD-LBD com T3 em baixa concentração (2.75mg/ml, 63.25µM) encontra-se principalmente na forma dimérica (80% de dímero), (2) o receptor sem ligante em concentração similar encontra-se principalmente como tetrâmero, mas com importante contribuição dimérica (3) a proteína com T3 em concentrações protéicas média e alta (acima de 5.5mg/ml, 126.5µM) já se apresenta principalmente como tetrâmero e (4) o receptor sem ligante em média e alta concentração apresentou-se fortemente agregado.

Verificou-se que, tanto o TRβ DBD-LBD ligado a T3, quanto o sem T3, mostraram curvas de intensidade de SAXS muito parecidas para médias e altas concentrações de proteína. Além disto, o receptor sem ligante mostrou-se fortemente agregado a altas concentrações. Em função destes fatores, optou-se por extrair as informações estruturais dos dados obtidos do espalhamento do TRβ com T3 em uma concentração onde o tetrâmero predominou. Portanto, as curvas de espalhamento experimental do receptor TRβ nas formas dimérica (TR DBD-LBD com T3 a 2.75mg/ml) e tetramérica (TR DBD-LBD com T3 a 8.25mg/ml) são apresentadas na **Figura 39**.

²²⁹ Konarev, P.V., Volkov, V.V., Sokolova, A.V., Koch, M.H.J. and Svergun, D.I (2003). *J. Appl. Cryst.*, 36:1277-82.

Figura 39. Curvas experimentais de espalhamento do TR dimérico (A) e tetramérico (B) (1), curvas de espalhamento do envelope após modificação para o espalhamento da estrutura interna (2), espalhamento calculado dos modelos de *dummy* (3), espalhamento calculado dos modelos de PDBs combinados (4).

Para o dímero, a forma da função $p(r)$ indicou um objeto alongado, sendo o $D_{max}=120.0\text{\AA}$ e o $R_g = 37.87\text{\AA}$. Os valores de $D_{max} = 230\text{\AA}$ e $R_g = 63.95\text{\AA}$ obtidos dos dados de espalhamento do tetrâmero e a forma da função de distribuição $p(r)$ sugerem que o tetrâmero é mais alongado do que o dímero. (**Figura 40**).

Figura 40. Função de distribuição de distâncias do dímero e tetrâmero de TR β DBD-LBD.

Os modelos de *dummy* construídos pelo programa DAMMIN foram derivados dos dados experimentais assumindo-se uma simetria P2 para o dímero e P222 para o tetrâmero. As restrições de simetria resultaram em uma redução significativa no número de parâmetros livres dos modelos.

O volume de busca para o dímero foi preenchido com $N_{\text{DAM}} = 2598$, e um raio de empacotamento $r_0 = 4\text{\AA}$ dentro de uma esfera com $D_{\text{max}} = 120\text{\AA}$. O volume de busca para o tetrâmero foi preenchido com $N_{\text{DAM}} = 4124$, e um raio de empacotamento $r_0 = 6.5\text{\AA}$ dentro de uma esfera com $D_{\text{max}} = 230\text{\AA}$. Para verificar-se a validade dos modelos

de DAMs construídos, foram realizadas várias construções independentes. Em todos os casos foram obtidos envelopes similares (dados não mostrados) sendo o modelo apresentado uma média dos modelos obtidos (**Figura 41**).

Figura 41. Sobreposição da média de modelos de *dummy* com os modelos cristalográficos combinados do dímero (A, 20 modelos) e tetrâmero (B, 40 modelos) de TR DBD-LBD. Da esquerda pra direita tem-se uma rotação de 90° no eixo y e, em seguida, uma de 90° no eixo x.

Os parâmetros derivados das estruturas de DAMs concordaram bem com os valores experimentais (**Tabela 5**).

Os modelos cristalográficos dos domínios LBD e DBD puderam ser posicionados de maneira não ambígua dentro do modelo de baixa resolução do dímero de TR. Para o posicionamento dos LBDs respeitou-se a superfície de dimerização prevista pelos estudos de mutação (e que concorda com a superfície de dimerização do receptor RXR). Para construção deste modelo de dímero de TR LBD, utilizou-se o programa SUPCOMB e os modelos cristalográficos do LBD de TR α com agonista e do tetrâmero de RXR LBD. Com este programa, ajustou-se cada monômero de TR para a posição de cada monômero de RXR, criando-se, desta forma, um tetrâmero de TR. Os homodímeros foram separados, e, utilizando-se o programa MASSHA, os DBDs foram encaixados, assim como os LBDs ajustados entre si, de maneira a se obter a menor discrepância com os dados experimentais.

Para construir-se o homotetrâmero, gerou-se outro homodímero por simetria P2, e ajustou-se o posicionamento relativo entre ambos através de movimentos de translação (no sentido de aproximá-los ou afastá-los) e da rotação de 50° de um, enquanto manteve-se o outro fixo. Estas modificações foram necessárias para obter-se um melhor ajuste com os dados experimentais. Desta maneira, os LBDs puderam ser bem posicionados na porção central do modelo de baixa resolução do tetrâmero, de maneira idêntica ao modelo de tetrâmero do RXR DBD-LBD (**Capítulo 2**). Os modelos cristalográficos combinados são mostrados na **Figura 41** sobrepostos aos modelos de *dummy*. Os parâmetros calculados a partir dos modelos cristalográficos combinados concordaram com os dados experimentais (**Tabela 5**).

Tabela 5. Parâmetros estruturais do dímero e tetrâmero de TR

Parâmetro	hTRβ DBD-LBD dímero			hTRβ DBD-LBD tetrâmero		
	Exp. ^a	Mod. ^b	DAM ^c	Exp. ^a	Mod. ^b	DAM ^c
Massa (kDa)	79.0	-	-	191.0	-	-
D_{max} (Å)	120.0	130.2	123.40	230.0	229.7	201.4
R_g (Å)	37.87	37.87	38.8	63.95	59.67	56.54
V (nm ³)	-	148.2	142.7	-	307.4	218.4
Parâmetros livres	9.87 ^d	11.76	1299 ^e	20.9 ^d	18.0	1031 ^f
Discrepância χ	-	0.886	0.889	-	1.686	1.42
Resolução (Å)	22.0	-	22.0	21.0	-	21.0

Tabela 5. Parâmetros estruturais do dímero e tetrâmero de TR

^a Exp., calculados a partir dos dados experimentais.

^b Mod., parâmetros obtidos dos modelos de PDB combinados.

^c DAM, parâmetros obtidos da média de 20 (dímero) ou 40 (tetrâmero) modelos de átomos *dummy*.

^d Número de canais de Shannon é dado por $N_s = [D_{max}(q_{max} - q_{min})]/\pi$.

^e Simetria P2 imposta.

^f Simetria P222 imposta.

Os dados experimentais de SAXS primeiramente confirmaram a existência do homodímero e do homotetrâmero de TR em solução. Houve uma impossibilidade de se trabalhar com os dados obtidos com o receptor na ausência de ligante, dado que em baixa concentração o tetrâmero predominou na solução, enquanto que nas média e alta concentrações formaram-se agregados. Devido a estes motivos, foram construídos modelos de átomos *dummy* e cristalográficos a partir dos dados experimentais do receptor com T3, mesmo sabendo-se que existiu uma mistura de formas oligoméricas nos dados analisados.

Os modelos de dímero propostos apontam para uma disposição simétrica e proximidade entre os domínios DBDs dos monômeros, e sugerem uma interação entre

os mesmos. A proximidade poderia explicar a maior estabilidade verificada nos estudos em solução do dímero do receptor TR, quando este continha o domínio DBD . Os DBDs se dispõem em um arranjo *head-to-head*, o qual é esperado para que se ligue ao elemento responsivo do tipo TREpal (o receptor se liga à este elemento na presença do ligante T3).

Os modelos de tetrâmero são muito similares aos verificados para o receptor RXR DBD-LBD, sendo, entretanto, um pouco mais alongados. A sua formação na presença de ligante foi propiciada pela alta concentração protéica, conforme previsto pelos estudos em solução. Os LBDs se dispõem no centro da estrutura, assim como os LBDs do tetrâmero de RXR, enquanto que os DBDs estão mais próximos entre si do que os DBDs do modelo do RXR, o que indica interação entre estes domínios e, talvez, explica a maior estabilidade do tetrâmero de TR DBD-LBD em relação à construção contendo somente o LBD.

3.3.6. ENSAIOS DE CRISTALIZAÇÃO

3.3.6.1. Ensaios sem DNA

Diversas condições foram empregadas na tentativa de cristalizar o receptor TR DBD-LBD, com e sem o hormônio T3, na ausência do DNA. Ensaios iniciais foram realizados também com complexo TR (T3) + RXR. Todos os ensaios foram feitos com proteína recém preparada, ou seja, não submetida a congelamento e descongelamento. A **Tabela 6** apresenta um resumo do que foi testado. As condições presentes nos *kits* mencionados podem ser encontradas nas páginas <http://www.hamptonresearch.com>, <http://www.jenabioscience.com> e <http://www.moleculardimensions.com>

Tabela 6. Ensaios para cristalização do receptor TR DBD-LBD							
Preparação ¹	Presença de T3 ²	Etapa de purificação ³	Solução da proteína ⁴	Concentração (mg/ml) / taxa vol (µl) proteína : vol (µl) solução poço ⁴	Técnica ⁵	Temp. (°C) ⁶	Condições Testadas ⁷
1A	+T3	Após coluna de fenil	20mM Hepes-Na pH8.0 0.5 mM EDTA 300 mM NH ₄ SO ₄ , 9% Glicerol 4.5% Acetonitrila 1mMDTT	13 / 2 : 2	<i>hanging drop</i>	18	- <i>Kit</i> Structure Screen MD1-06 Part II (Molecular Dimensions); 50 condições. - <i>Kit</i> JBScreen 3 A1-B6; 12 condições.
1B	+T3	Após coluna de fenil	20mM Hepes-Na pH8.0 0.5mMEDTA 50mM NaCl, 5% Glicerol 1mMDTT	1.7 / 5 : 5	<i>hanging drop</i>	18	- <i>Kit</i> Structure Screen MD1-06 Part II (Molecular Dimensions); 50 condições. - <i>Kit</i> JBScreen 3 A1-B6; 12 condições.
2A	+T3	Após coluna de fenil	20mM Hepes-Na pH8.0 0.5mMEDTA 300mM NH ₄ SO ₄ , 9% Glicerol 4.5% Acetonitrila 1mMDTT	14 / 2 : 2	<i>hanging drop</i>	18	- <i>Kit</i> Cristal Screen I (Hampton Research); 50 condições. - <i>Kit</i> JBScreen 3 C1-D6; 12 condições. - <i>Kit</i> JBScreen 4 A1-D6; 24 condições. - <i>Kit</i> JBScreen 5 A1-D6; 24 condições. - <i>Kit</i> JBScreen 7 A1-D6; 24 condições. - <i>Kit</i> Grid Screen NH ₄ SO ₄ (Hampton Research); 24 condições. - <i>Kit</i> Grid Screen MPD (Hampton Research); 24 condições.

Preparação ¹	Presença de T3 ²	Etapa de purificação ³	Solução da proteína ⁴	Concentração (mg/ml) / taxa vol (µl) proteína : vol (µl) solução poço ⁴	Técnica ⁵	Temp. (°C) ⁶	Condições Testadas ⁷
2B	+T3	Após coluna de fenil	20mM Hepes-Na pH 8.0 0.5mMEDTA 300mM NH4SO4, 9% Glicerol 4.5% Acetonitrila 1mMDTT	7 / 2 : 2	<i>hanging drop</i>	18	-Kit Cristal Screen I (Hampton Research); 50 condições. - Kit JBScreen 3 C1-D6; 12 condições. - Kit JBScreen 4 A1-D6; 24 condições. - Kit JBScreen 5 A1-D6; 24 condições. - Kit JBScreen 7 A1-D6; 24 condições. - Kit Grid Screen NH4SO4 (Hampton Research); 24 condições. - Kit Grid Screen MPD (Hampton Research); 24 condições.
3	+T3	Após coluna de fenil	20mM Hepes-Na pH 8.0 100mM NaCl 10% Glicerol 2mMDTT	5.4 / 5 : 2.5	<i>hanging drop</i>	18	- Kit Cristal Screen I (Hampton Research); 50 condições. - Kit Cristal Screen II (Hampton Research); 48 condições. - Kit Grid Screen PEG 6000 (Hampton Research); 24 condições
4	+T3	Após coluna de gel filtração Superdex 200 HR 10/30	20mM Hepes-Na pH 8.0 0.5mMEDTA 200mM NaCl 1mMDTT	5.3 / 5 : 2.5	<i>sitting drop</i>	18	- Kit MembFac (Hampton Research) + 1 µl Triton X-100; 48 condições. - Kit Grid Screen NaCl (Hampton Research); 24 condições

Preparação ¹	Presença de T3 ²	Etapa de purificação ³	Solução da proteína ⁴	Concentração (mg/ml) / taxa vol (µl) proteína : vol (µl) solução poço ⁴	Técnica ⁵	Temp. (°C) ⁶	Condições Testadas ⁷
5A	+T3	Após coluna de fenil	20mM Hepes-Na pH 8.0 0.5mM EDTA 300mM NH ₄ SO ₄ , 9% Glicerol 4.5% Acetonitrila 1mM DTT	10.6 / 2 : 2	<i>hanging drop</i>	18	- <i>Kit</i> Grid Screen NaCl (Hampton Research); 24 condições. - <i>Kit</i> CS Lite (Hampton Research); 24 condições.
5B	+T3	Após coluna de gel filtração Superdex 200 HR 10/30	20mM Hepes-Na pH 8.0 0.5mM EDTA 200mM NaCl 1mM DTT	4.8 / 2 : 2	<i>hanging drop</i>	18	- <i>Kit</i> Grid Screen NaCl (Hampton Research); 24 condições. - <i>Kit</i> CS Lite (Hampton Research); 24 condições.
6	+T3	Após coluna de fenil	20mM Hepes-Na pH 8.0 0.5mM EDTA 300mM NH ₄ SO ₄ , 9% Glicerol 4.5% Acetonitrila 14mM DTT	5.9 / 3 : 3	<i>hanging drop</i>	4	- <i>Kit</i> Grid Screen MPD (Hampton Research); 24 condições. - <i>Kit</i> Grid Screen NH ₄ SO ₄ (Hampton Research); 24 condições. - <i>Kit</i> Quick Screen NH ₄ SO ₄ (Hampton Research); 24 condições.

Preparação ¹	Presença de T3 ²	Etapa de purificação ³	Solução da proteína ⁴	Concentração (mg/ml) / taxa vol (µl) proteína : vol (µl) solução poço ⁴	Técnica ⁵	Temp. (°C) ⁶	Condições Testadas ⁷
7A	+T3	Após coluna de fenil	20mM Hepes-Na pH 8.0 0.5mM EDTA 300mM NH ₄ SO ₄ , 9% Glicerol 4.5% Acetonitrila 1mM DTT	8.4 / 5 : 5	<i>hanging drop</i>	4	- Variações da condição D2 do <i>Kit</i> Quick Screen (1.8M Fosfato de Sódio pH 5.6).
7B	+T3	Após coluna de fenil	0.6 M NaCl	6.8 / 5 : 5	<i>hanging drop</i>	4 e 18	- Soluções preparadas no laboratório: 0.8-1.4M Acetato Sódio pH 7.2 – 8.0, 0.1 M Cacodilato de Sódio (variações da condição publicada para cristalização TRβ1LBD com agonista ²³⁰).
7C	+T3	Após coluna de fenil	0.6 M NaCl	6.8 / 5 : 5	<i>hanging drop</i>	4	- Screen Aditive I (Hampton Research); 24 condições. 1 µl solução testada com 0.1M Tris HCl pH 8.5, 20% etanol.
8	+T3	Após coluna de fenil	10 mM Tris-HCl pH 7.4 400 mM NaCl, 1 mM DTT	12 / 2 : 2	<i>hanging drop</i>	18	- Soluções preparadas no laboratório: 24 variações da condição publicada para cristalização TRα1 LBD com agonista ²³⁰ , sendo ela 0.1M Cacodilato de Sódio pH 6.7, 0.2M Acetato de Amônio, 15%MPD.

²³⁰ Wagner, R.L., Huber, B.R., Shiau, A.K., Kelly, A., Lima, S.T.C., Scanlan, T.S., Apriletti, J.W., Baxter, J.D., West, B.L., and Fletterick, R.J. (2001) *Mol. Endocrinol.* 15:398-410

Preparação ¹	Presença de T3 ²	Etapa de purificação ³	Solução da proteína ⁴	Concentração (mg/ml) / taxa vol (µl) proteína : vol (µl) solução poço ⁴	Técnica ⁵	Temp. (°C) ⁶	Condições Testadas ⁷
9A	+T3	Após coluna de fenil	20mM Hepes-Na pH 8.0 0.5mM EDTA 300mM NH ₄ SO ₄ , 9% Glicerol 4.5% Acetonitrila 1mM DTT	11 / 3 : 3	<i>hanging drop</i>	18	- Soluções preparadas no laboratório: 24 variações da condição publicada para cristalização do complexo TRβ1 DBD + RXRα DBD em DR4 ¹⁹¹ , sendo ela 25mM Imidazol pH 7.0, 40% PEG 3350, 400mM NH ₄ Cl, 10mM DTT, 5mM MgCl ₂ (variou-se concentração de PEG). - Soluções preparadas no laboratório: 24 variações da condição A6 do Grid Screen NH ₄ SO ₄ , sendo ela 0.1M Bicine pH 9.0, 0.6M NH ₄ SO ₄ .
9B	+T3	Após coluna de gel filtração Superdex 200 HR 10/30	20mM Hepes-Na pH 8.0 0.5mM EDTA 200mM NaCl, 1mM DTT	4 / 3 : 3	<i>hanging drop</i>	18	- Soluções preparadas no laboratório: 24 variações da condição publicada para cristalização do complexo TRβ1 DBD + RXRα DBD em DR4 ¹⁹¹ , sendo ela 25mM Imidazol pH 7.0, 40% PEG 3350, 400mM NH ₄ Cl, 10mM DTT, 5mM MgCl ₂ (variou-se concentração de PEG). - Soluções preparadas no laboratório: 24 variações da condição A6 do Grid Screen NH ₄ SO ₄ , sendo ela 0.1M Bicine pH 9.0, 0.6M NH ₄ SO ₄ .

Preparação ¹	Presença de T3 ²	Etapa de purificação ³	Solução da proteína ⁴	Concentração (mg/ml) / taxa vol (µl) proteína : vol (µl) solução poço ⁵	Técnica ⁶	Temp. (°C) ⁷	Condições Testadas ⁸
10	- T3	Após coluna de afinidade.	50mM Na ₃ PO ₄ pH 8.0 300mM NaCl 10% Glicerol 0.05% Tween 20 500mM Imidazol 10mM β-mercaptoetanol	9.3 / 4 : 4	<i>hanging drop</i>	18	- Soluções preparadas no laboratório: 24 variações da condição publicada para cristalização TRα1 LBD com agonista ¹⁹⁰ sendo ela 0.1M Cacodilato de Sódio pH 6.7, 0.2M Acetato de Amônio, 15% MPD. - Soluções preparadas no laboratório: 0.8-1.4M Acetato Sódio pH 7.2 – 8.0, 0.1M Cacodilato de Sódio (variações da condição publicada para cristalização TRβ1 LBD com agonista ²³⁰).
11	+ T3 e + RXR	Após coluna de gel filtração Superdex 200 HR 10/30	5mM Fosfato de potássio pH 7.6 1mM DTT	1 / 4 : 4	<i>hanging drop</i>	18	- 50-500 mM Fosfato de Potássio pH 7.0-8.6, 2.2 % PEG 3350; concentração de PEG determinada por teste de precipitação.
12	- T3	Após coluna de afinidade (passada 2 vezes em coluna de afinidade)	10mM Tris HCl pH 8.0 50mM NaCl 0.1% Tween 20 1mM DTT	3 / 4 : 4	<i>hanging drop</i>	18	- <i>Kit</i> Cristal Screen I (Hampton Research); 50 condições.

13	+T3	Após coluna de gel filtração Superdex 75 HR 10/30.	20mM Hepes-Na pH 8.0 300mM NaCl, 3mM DTT	13 / 4 :4	<i>Hanging Drop</i>	4	- <i>Kit</i> NR-LBD de cristalização de receptores nucleares (Molecular Dimensions); 24 condições. - Soluções preparadas no laboratório: 0.8-1.4M Acetato Sódio pH 7.2 – 8.0, 0.1M Cacodilato de Sódio (variações da condição publicada para cristalização TRβ1 LBD com agonista ²³⁰).
----	-----	--	--	-----------	---------------------	---	---

Tabela 6. Detalhes sobre os diversos ensaios realizados para tentativa de cristalização do receptor TR DBD-LBD.

¹ Lote de purificação; quando o lote foi dividido para diferentes ensaios denominou-se letras.

² Proteína foi preparada com e sem T3 segundo descrito na Metodologia.

³ Última coluna empregada para purificação.

⁴ Solução na qual estava a proteína empregada no ensaio; nas preparações 1B, 3, 7B, 7C, 8, 11 e 12 o tampão de eluição da proteína foi trocado para o indicado através de diálise ou passagem em coluna do tipo *Desalting* (G-25, Amersham-Bioscience).

⁵ Concentração de proteína empregada; volume de proteína e de solução do poço empregada para formação da gota. Optou-se, em geral, por gotas maiores.

⁶ Variações da técnica de difusão de vapor.

⁷ Temperatura em que o experimento foi mantido.

⁸ Condições empregadas. Algumas condições são derivadas de condições que apresentaram sinal de cristalização sendo elas: 24 condições geradas a partir de 0.1M Tris HCl pH 8.5, 20% etanol acrescido de 1μl de Screen Aditive I (Hampton Research); 24 variações da condição D2 do *Kit* Quick Screen (1.8M Fosfato de Sódio pH 5.6); 24 variações da condição A6 do Grid Screen NH₄SO₄, sendo ela 0.1M Bicine pH 9.0, 0.6M NH₄SO₄; variações de condições publicadas para cristalização de TRβ1LBD, TRαLBD, TR+RXR/DR4.

Diversos resultados foram observados, dada a grande diversidade de condições analisadas. Testou-se desde ensaios de matriz esparsa até ensaios direcionados, entretanto não foi possível obter cristal adequado para difração de raios X. Abaixo estão enumerados algumas verificações gerais com relação ao testes realizados:

1. A proteína tende a se precipitar, no ato da montagem da gota, em pHs abaixo de 6, independentemente da concentração protéica empregada e da solução da proteína.
2. A proteína tende a se precipitar em ensaios à 4°C.
3. A solubilidade dependeu do lote de purificação: algumas preparações precipitaram em quase todas as condições logo no ato de montagem da gota.
4. Muitas condições que não precipitaram de imediato precipitaram com o passar do tempo.
5. A colocação da proteína em solução com NaCl 0.6M aumentou em muito a solubilidade da proteína nos ensaios, na montagem da gota.
6. Os ensaios realizados com o heterodímero TR(T3) + *apo*-RXR parecem indicar que este complexo é mais solúvel, pois quase não houve precipitação das condições testadas.

3.3.6.2. Ensaios com DNA

3.3.6.2.1. Complexo TR/TR + F2

Na tentativa de se cristalizar o complexo TR/TR + F2, produziu-se o receptor na forma *holo*, passando-se pelas colunas de afinidade, interação hidrofóbica e gel filtração. A proteína saída da coluna de gel filtração foi concentrada para 12mg/ml, e acrescida de

5mM de $MgCl_2$, além do elemento responsivo F2 na forma de dupla fita. A proporção molar empregada foi de 1:1. O complexo foi incubado 1 hora à 4°C.

A concentração final para o ensaio de cristalização foi de 6mg/ml, tendo sido aplicada a técnica de *hanging drop*, à 4°C, com gotas de 4µl de proteína e 4µl de solução de poço. Utilizou-se o *kit* de Cristalização de Receptores Nucleares NR-LBD (Molecular Dimensions). Testou-se também a combinação de condições: 100mM Cacodilato de Sódio pH 7.2, 7.5, 7.8 e 8.0 e, para cada pH, as concentrações de 0.8, 0.9, 1.0, 1.2, 1.3, 1.4M de Acetato de Sódio.

As condições baseadas em Cacodilato de Sódio e Acetato de Sódio precipitaram praticamente em todas condições. Os ensaios feitos com o *kit* geraram algumas gotas claras, mas as até então nenhum cristal foi observado nas gotas. Acredita-se que a escolha de se trabalhar com o TR ligado à T3 não foi adequada, dado que a afinidade deste receptor pelo elemento F2 diminui com a presença de T3. O elemento responsivo usado no ensaio é mostrado na **Figura 42**. Este elemento possui extremidades mais curtas em relação aos normalmente empregados nos estudos de *gel shift*.

Figura 42. Sequência de oligonucleotídeos correspondente aos TREs usados nos ensaios de cristalização.

3.3.6.2.2. Complexo TR/RXR + DR4

Empregou-se neste ensaio o complexo purificado pela coluna Superdex 75 HR 10/30, procedimento que, aparentemente, proporcionou a eliminação do DNA livre em excesso. A concentração final para o ensaio de cristalização foi de 2.5mg/ml, tendo sido

aplicada a técnica de *hanging drop*, à 4°C, com gotas de 1µl de proteína e 1µl de solução de poço. Utilizou-se o *kit* de Cristalização de Receptores Nucleares NR-LBD (Molecular Dimensions). Os ensaios feitos com o *kit* geraram algumas gotas claras, enquanto que muitas outras precipitaram no ato ou no dia seguinte da montagem, mas as até então nenhum cristal foi observado nas gotas. O DNA empregado é mostrado na **Figura 42**.

3.4. DISCUSSÃO

3.4.1. hTR β 1 FORMA DÍMERO E TETRÂMERO EM SOLUÇÃO

Os resultados obtidos com os estudos em solução do receptor nuclear humano dos hormônios tireoidianos (TR) isoforma beta 1, contendo somente o domínio LBD ou os domínios DBD-LBD, revelaram que este receptor é capaz de se homodimerizar e homotetramerizar em solução. Estes estudos também levantam alguns pontos interessantes sobre a influência do ligante, dos domínios e da concentração protéica no processo de oligomerização. Todas as construções e mutações foram avaliadas quanto à sua funcionalidade, ou seja, capacidade de ligação ao hormônio T3 e de ligação ao DNA.

Os estudos de gel nativo e *crosslinking* do TR DBD-LBD sem ligante (**Figuras 28 e 30A**) mostraram a presença do tetrâmero, além de evidenciar dímero e monômero. Também foi constatado que a presença do ligante desfavoreceu a formação do tetrâmero (**Figuras 28 e 30B**).

As análises por *crosslinking* indicaram uma fraca banda de tetrâmero de LBD quando na ausência de T3 (**Figura 30C**), enquanto que na eletroforese em condições nativas eles somente foram detectados em altas concentrações protéicas (acima de 116 μ M, dados não mostrados).

Para se avaliar qualitativamente o equilíbrio entre as formas oligoméricas, em função da concentração de proteína e da presença do ligante, fez-se estudos de gel filtração analítica e DLS.

Os resultados obtidos com os ensaios de gel filtração analítica mostraram que o receptor TR DBD-LBD existe em solução em um equilíbrio entre dímero e tetrâmero, o qual é ditado pela concentração protéica e pelo hormônio T3. Tanto a presença do ligante, quanto a diminuição da concentração, favorecem a dissociação da proteína para dímero e, no caso da combinação da presença do ligante com baixas concentrações protéicas, para monômero (**Figura 31A e 31B**). Curiosamente, o tetrâmero não foi a principal forma eluída quando se analisou *apo*-TR LBD nestes ensaios, nem nas mais altas concentrações de proteína empregadas (**Figura 32A**). TR LBD na presença de T3 eluiu basicamente como monômero (**Figura 32B**). Face estes resultados, pode-se propor uma função do DBD em estabilizar o dímero e, conseqüentemente, o tetrâmero.

Os resultados apresentados com os ensaios de espalhamento de luz dinâmico vêm acrescentar mais detalhes sobre o processo de oligomerização do receptor TR. Verificou-se mais uma vez que o *apo*-TR DBD-LBD se associa como tetrâmero, predominando já em baixas concentrações protéicas (**Tabela 3**), mas sendo desfavorecido pela presença do ligante T3.

Tetrâmero do TR LBD somente foi evidenciado pela técnica de DLS (**Figura 34**). Lembrando-se que o DLS é uma técnica não invasiva, de perturbação mínima ao sistema em análise, especulou-se que o *apo*-TR LBD se organiza como tetrâmero. Este tetrâmero formado por somente o domínio LBD, entretanto, deve se associar mais fracamente em relação ao tetrâmero de TR DBD-LBD, e, em função disto, se dissociou durante os ensaios de gel filtração e eletroforese em condições nativas. De fato, o ensaio de *crosslinking* indicou a fraca presença de tetrâmero a 16.5 μ M (**Figura 30C**).

A análise destes resultados sugeriu que a formação de tetrâmero pelo receptor TR pode envolver mecanismos similares aos da formação de tetrâmero pelo RXR, uma vez que a dissociação dos tetrâmeros de ambas proteínas é promovida pela presença de seus respectivos ligantes. Outro fator interessante foi a similaridade seqüencial apresentada entre os dois receptores em duas das superfícies de tetramerização do RXR, a composta pela interação H11/H1 e a H12/H3-H4 (**Figura 23**).

Para averiguar a hipótese de que o domínio LBD, e, especificamente, a hélice 12 do LBD de TR, poderia estar envolvido com o processo de tetramerização deste receptor, e se a interface de dimerização da proteína em solução corresponderia à interface verificada no homodímero ligado ao DNA, estudou-se o comportamento em solução de dois mutantes.

A mutação L422R, a qual é capaz de abolir a dimerização do TR sobre F2 e DR4, causou a dissociação do tetrâmero do LBD de TR para uma forma dimérica (**Figura 36**). A mutação provavelmente não interferiu com a dimerização da proteína contendo também o DBD (dados não mostrados). A mutação F451X também rompeu o tetrâmero de LBD e promoveu a formação de dímero (**Figura 38**). Curiosamente, a combinação da mutação L422R com a ligação ao T3 (fato que promove o empacotamento da hélice H12 contra o corpo da proteína) favoreceu a presença de monômero.

O conjunto dos resultados aponta fortemente para a existência de superfícies de dimerização e tetramerização no domínio LBD de TR similares às presentes em RXR, e que o receptor TR forma tetrâmero em solução de maneira similar ao RXR. A **Figura 43** apresenta um esquema da associação tetramérica do receptor TR proposto a partir dos

resultados apresentados. Este modelo propõe como as mutações influenciaram a formação deste oligômero.

Figura 43. Modelo proposto para a tetramerização do LBD de TR.

Segundo o modelo, tanto a mutação F451X, quanto a L422R, propiciaram a formação de dímeros, mas de dímeros diferentes. A combinação da mutação L422R com a presença do T3 propiciou a presença de monômero porque a ligação ao ligante teria o mesmo efeito da deleção da hélice H12 (mutação F451X). Este efeito seria o de não disponibilizar esta hélice para interações importantes para superfície de tetramerização. A combinação dos efeitos causados pela mutação que rompe a superfície de dimerização, com a ligação do ligante (que rompe a interface de tetramerização) promoveu a liberação do monômero em solução.

Em adição aos efeitos sobre a formação de tetrâmero, vale ressaltar que T3 inibe a formação de dímero do TR DBD-LBD em baixas concentrações do receptor. Em particular, *apo*-TR existe basicamente como dímero, com raio hidrodinâmico de 4.4nm,

nos ensaios de gel filtração a uma concentração relativamente baixa (2.2 μ M), enquanto que *holo*-TR existe como monômero (3.2nm) nas mesmas condições (**Figura 31**). Resultados similares são verificados com os estudos de DLS (**Tabela 3**). Sabe-se que T3 promove a dissociação do homodímero TR-TR do DNA responsivo, mas as bases moleculares são ainda incertas. Seria interessante especular se este efeito estaria relacionado com alterações dependentes do hormônio (independentes do DNA) no equilíbrio monômero-dímero, conforme foi verificado com os resultados aqui apresentados. Esta observação levanta a possibilidade de que o ligante influencia a atividade de associação ao DNA através de efeitos diretos na conformação da superfície dimerica, e não através de alterações nos contatos com o DNA.

Os resultados obtidos com os estudos em solução da proteína TR DBD-LBD estão sumarizados no manuscrito do **Anexo 3**.

Por fim, experimentos de SAXS concordaram com os resultados prévios de que este receptor é capaz de se dimerizar e tetramerizar em solução, como funções do ligante T3 e da concentração de proteína. Foram apresentados modelos de *dummy* para as formas dimerica e tetramérica do receptor TR DBD-LBD, além de proposições de organização quaternária destas formas oligoméricas. Esta proposições foram baseadas em estruturas cristalográficas já existentes dos domínios isolados e nos dados experimentais coletados.

O modelo de *dummy* de tetrâmero obtido mostrou-se bastante similar, um pouco mais alongado porém, ao modelo de tetrâmero de RXR DBD-LBD (**Capítulo 2**). Ambos modelos se organizam como um X, com os LBDs no centro e os DBDs nas extremidades. O modelo cristalográfico construído obedeceu à mesma idéia de

disposição dos domínios e as interfaces preditas pelos estudos de comportamento oligomérico em solução. É interessante notar, entretanto, que os DBDs da estrutura tetramérica do TR encontram-se em suposta proximidade dentro de cada dímero, o que, se for correto, poderia explicar a maior estabilidade do tetrâmero de TR contendo o domínio DBD.

3.4.2. SIGNIFICADO FUNCIONAL DA TETRAMERIZAÇÃO

Uma questão importante que surge com a constatação de que o receptor hTR β 1 forma tetrâmero em solução é se este tetrâmero possui função fisiológica no organismo.

Primeiramente deve-se pensar se estes tetrâmeros se formam em concentrações que pudessem ser consideradas fisiológicas. Em relação a este ponto, sabe-se que o número de receptores tireoidianos por núcleo é cerca de 2.000-10.000. As mais altas concentrações são encontradas em tecidos que respondem aos hormônios tireoidiano, tais como pituitária, tecido gorduroso marrom, fígado, coração, placenta e rins^{231, 232, 233, 234, 235}. Se assumirmos que o raio médio de um núcleo é cerca de $1\mu\text{m}^{221}$, a concentração estimada de receptor dentro do núcleo fica entre 0.8 μM e 4 μM . Entretanto, muito do núcleo não é fluido, de maneira que o verdadeiro volume líquido pode ser ainda menor. Isto significa que as concentrações de receptor usadas nos estudos ($\geq 1.5\mu\text{M}$) estão dentro de uma variação fisiologicamente relevante ou muito próximo ao seu limite superior, de maneira que o receptor TR sem hormônio apresenta um grande potencial

²³¹ Oppenheimer, J.H., Schwartz, H.L., and Surks, M.I. (1975) *Endocr. Res. Commun.* 2:309-25.

²³² Oppenheimer, J.H., Schwartz, H.L., and Surks, M.I. (1974) *Endocrinology* 95:897-903.

²³³ Oppenheimer, J.H., Schwartz, H.L., Koerner, D., and Surks, M.I. (1974) *J. Clin. Invest.* 53:768-77.

²³⁴ Samuels, H.H., and Tsai, J.S. (1974) *J. Clin. Invest.* 53:656-9.

²³⁵ Surks, M.I., Koerner, D.H., and Oppenheimer, J.H. (1975) *J. Clin. Invest.* 55:50-60.

para existir como uma mistura de monômero, dímero e tetramero em condições fisiológicas.

Mas, enquanto que o receptor RXR sem ligante interage fracamente com correpressores, vários estudos têm indicado que o *apo*-TR existe primariamente complexado com correpressores. Portanto, não é claro que fração do *apo*-TR estaria disponível para formação de homotetramero em condições típicas, e se este processo desempenharia algum papel importante na regulação da ação do receptor TR.

Entretanto, é sabido que fatores de transcrição nucleares são freqüentemente encontrados seqüestrados em pequenos subdomínios dentro do núcleo, ou estão concentrados nos promotores alvo através de sítios de ligação multimerizados, o que eleva os limites locais de concentração dos receptores dentro do núcleo para valores ainda maiores. Estas considerações levantam a possibilidade que a formação do tetramero poderia regular a atividade do TR em contextos particulares.

A tetramerização é um evento freqüentemente encontrado no processo de regulação do reconhecimento proteína-DNA e regulação da transcrição^{236, 237, 238}. A proteína humana de supressão de tumor p53 é capaz de formar tetramero, tanto livre em solução^{239, 240}, quanto ligada ao DNA²⁴¹. A proteína de ligação ao DNA seqüência-específica TraM, essencial para transferência de DNA conjugativa, forma tetrameros estáveis em solução²⁴², sendo também tetramérica quando ligada ao sítio mínimo de

²³⁶ Ayer, D.E., Kretzner, L., and Eisemann, R.N. (1993) *Cell* 72:211-22.

²³⁷ Patel, L.R., Curran, T., and Kerppola, T.K. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91:7360-64.

²³⁸ Lahoz, E.G., Xu, A., Agus, N., and Depinho, R.A. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:5503-07.

²³⁹ Brokx, R.D., Bolewska-Pedyczak, E., and Gariépy, J. (2003) *J. Biol. Chem.* 278:2327-32.

²⁴⁰ Mateu, M.G., Del Pino, M.M.S., and Fersht, A.R. (1999) *Nature Struct. Biol.* 6:191-8.

²⁴¹ Rippin, T. M., Freund, S. M. V., Veprintsev, D. B. and Fersht, A. R. (2002) *J. Mol. Biol.* 319:351-8.

²⁴² Verdino, P., Keller, W., Strohmaier, H., Bischof, K., Lindner, H., and Koraimann, G. (1999) *J. Biol. Chem.* 274:37421-8.

ligação ao DNA²⁴². O regulador QacR de *S. aureus* reprime a transcrição do gene *quaA multidrug pump* através da ligação ao sítio de DNA IR1 como um dímero de dímeros²⁴³,²⁴⁴. Além disto, o repressor 434 de bacteriófago se liga à DNA como um tetrâmero de uma maneira cooperativa, mas falha em formar tetrâmero em solução²⁴⁵. Finalmente, a proteína de ligação à fita simples de DNA (SSB) de *E. coli* é uma proteína homotetramérica de ligação ao DNA, desempenhando funções essenciais na replicação, recombinação e reparo do DNA²⁴⁶.

Em vista das evidências apresentadas que mostram a formação de tetrâmeros pelos receptores TR e RXR, é interessante perguntar se o processo de auto-associação em tetrâmeros representa um nível geral de regulação da sinalização celular comandada pelos receptores nucleares. A auto-associação dos receptores nucleares dentro das células em formas tetraméricas inativas poderiam permitir um acúmulo e armazenamento destas proteínas. Estas proteínas armazenadas poderiam ser facilmente ativadas pela presença de seu ligante ou pelo sítio de ligação ao DNA específico, ou ainda pela diminuição na concentração local do receptor.

3.4.3. AS DIFICULDADES NA CRISTALIZAÇÃO DO RECEPTOR NUCLEAR TR β 1

Alguns motivos podem ser cogitados para explicar-se a dificuldade em se cristalizar o receptor TR. Em primeiro lugar até hoje não foi publicada nenhuma

²⁴³ Schuemacher, M. A., Miller, M. C., Grkovic, S., Brown, M. H., Skurray, R. A., and Brennar, R.G. (2002) *EMBO J.* 21:1210-8.

²⁴⁴ Schumacher, M.A., and Brennan, R.G. (2003) *Res. Microb.* 154:69-77

²⁴⁵ Ciubotaru, M., and Koudelka, G.B. (2003) *Biochemistry* 42:4253-64.

²⁴⁶ Kozlov, A.G., and Lohman, T.M. (2002) *Biochemistry* 41:11611-27.

estrutura de um receptor nuclear contendo os domínios DBD e LBD. A verificação dos modelos propostos para explicar o envelope obtido por SAXS do TR contendo os domínios LBD e DBD, revela uma estrutura não globular com domínios ligados por uma hélice, que cogita-se ser bastante flexível. Estruturas desta forma são notadamente difíceis de se ordenar para formação de cristais. Além disto a proteína muda seu estado oligomérico em função da concentração protéica, outro fator complicador para cristalização. Mesmo a suposta estabilização destes domínios via a formação de complexos com DNA não permitiu a obtenção de cristais nas condições testadas.

Apesar de ter-se tentado exaustivamente a cristalização do receptor TR como homodímero, ligado ou não ao T3, poucos ensaios foram feitos com o heterodímero TR/RXR e com o homo ou heterodímero ligado ao DNA. Ainda há muito que explorar neste sentido.

3.5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O conjunto destes dados mostrou que o receptor hTR β 1 é capaz de se homodimerizar em solução, na ausência de DNA, contrariamente ao que tem sido divulgado por outros trabalhos. Além disto, há fortes indícios de que os dímeros utilizam a mesma interface importante para dimerização na presença do DNA. Outro ponto importante é a sua capacidade de formar homotetrâmero, o qual responde à presença do T3, dissociando-se, e muito provavelmente envolve a hélice H12 do *apo*-LBD.

Apesar de ter-se indicado a importância da hélice H12 do LBD para a superfície de tetramerização do receptor TR, poderia-se aprofundar os estudos sobre a completa superfície de tetramerização. Se a hélice H12 forma uma interface de tetramerização através de contatos com as hélices H3/H4/H5 (especificamente através do sítio de interação com CoAs) é uma questão a ser respondida através de mutações e ensaios de oligomerização em solução. A validade do modelo de tetramerização do domínio LBD apresentado na **Figura 43** poderia ser averiguada pela determinação dos envelopes em solução, por SAXS, dos dímeros formados com as mutações L422R e F451X.

Seria interessante averiguar se a hélice 11 também está envolvida na tetramerização e porque o DBD promove a estabilização deste tetrâmero, assim como do dímero. Estudos envolvendo mutações nestas regiões e análises do comportamento em solução poderiam ajudar a responder estas perguntas.

Também seria bastante interessante obter-se modelo de SAXS para o receptor contendo somente o domínio LBD assim como do receptor contendo os domínios DBD-

LBD na forma *apo*, no intuito de averiguar diferenças com o modelo construído com os dados de espalhamento de raios X do receptor com T3.

Uma lacuna muito importante em aberto é a caracterização quantitativa dos fenômenos descritos neste trabalho. Experimentos como a ultracentrifugação e a anisotropia de fluorescência poderiam ser usados para determinar as constantes de dissociação (K_d) tetrâmero-dímero e dímero-monômero, em função de parâmetros como concentração protéica, presença de hormônio ou em resposta a deleções e/ou mutações pontuais da proteína.

Seria também importante identificar mutantes do TR que inibam a tetramerização do receptor completo e, através de ensaios *in vivo*, verificar se são afetadas também algumas das propriedades já conhecidas do TR em células vivas, incluindo a localização intracelular, a associação com coreguladores e a regulação da expressão gênica.

Por fim é claro que se deve continuar as tentativas de cristalização do receptor TR completo ou contendo os domínios DBD e LBD, e, em especial, ligado ao DNA. Poderia se pensar em mutações com o poder de fixar formas oligoméricas ou artefatos que proovessem menor flexibilidade à estrutura. Com relação à cristalização com DNA seria interessante tentar diversas possibilidades de extremidades da dupla fita. Com a observação do empacotamento cristalino de muitos complexos proteína-DNA, é notório que o DNA é importante para a formação da rede cristalina, dado que são formados contatos cristalinos entre as extremidades das cadeias.

A obtenção desta estrutura cristalográfica inauguraria um capítulo importantíssimo no estudo deste e de todos os receptores nucleares, trazendo informações valiosas sobre detalhes moleculares do seu modo de ação no processo de regulação transcricional,

assim como forneceria um quadro mais completo para a busca de agonistas e antagonistas de ação farmacológica.

CAPÍTULO 4-CRISTALIZAÇÃO E RESOLUÇÃO DA ESTRUTURA DO DOMÍNIO LBD DE hTR β 1 COMPLEXADO COM LIGANTES

4.1. INTRODUÇÃO

4.1.1. OS HORMÔNIOS TIREOIDIANOS NATURAIS

A síntese dos hormônios tireoidianos é regulada por um sistema de *feed-back* negativo que envolve o hipotálamo, a pituitária e a glândula tireóide. A glândula tireóide é uma das maiores glândulas endócrinas do organismo. Esta glândula secreta os hormônios 3,5,3',5'-tetraiodo-L-tironina (T4), ou tiroxina, e o 3,5,3'-triiodo-L-tironina (T3)²⁴⁷ (**Figura 44**).

²⁴⁷ Yen, PM (2001) *Physiol. Rev.* 81:1097-142.

3,5,3'-triiodo-L-tironina (T3) 3,5,3',5'-tetraiodo-L-tironina (T4)

Figura 44. Estrutura dos hormônios tireoidianos T3 e T4. Os iodios estão em roxo, carbonos em verde, e oxigênios em vermelho.

A maioria dos hormônios tireoidianos liberados pela glândula tireóide está na forma de T4, uma vez a que concentração de T4 presente no soro sanguíneo é 45 vezes maior que a quantidade de T3 (90 *versus* 2nM)²⁴⁷.

Quase todo hormônio liberado pela glândula tireóide circula no corpo associado a proteínas carreadoras. Essas proteínas são principalmente a globulina de ligação a tiroxina (TBG, *Thyroxine Binding Globulin*), a albumina e a pré-albumina de ligação a tiroxina, todas elas sintetizadas no fígado²⁴⁷.

A maior via de produção de T3 é através da 5'-deiodização de um dos anéis do T4. Este processo é feito por deiodinases e ocorre nos tecidos periféricos, sendo responsável pela maioria do T3 circulante^{248, 249}. O T3 é mais eficiente na ligação aos receptores tireoidianos, possuindo um K_d 5-10 vezes menor que o observado para o

²⁴⁸ Braverman, L.E., Ingbar, S.H., and Sterling, K. (1970) *J. Clin Invest.* 49:855-64.

²⁴⁹ Kohrle J. (2000) *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 1:49-58.

hormônio T4²⁵⁰. Como exemplo, o K_d determinado para a isoforma TR α de galinha varia entre 0.21-0.33nM para T3 e 1.4nM para T4²⁵¹. Para TR β , estes valores são 2.3nM para T3 e 50nM para T4^{133, 252, 253}.

A isoforma TR β 1 fusionada a GST (*Glutathione S-Transferase*), expressa e purificada a partir de cultura de *E. coli*, apresentou um K_d de 100pM²⁵⁴, enquanto que a mesma isoforma expressa *in vitro* apresentou K_d igual a 60 ± 7 pM²⁵⁵ e 81 ± 12 pM²⁵⁶. TR α de rato, expresso em *E. coli* e purificado até a homogeneidade, apresentou K_d igual a 60pM²⁵⁷.

O metabolismo do hormônio T3 ocorre por três vias: deiodinação, conjugação e alteração da cadeia lateral. Cerca de 50-60% do T3 em humanos é deiodinado para 3,3'-diiodotironina²⁵⁸. Entretanto, cerca de 14% do metabolismo de T3 envolve a alteração da cadeia lateral de alanina, resultando na produção de 3,3',5 - ácido triiodotiroacético (Triac) (Figura 45)²⁵⁹.

Sob condições patológicas, como, por exemplo, jejum, a produção de Triac é aumentada substancialmente. Além disto, Triac pode ser importante para supressão da secreção de TSH durante situação de jejum, o que acontece apesar dos baixos níveis

²⁵⁰ Shia, Y.-B., Ritchie, J.W.A., and Taylor, P.M. (2002) *Pharmacol. Therap.* 94:235– 51.

²⁵¹ Sap, J., Munoz, A., Damm, K., Goldberg, Y., Ghysdael, J., Leutz, A., Beug, H., and Vennstrom, B. (1986) *Nature*. 324:635-40.

²⁵² Weinberger, C., Thompson, C.C., Ong, E.S., Lebo, R., Gruol, D.J., and Evans, R.M. (1986) *Nature* 324:641-6.

²⁵³ Thompson, C.C., Weinberger, C., Lebo, R., and Evans, R.M. (1987) *Science* 237:1610-4.

²⁵⁴ Ball, E.H., Shephard, L.B., and Gill, G.N. (1995) *Protein Expr. Purif.* 6:33-8.

²⁵⁵ Feng, W., Ribeiro, R.C., Wagner, R.L., Nguyen, H., Apriletti, J.W., Fletterick, R.J., Baxter, J.D., Kushner, P.J., West, B.L. (1998) *Science* 280:1747-9.

²⁵⁶ Ribeiro, R.C., Feng, W., Wagner, R.L., Costa, C.H., Pereira, A.C., Apriletti, J.W., Fletterick, R.J., Baxter, J.D. (2001) *J. Biol. Chem.* 276:14987-95.

²⁵⁷ Apriletti, J.W., Baxter, J.D., Lau, K.H., and West, B.L. (1995) *Protein Expr. Purif.* 6:363-70.

²⁵⁸ Gavin, L.A., Hammond, M.E., Castle, J.N., Cavalieri, R.R. (1978) *J. Clin. Invest.* 61:1276-85.

²⁵⁹ Gavin, L.A., Livermore, B.M., Cavalieri, R.R., Hammond, M.E., and Castle, J.N. (1980) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 51:529-34.

plasmáticos de T3 e T4. Além disto, em outras condições diferentes de jejum, caracterizadas por baixos níveis de TSH, T3 e T4, Triac pode estar relacionado com a supressão da secreção de TSH²⁶⁰.

Figura 45. Estrutura do hormônio tireoidiano Triac. Os iodios estão em roxo, carbonos em verde, e oxigênios em vermelho.

3,3',5 – ácido triiodotiroacético (Triac)

Verificou-se também uma maior eficiência do Triac em relação a T3 e T4 na supressão da secreção de THS em cultura de células da pituitária²⁶¹. A administração de Triac em pessoas com eutiroidismo e hipotireoidismo (consequências da Resistência Generalizada a Hormônios Tireoidianos – GRTH, *Generalized Resistance to Thyroid Hormone*) suprime a secreção basal de TSH^{262, 263, 264}. Triac é também empregado no tratamento de pacientes com câncer de tireóide²⁶⁵. O objetivo do uso deste hormônio é o

²⁶⁰ Carlin, K., and Carlin, S. (1993) *Med. Hypotheses* 40:38-43.

²⁶¹ Everts, M.E., Visser, T.J., Moerings, E.P., Docter, R., van Toor, H., Tempelaars, A.M., de Jong, M., Krenning, E.P., and Hennemann, G. (1994) *Endocrinology* 135:2700-7.

²⁶² Menegay, C., Juge, C., and Burger, A.G. (1989) *Acta Endocrinol. (Copenh)* 121:651-58.

²⁶³ Bracco, D., Morin, O., Schutz, Y., Liang, H., Jequier, E., Burger, A.G. (1993) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 77:221-28.

²⁶⁴ Kunitake, J.M., Hartman, N., Henson, L.C., Lieberman, J., Williams, D.E., Wong, M., Hershman, J.M. (1989) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 69:461-66.

²⁶⁵ Mechelany, C., Schlumberger, M., Challeton, C., Comoy, E., Parmen-tier, C. (1991) *Clin. Endocrinol. (Oxf)* 35:123-28.

de diminuir a secreção de TSH sem os sintomas de tirotoxicose. Sua eficácia, entretanto, é controversa^{266, 267}.

As bases moleculares das possíveis vantagens terapêuticas do emprego de Triac no tratamento da resistência aos hormônios tireoidianos ainda não é completamente entendida. Triac tem-se revelado mais potente que o T3 na regulação transcricional dos receptores TR β 1 e TR β 2 sobre os elementos responsivos palindrômicos e palindrômicos invertidos, enquanto que a regulação por TR α 1 é equivalente para ambos ligantes. Além disto, Triac liga-se mais eficientemente que T3 às duas isoformas de TR β , não havendo esta diferença de afinidade em relação à TR α 1²⁶⁸.

Tem sido mostrada uma grande importância da ação da isoforma TR β 2 na regulação do eixo hipotálamo-pituitária, uma vez que esta isoforma promove repressão dependente de T3 dos genes para TRH e TSH α ^{269, 270}. Este fato associado à questão de que é na isoforma β onde se concentram todos os mutantes relacionados com a síndrome de resistência ao hormônio tireoidiano, mutações as quais diminuem a afinidade de ligação do receptor ao hormônio T3²⁷¹, podem dar respostas sobre o envolvimento do Triac no controle da RTH. Em concordância com isto, verificou-se que Triac possui

²⁶⁶ Ueda, S., Takamatsu, J., Fukata, S., Tanaka, K., Shimizu, N., Sakata, S., Yamaji, T., Kuma, K., Ohsawa, N. (1996) *Thyroid*. 6:563-70.

²⁶⁷ Radetti, G., Persani, L., Molinaro, G., Mannavola, D., Cortelazzi, D., Chatterjee, V.K., and Beck-Peccoz, P. (1997) *Thyroid* 7:775-8.

²⁶⁸ Messier, N., and Langlois, M.F. (2000) *Mol. Cell Endocrinol*. 165:57-66.

²⁶⁹ Langlois, M.F., Zanger, K., Monden, T., Safer, J.D., Hollenberg, A.N., and Wondisford, F.E. (1997) *J. Biol. Chem* 272:24927-33.

²⁷⁰ Abel, E.D., Boers, M.E., Pazos-Moura, C., Moura, E., Kaulbach, H., Zakaria, M., Lowell, B., Radovick, S., Liberman, M.C., and Wondisford, F. (1999) *J. Clin. Invest.* 104:291-300.

²⁷¹ Refetoff, S., Weiss, R.E., and Usala, S.J. (1993) *Endocrinol. Rev.* 14:348-99.

maior afinidade de ligação e superior atividade transcricional sobre TR β mutantes envolvidos em RTH, quando comparado ao hormônio T3²⁷².

4.1.2. A BUSCA POR AGONISTAS TIROMIMÉTICOS SELETIVOS

Os hormônios tireoidianos afetam muitos tecidos dentro do grupo dos mamíferos. Em excesso, estes hormônios causam perda de peso, taquicardia, arritmia atrial e parada cardíaca. Além disto, causam respostas fisiológicas tais como redução dos níveis de colesterol plasmático, agitação e fadiga muscular. Alguns destes efeitos podem ser benéficos, como, por exemplo, diminuição dos níveis de colesterol plasmático ou indução de perda de peso em indivíduos obesos. Outros efeitos, tais como promoção de taquicardia, arritmia e subsequente parada cardíaca, são deletérios e se sobrepõe às propriedades benéficas dos hormônios tireoidianos²⁷³. Se homólogos dos hormônios tireoidianos pudessem ser concebidos de maneira a serem seletivos em seus efeitos, estas ações adversas poderiam ser evitadas.

Os diferentes subtipos de TR diferem em suas contribuições para respostas específicas, como já descrito no **Capítulo 3**, item **3.1.1**. Recapitulando, o estudo de camundongos transgênicos revelou que a deleção da isoforma TR α 1 promove diminuição da taxa cardíaca e da temperatura corporal, além de níveis de TSH e T4 ligeiramente abaixo do normal²⁷⁴. Somado a isto, se tem observado taquicardia em pacientes com RTH, os quais apresentam mutações nos subtipos β do receptor

²⁷² Messier, N., Laflamme, L., Hamann, G., Langlois, M.F. (2001) *Mol. Cell Endocrinol.* 174:59-69.

²⁷³ von Olshausen, K., Bischoff, S., Kahaly, G., Mohr-Kahaly, S., Erbel, R., Beyer, J., and Meyer J. (1989) *Am. J. Cardiol.* 63:930-3.

²⁷⁴ Wikstrom, L., Johansson, C., Salto, C., Barlow, C., Campos Barros, A., Baas, F., Forrest, D., Thoren, P., and Vennstrom, B. (1998) *EMBO J.* 17:455-61.

tireoidiano e níveis elevados de hormônios tireoidianos e TSH. A deleção da isoforma TR β promove níveis elevados de hormônio tireoidiano, bócio e inapropriada supressão de TSH²⁷⁵.

A síntese e caracterização de um composto seletivo para o subtipo β , GC-1 [3, 5-dimetil-4-(4'-hidroxi-3'-isopropilbenzil)-acetato de fenoxi] (**Figura 46**) tem permitido maiores avaliações sobre a contribuição relativa do dois subtipos em determinados tipos de respostas²⁷⁶. GC-1 foi desenhado a partir da estrutura do tiromimético DIMIT (3,5 - dimetil - 3' - isopropil - L - tironina), o qual possui baixa afinidade por TR e não é seletivo. GC-1 liga hTR β 1 com uma afinidade comparável à T3 mas liga-se a hTR α 1 com uma afinidade 10 vezes menor²⁷⁶. Em ratos hipotiróidicos, GC-1, diferentemente do hormônio T3, diminuiu os níveis séricos de colesterol em concentrações que não afetaram a taxa cardíaca²⁷⁷. Estudos recentes demonstraram que uma cadeia lateral do GC-1 composta por um ácido oxiacético é o elemento crítico na ação β -seletiva deste composto²⁷⁸.

²⁷⁵Forrest, D., Hanebuth, E., Smeyne, R.J., Everds, N., Stewart, C.L., Wehner, J.M., Curran, T. (1996) *EMBO J.* 15:3006-15.

²⁷⁶Chiellini, G., Apriletti, J.W., Yoshihara, H.A., Baxter, J.D., Ribeiro, R.C., Scanlan, T.S. (1998) *Chem. Biol.* 5:299-06.

²⁷⁷Trost, S.U., Swanson, E., Gloss, B., Wang-Iverson, D.B., Zhang, H., Volodarsky, T., Grover, G.J., Baxter, J.D., Chiellini, G., Scanlan, T.S., and Dillmann, W.H. (2000) *Endocrinology* 141:3057-64.

²⁷⁸Yoshihara, H.A., Apriletti, J.W., Baxter, J.D., Scanlan, T.S. (2003) *Med. Chem.* 46:3152-61.

Figura 46. Estrutura do ligante agonista tiromimético GC-1. Os carbonos estão representados em verde e os oxigênios em vermelho.

3, 5-dimetil-4-(4'-hidroxi-3'-isopropilbenzil)-acetato de fenoxi (GC-1)

Têm sido obtidas muitas estruturas cristalográficas do domínio LBD dos subtipos TR α e TR β complexados com diferentes ligantes, naturais e sintéticos. A primeira estrutura descrita foi do LBD de rato do subtipo TR α (rTR α) cocrystalizado com DIMIT²⁷⁹.

Posteriormente, foi cristalizada e resolvida a estrutura do mesmo domínio da proteína hTR β 1 associada a T3 e a um peptídeo contendo a região NR-2 do coativador GRIP-1²⁸⁰. Também são conhecidas as estruturas cristalográficas dos complexos rTR α -Triac, hTR β 1-Triac e hTR β 1-GC-1²⁸¹. Estes resultados identificaram diferenças no bolsão de ligação de ligante entre os dois subtipos, tal como o papel de um único resíduo de aminoácido que difere entre os dois receptores (Ser277 em TR α e Asn331 em TR β 1), o qual poderia ser útil para estudos de desenho de fármacos. A importância deste único resíduo para definição da β -seletividade do composto GC-1 foi confirmada através do

²⁷⁹ Wagner, R.L., Apriletti, J.W., McGrath, M.E., West, B.L., Baxter, J.D., Fletterick, R.J. (1995) *Nature* 378:690-97.

²⁸⁰ Darimont, B.D., Wagner, R.L., Apriletti, J.W., Stallcup, M.R., Kushner, P.J., Baxter, J.D., Fletterick, R.J., Yamamoto, K.R. (1998) *Genes Dev.* 12:3343-56.

²⁸¹ Wagner, R.L., Huber, B.R., Shiau, A.K., Kelly, A., Cunha, Lima, S.T., Scanlan, T.S., Apriletti, J.W., Baxter, J.D., West, B.L., and Fletterick, R.J. (2001) *Mol Endocrinol.* 15:398-410.

estudo de mutantes de ambas isoformas²⁸¹. A única estrutura depositada no banco de dados PDB dentre estas citadas é a do hTR β 1 LBD complexado com T3 e um fragmento de GRIP1, a uma resolução máxima de 3.7Å (PDB ID 1BSX). Só recentemente, em janeiro de 2003, foram depositadas estruturas desta isoforma complexadas com Triac e à melhor resolução (resoluções de 2.4Å a 3.1Å) (PDB IDs 1NQ0, 1NQ1, 1NQ2 e 1NUO).

O GC-1 foi desenhado de maneira a ser um tiromimético sinteticamente acessível que poderia servir como plataforma para o desenvolvimento de outros agonistas. Um trabalho bem recente apresentou um novo derivado do composto GC-1, chamado GC-24. Este composto apresentou uma substituição química para um grupo grande na posição 3' do anel distal. Esta substituição foi responsável por melhorar a seletividade pelo subtipo β para um fator 40-60 vezes (a seletividade do composto GC-1 é de cerca de 10 vezes), enquanto conservou a afinidade de ligação e ação sobre o receptor em níveis normais²⁸².

A estrutura cristalográfica do receptor hTR β 1 LBD complexado com GC-24 revelou que esta marcante especificidade do composto GC-24 não é dependente da composição de sequência do bolsão de ligação de ligante. De fato, GC-24 provoca modificação na posição das hélices 3 e 11 e faz contato com aminoácidos fora do bolsão clássico, criando uma superfície de interação diferente e gerando novas oportunidades de se explorar a especificidade de interação agonista-receptor²⁸².

Outro ligante (denominado 15) combinou as propriedades de ação potente e seletiva, conforme verificado por estudos *in vivo* e *in vitro*, sendo cerca de 10 vezes mais seletivo para TR β , e, portanto, apresentando um perfil farmacológico semelhante ao do

²⁸² Borngraeber, S., Budny, M.J., Chiellini, G., Cunha-Lima, S.T., Togashi, M., Webb, P., Baxter, J.D., Scanlan, T.S., and Fletterick, R.J. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100:15358-63.

composto GC-1²⁸³. A estrutura cristalográfica dos receptores hTR α 1 LBD e hTR β 1 LBD em complexo com este composto revelou que esta β -seletividade pode ser explicada nos mesmos moldes da seletividade do composto GC-1. Esta característica reside na única diferença de aminoácido entre os LBP destas isoformas (S277 em α e N331 em β)²⁸³.

Por fim, uma nova série de tiromiméticos β -seletivos baseados no composto 6-Azuracil foi recentemente divulgada. A partir da estrutura cristalográfica do receptor TR β 1 LBD ligado a um composto inicial desta série, identificou-se contatos importantes responsáveis pela ação potente e seletiva do grupamento Azuracil. Os dados cristalográficos apontaram uma ponte de hidrogênio adicional com a Arg316, a qual não existia nos contatos entre T3 e GC-1 com TR. Mantendo-se o grupamento Azuracil, vários compostos foram gerados através de modificações no grupamento difenil éter do ligante. Os compostos foram testados, tendo mostrado seletividade para a isoforma β de até 100 vezes, em relação à ligação ao receptor e ativação funcional²⁸⁴.

Desta maneira, análogos hormonais subtipo-seletivos podem ser empregados para produzir ações específicas dos hormônios tireoidianos, podendo ser poderosos instrumentos para o estudo dos papéis fisiológicos específicos de cada isoforma.

Além disto, a modulação seletiva da ação do TR poderá ser útil no tratamento de obesidade e hipercolesterolemia, além de outras desordens lipídicas. Neste sentido, o

²⁸³ Ye, L., Li, Y.L., Mellstrom, K., Mellin, C., Bladh, L.G., Koehler, K., Garg, N., Garcia, Collazo, A.M., Litten, C., Husman, B., Persson, K., Ljunggren, J., Grover, G., Sleph, P.G., George, R., and Malm, J. (2003) *J. Med. Chem.* 46:1580-8.

²⁸⁴ Dow, R.L., Schneider, S.R., Paight, E.S., Hank, R.F., Chiang, P., Cornelius, P., Lee, E., Newsome, W.P., Swick, A.G., Spitzer, J., Hargrove, D.M., Patterson, T.A., Pandit, J., Chrunk, B.A., LeMotte, P.K., Danley, D.E., Rosner, M.H., Ammirati, M.J., Simons, S.P., Schulte, G.K., Tate, B.F., and DaSilva-Jardine, P. (2003) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13:379-82.

estudo estrutural por cristalografia de raios X do domínio LBD dos subtipos TR α e TR β complexados com diferentes ligantes é de suma importância para a busca de compostos seletivos cada vez mais eficientes.

Dentro do contexto acima descrito de busca de tiromiméticos seletivos para a isoforma β , utilizando-se como plataforma de pesquisa, entre outros, os estudos cristalográficos, realizou-se a expressão, purificação, cristalização e resolução (por cristalografia de raios X) da estrutura da região LBD do receptor hTR β 1 em complexo com os ligantes naturais T3 e Triac e o composto sintético GC-1. Até o momento da cristalização deste receptor com estes ligantes, a única estrutura disponível no PDB era de baixa resolução para tais tipos de estudos, e somente figurava o complexo hTR β 1 LBD-T3. Buscou-se também cristalizar o domínio LBD da isoforma β 1 na ausência de ligante e o complexo TR LBD (T3) / *apo*-RXR LBD, ambas estruturas ainda inéditas.

4.2. METODOLOGIA

4.2.1. EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DO TR LBD

Empregou-se os processos de purificação por afinidade, interação hidrofóbica (em alguns casos) e gel filtração. Os métodos foram descritos no **Capítulo 3**. Os complexos TR LBD com Triac e TR LBD com GC-1 foram produzidos da mesma maneira que o complexo TR LBD com T3.

4.2.2. PURIFICAÇÃO DO HETERODÍMERO TR LBD (T3) / APO-RXR LBD

4.2.2.1. Expressão e Purificação do RXR LBD

A construção pET-17b (Novagen) hRXR α LBD (aa198-462) foi gentilmente cedida pelo Dr. Jonh Baxter da Unidade de Pesquisa Metabólica do Centro de Diabetes, Universidade da Califórnia, São Francisco, EUA.

As condições para expressão deste receptor em *E. coli* foram estabelecidas através de uma série de ensaios padrão de determinação de temperatura, concentração de IPTG e tempo de indução. A melhor condição verificada é a que descreve-se abaixo.

Inoculou-se o meio de cultura 2X LB (2% Triptona, 2% Extrato de Levedura e 1% NaCl), contendo 100 μ g/ml de Ampicilina, com 1% de seu volume utilizando-se de pré-cultura crescida ON a 37°C. A cultura foi incubada a 37°C até a DO₆₀₀ = 0.7 - 0.8, tendo sido induzida com 0.5mM de IPTG. Manteve-se o crescimento por três horas e centrifugou-se a cultura por 10min., 6.000rpm à 4°C (rotor GS3-Sorval). O RXR LBD foi purificado de maneira similar à purificação do mesmo receptor contendo os domínios DBD-LBD (**Anexo 1**).

4.2.2.2. Purificação do Heterodímero

Dada a grande tendência para formação de heterodímeros entre TR e RXR em solução, em detrimento à formação de homodímeros TR/TR e RXR/RXR, o procedimento adotado foi simplesmente a mistura de ambas proteínas. Assim, TR complexado com T3, produzido por purificação em coluna de afinidade ou afinidade + interação hidrofóbica + gel filtração, foi misturado a RXR sem hormônio eluído de coluna de afinidade, ou purificado por afinidade + troca aniônica em resina do tipo Q-sepharose (Amersham-Bioscience). Após a mistura, o complexo foi incubado por 1 hora à 4°C e aplicado em gel filtração, utilizando-se a coluna Superdex 200 HL 26/60 (Amersham-Bioscience) ou Superdex 75 10/30 (Amersham-Bioscience). A purificação foi feita na solução 20mM Hepes-Na pH8.0, 0.5mM EDTA, 3mM DTT, 300mM NaCl.

As amostras obtidas foram analisadas em SDS-PAGE com 10% poliacrilamida. As bandas de proteínas foram visualizadas através de coloração com solução de Coomassie Blue. A quantificação foi feita utilizando-se o método colorimétrico de Bradford empregando-se o *kit* Protein Assay da BioRad (Albumina de Soro Bovino como padrão), segundo especificações do fabricante. O complexo foi concentrado através de centrifugação a 1500 x g, 4°C, pelo tempo necessário, utilizando-se do concentrador Amicon Ultra 10MWCO (Millipore).

4.2.3. CRISTALIZAÇÃO DE MACROMOLÉCULAS

Descrito no **Capítulo 2**.

4.2.3.1. TR LBD com T3, Triac e GC-1

Os ensaios de cristalização conduzidos para a proteína TR LBD, na forma *holo*, foram baseados em condições já descritas²⁸¹.

Para tanto fez-se um amplo ensaio ao redor da condição publicada (1M Acetato de Sódio, 100mM Cacodilato de Sódio pH7.2). Para obtenção de cristais de TR LBD com T3 testou-se as condições: 100mM Cacodilato de Sódio pH 6.8, 7.0, 7.2, 7.5, 7.8 e 8.0 e, para cada pH, as concentrações de 0.8, 0.9, 1.0, 1.2, 1.3, 1.4, 1.6, 1.8 e 2.0M Acetato de Sódio. Utilizou-se proteína purificada através dos processos de afinidade, interação hidrofóbica e gel filtração. A concentração final foi de 10mg/ml. Os ensaios foram feitos pela técnica de *hanging drop*, nas temperaturas de 4°C e 18°C, com gotas de 4µl, 2µl de proteína e 2µl de solução de poço.

Os cristais de TR LBD com Triac foram obtidos realizando-se o ensaio 100mM Cacodilato de Sódio pH 5.0, 6.8, 7.0, 7.2, 7.5, 7.8 e 8.0 e, para cada pH, as concentrações de 0.8, 0.9, 1.0, 1.2, 1.3, 1.4, 1.6, 1.8 e 2.0M de Acetato de Sódio. Além disto, variou-se a concentração de Cacodilato de Sódio para 30 e 70mM, empregando-se, para estas concentrações, Acetato de Sódio a 1.2, 1.3 e 1.4M. Utilizou-se proteína purificada através dos processos de afinidade e gel filtração. A concentração final foi de 12mg/ml. Os ensaios foram feitos pela técnica de *hanging drop* à 4°C, com gotas de 8µl, 4µl de proteína e 4µl de solução de poço.

O co-cristal TR LBD com GC-1 foi obtido a partir do mesmo ensaio citado no parágrafo acima. Em adição a estas condições, empregou-se 100mM Cacodilato de Sódio pH 7.2, combinado com 50, 100, 200 e 250mM Succinato de Sódio contra 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1 e 1.2M Acetato de Sódio. Utilizou-se proteína purificada através dos

processos de afinidade e gel filtração, na concentração final de 12mg/ml. Os ensaios foram feitos pela técnica de *hanging drop* à 4°C, com gotas de 8µl, 4µl de proteína e 4µl de solução de poço.

4.2.3.2. TR LBD (T3) / *apo*-RXR LBD

Na tentativa de cristalizar o heterodímero TR LBD (T3) / *apo*-RXR LBD utilizou-se o *kit* Cristal Screen I da Hampton Research, à temperatura de 18°C, e ensaios de *hanging drop*. A proteína TR LBD foi purificada por princípio de afinidade, interação hidrofóbica e gel filtração; a porção LBD do receptor RXR foi obtida após purificação por afinidade e troca iônica. Ambas proteínas foram combinadas como descrito no item 4.2.2.2 e aplicadas em gel filtração. O heterodímero obtido foi concentrado para 7mg/ml e testado em gotas contendo 2µl de proteína e 2µl de solução de poço.

Testou-se também a combinação de condições: 100mM Cacodilato de Sódio pH 6.8, 7.5, 7.8 e 8.0 e, para cada pH, as concentrações de 0.8, 0.9, 1.0, 1.2, 1.3, 1.4M Acetato de Sódio. Paralelamente foram testadas condições baseadas no *Kit* de Cristalização de Receptores Nucleares NR-LBD (Molecular Dimensions). Produziu-se a proteína como descrito para o ensaio anterior (parágrafo acima) e tendo sido utilizada, no ensaio de cristalização, a 5mg/ml. O ensaio foi feito em *hanging drop*, com gotas contendo 2µl de proteína e 2µl de solução de poço, na temperatura de 4°C.

Fez-se outro ensaio empregando-se os receptores purificados separadamente por afinidade, combinados e aplicados em gel filtração para separação do heterodímero das demais formas. A concentração final para o ensaio de cristalização foi de 10mg/ml. Empregou-se a técnica de *sitting drop*, a 4°C, com gotas de 5µl de proteína e 5µl de

solução de poço. Testou-se as combinações: 100mM Cacodilato de Sódio pH 6.8, 7.0, 7.4, 7.5, 7.7 e 8.0 e, para cada pH, as concentrações de 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6M Acetato de Sódio. Fez-se também um ensaio com 100mM Cacodilato de Sódio pH 7.2, 200 e 250mM Succinato de Sódio, combinados com 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1 e 1.2M Acetato de Sódio. Repetiu-se o *Kit* de Cristalização de Receptores Nucleares NR-LBD (Molecular Dimensions).

4.2.3.3. *apo*-TR LBD

Na tentativa de cristalizar a proteína TR LBD sem ligante, utilizou-se o *kit* Cristal Screen I da Hampton Research e o ensaio 100mM Cacodilato de Sódio pH 7.2, 7.5, 7.8 e 8.0 onde, para cada pH, utilizou-se as concentrações de 1.0, 1.4, 1.6, 1.8, 1.3, 1.4M Acetato de Sódio, as temperatura de 18°C e 4°C e ensaios de *hanging drop*. Realizou-se também ensaios com o *kit* Grid Screen de MPD (Hampton Research) a 18°C. A proteína TR LBD foi purificada por princípio de afinidade e gel filtração. O receptor foi concentrado para 10mg/ml e testado em gotas contendo 2µl de proteína e 2µl de solução de poço.

Foram feitos também ensaios baseados nas condições de cristalização da porção LBD do RXR^{109, 285}. Para tanto, purificou-se a proteína por afinidade e gel filtração, tendo sido a solução de gel filtração substituída (por concentração, re-suspensão e nova concentração) antes da montagem das gotas. Em um ensaio substituiu-se a solução de purificação pela solução 1 (100mM Pipes pH7.0, 100mM KCl, 12% Glicerol, 15mM

²⁸⁵ Bourguet, W., Ruff, M., Bonnier, D., Granger, F., Boeglin, M., Chambon, P., Moras, D., and Gronemeyer, H. (1995) *Protein Expr. Purif.* 6:604-8.

CHAPS) e, em outro ensaio, pela solução 2 (20mM Hepes-Na pH8.0, 500mM Acetato de Amônio, 2mM EDTA, 2.5% propanediol, 0.1% β -octil-glucoside). A proteína ressuspensa na solução 1, após concentração para 10mg/ml, foi misturada nas proporções 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5 e 6:4 μ l (solução proteína:solução do poço) e montada em experimentos do tipo *hanging drop* (18°C). Fez-se o ensaio: 100mM Pipes pH7.0, combinado com 0.9, 1.1, 1.3, 1.5M Citrato de Amônio. Utilizou-se esta mesma preparação de proteína com o *kit* de Cristalização de Receptores Nucleares NR-LBD (Molecular Dimensions), na proporção de 3 μ l proteína: 3 μ l de solução poço (4°C).

A proteína ressuspensa pela solução 2 foi concentrada para 7.7mg/ml, e submetida a ensaios de *sitting drop* (4°C), nas quantidades de 3 μ l de proteína: 3 μ l de solução do poço. Testou-se as condições: 20mM Hepes-Na pH 7.0, 7.5, 7.8 e 8.0, contra 0.9, 1.0, 1.3, 1.5, 1.8 e 2.0M Sulfato de Lítio. Fez-se também um ensaio utilizando-se 20mM Hepes-Na pH 7.0, 7.5, 7.8 e 8.0, contra 0.1M LiSO₄ + 5% PEG 4000, 0.2M LiSO₄ + 4% PEG 4000, 0.25M LiSO₄ + 3% PEG 4000, 0.35M LiSO₄ + 2% PEG 4000, 0.4M LiSO₄ + 1% PEG 4000 e 0.5M LiSO₄ + 0.5% PEG 4000.

O *kit* de Cristalização de Receptores Nucleares gerou, em duas condições, esferulitas. Para tentar-se obter formas cristalinas adequadas para difração, optou-se por tentar otimizar uma das condições do *kit* (100mM Bis Tris pH6.0, 1.5M Citrato de Sódio e 100mM Acetato de Amônio). Para tanto, fez-se uma variação dos parâmetros desta condição: 100mM Bis Tris pH 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 1.0, 100mM Acetato de Sódio, 1.3, 1.5, 1.8, 2.0 e 2.2M Citrato de Sódio. Os ensaios foram à 4°C, do tipo *hanging drop*, 3 μ l de proteína (9.3mg/ml) e 3 μ l tampão. Novamente observou-se a presença de esferulitas em várias condições. Para uma nova otimização, a proteína ressuspensa no tampão 1 foi

empregada em ensaios de *sitting drop*, 4°C, onde manteve-se, em todas as condições, a solução 100mM Bis Tris pH6.0, 1.5M Citrato de Sódio e 100mM Acetato de Amônio, e variou-se a presença de aditivos (Aditive Screen I e II, Hampton Research). Foram usados 5µl proteína (10mg/ml), 1µl aditivo e 4µl tampão. Um dos aditivos testados (30% 1,8-diaminooctano) aparentou render uma melhora nos cristais gerados. Uma nova otimização foi tentada, desta vez mantendo-se o aditivo e utilizando-se o ensaio 100mM Bis Tris pH 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 1.0, 100mM Acetato de Sódio, 1.3, 1.5, 1.8, 2.0 e 2.2M Citrato de Sódio. O ensaio foi de *sitting drop*, à 4°C, com proteína na concentração de 10 e 5mg/ml, 5µl proteína, 1µl aditivo, 4µl de solução do poço.

4.2.4. COLETA E PROCESSAMENTO DE DADOS DE DIFRAÇÃO DE RAIOS X

Os dados foram coletados e as estruturas resolvidas com a estreita colaboração do aluno de doutoramento do Instituto de Física da USP/São Carlos, Andre Luis Berteli Ambrosio, orientado pelo Prof. Richard Garrat. Será apresentada uma breve descrição sobre as metodologias envolvidas.

A coleta de dados de difração de raios X é a parte central na análise da estrutura cristalina. O problema experimental que envolve a determinação de uma estrutura molecular por difração de raios X é a obtenção dos fatores de estrutura ($F(hkl)$), das ondas difratadas pelo cristal, que carregam informações sobre a distribuição eletrônica do material espalhador ($\rho(xyz)$). Esses fatores de estrutura podem ser descritos em termos de amplitudes, $|F(hkl)|$, e de fases, $\alpha(hkl)$. Contudo, em um experimento de difração em cristalografia, independente dos tipos de detectores de raios X atualmente

disponíveis, é possível se medir apenas a amplitude da onda resultante difratada, sendo a fase perdida. Assim, como não é possível obter uma imagem direta da estrutura da proteína em um cristal, é necessário medir a intensidade ($I \propto |F(hkl)|^2$), a direção da onda difratada, estimar as fases e, através de métodos hoje computacionais, calcular a estrutura que deu origem ao padrão de difração.

Em se tratando de coleta de dados para cristais de macromoléculas, vários problemas têm de ser resolvidos. Primeiramente, o grande tamanho da cela unitária acarreta um grande aumento no número de reflexões e as intensidades médias resultantes são mais baixas ($I \propto V_{\text{cristal}}/V_{\text{cela}}^2$). Por exemplo, para um cristal de proteína com celas unitárias de volume 1000 vezes maior que o de uma pequena molécula, a intensidade média da onda difratada é aproximadamente $1/(1000)^2$ vezes menor. Além disso, os cristais geralmente contêm proporções consideráveis de solvente aquoso (em média 50% de seu volume total), o que faz com que as posições relativas das moléculas sejam um pouco diferentes, de uma cela unitária para outra, reduzindo principalmente intensidades a altas resoluções.

Tais problemas geram sérias implicações em todos os passos desde a determinação até o refinamento da estrutura. Na grande maioria das vezes, as soluções para o problema das fases não são obtidas por métodos diretos e os modelos refinados requerem a imposição de vínculos estereoquímicos para que se mantenha uma geometria aceitável.

Avanços recentes, tais como o uso de radiação síncrotron, temperaturas criogênicas^{286, 287, 288} e detectores bidimensionais mais eficientes têm tornado a coleta de dados tecnicamente mais fácil.

Várias revisões descrevendo aspectos teóricos e práticos desse processo têm sido publicadas recentemente, onde toda a fundamentação pode ser encontrada^{289, 290, 291, 292}.

Os cristais de TR LBD com T3, GC-1 e Triac difratados foram crioprotégidos com 10% de Etilenoglicol e coletados a temperaturas criogênicas (100K) em fluxo de nitrogênio. As coletas de dados de difração de raios X foram realizadas no Laboratório de Cristalografia de Proteínas do Centro de Biotecnologia Molecular Estrutural - IFSC/USP, utilizando-se um gerador do tipo ânodo rotatório RIGAKU ultraX 18 com sistema de aquisição MAR345dtb (placa de imagem), a um comprimento de onda de 1,5418 Å (Cu-K α). Os conjuntos de dados foram obtidos através do método de rotação (nos três casos, $\Delta\phi = 1^\circ$).

A autoindexação da primeira imagem de cada conjunto foi realizada pelo programa MOSFLM²⁹³, onde valores aproximados dos parâmetros de cela (a, b, c, α , β e γ) e a orientação para cada um dos cristais foram encontrados. A partir da distribuição de vetores diferença, gerados a partir de pontos recíprocos extraídos do padrão de difração, o programa apresenta os parâmetros de cela calculados para cada uma das 14 possíveis redes de Bravais. Para cada um desses retículos, são atribuídas penalidades

²⁸⁶ Haas, D.J., and Rossmann, M.G. (1970) *Acta Cryst.* B26:998-1004.

²⁸⁷ Hass, D.J. (1968) *Acta Cryst.* B24:604.

²⁸⁸ Teng, T.Y. (1990) *J. Appl. Cryst.* 23:387-91.

²⁸⁹ Carter, C.W. Jr., and Sweet, R.M. (1997) *Methods Enzymol.* 276:183-358.

²⁹⁰ Turkenburg, J., Brady, L., Bailey, S., Ashton, A., Broadhurst, P., and Brown, D. (1999) *Acta Cryst.* D55:1631-772.

²⁹¹ Dauter, Z. (1999) *Acta Cryst.* D55:1703-17.

²⁹² Drenth, J. (1999) *Principles of X-ray Crystallography*, 2nd ed. Heidelberg: Springer.

²⁹³ Leslie, A.G.W. (1992) Joint CCP4 + ESF-EAMCB Newsletter on Protein Crystallography No. 26.

correspondentes à distorção da cela triclinica, para que esta se transforme nas redes de maior simetria. A escolha do sistema cristalino correto é então realizada em função dessa penalidade, de maneira a se tomar o sistema de maior simetria ainda com penalidade baixa.

A integração das imagens de difração e o refinamento dos parâmetros foram conduzidos ainda com o MOSFLM. O escalonamento e a promediação dos dados foi feita pelo programa SCALA²⁹⁴, que inclui o programa TRUNCATE²⁹⁵, ambos parte do pacote de programas cristalográficos CCP4 (*Collaborative Computational Project Number 4*, 1994). Gerou-se um arquivo final que continha os índices de Miller (hkl), os módulos dos fatores de estrutura, $|F(hkl)|$, e suas respectivas incertezas ($\sigma(F)$) para cada reflexão, calculadas a partir das intensidades reduzidas.

Uma vez definida a rede de Bravais satisfatória, foi preciso determinar o grupo espacial correto. A escolha do grupo correto entre todos os possíveis grupos espaciais foi feita através da análise das extinções sistemáticas, catalogadas na *International Tables for Crystallography* Vol. A (Kluwer Academic, 1996).

O número de moléculas presentes na unidade assimétrica foi estimado utilizando-se o programa Matthews_coeff do pacote CCP4, que faz uso da metodologia proposta por Matthews²⁹⁶.

²⁹⁴ Evans, P.R. (1997) *Joint CCP4 and ESF-EACBM Newsletter on Protein Crystallography* 33:22-24.

²⁹⁵ French, G.S., and Wilson, K.S. (1978) *Acta Cryst.* A34:517-25.

²⁹⁶ Matthews, B.M. (1968) *J. Mol. Biol.* 33:491-97.

4.2.5. OBTENÇÃO DAS FASES E REFINAMENTO DAS ESTRUTURAS CRISTALOGRÁFICAS

A grande limitação na resolução de uma estrutura cristalográfica através da coleta de dados de difração de raios X, é a obtenção das fases, $\alpha(hkl)$, das ondas espalhadas pelas nuvens eletrônicas dos conjuntos de átomos que constituem o cristal. A construção de um modelo cristalográfico inicial se baseia na análise dos mapas de densidade eletrônica, calculados com fases experimentais ou estimadas ($\rho(xyz)$). Em princípio, para se resolver o problema das fases e possibilitar o cálculo inicial dos mapas, quatro técnicas básicas foram desenvolvidas: substituição isomórfica múltipla²⁹⁷, dispersão anômala a múltiplos comprimentos de onda²⁹⁸, substituição molecular²⁹⁹ e métodos diretos³⁰⁰. O uso do espalhamento anômalo dos átomos permite ainda a derivatização de outras técnicas, como dispersão anômala a um único comprimento de onda (SAD) e substituição isomórfica múltipla ou simples, com sinal anômalo (MIRAS ou SIRAS).

Na tentativa de obtenção das fases destas proteínas aplicou-se a técnica de substituição molecular (MR, *Molecular Replacement*). Comumente, a substituição molecular faz uso das informações de similaridade sequencial entre proteínas da mesma família, uma vez que se espera que estas possuam enovelamentos muito semelhantes. A molécula modelo da proteína é modificada de acordo com o mapa e a sequência de aminoácidos da estrutura que se quer determinar. Atualmente, devido ao grande número de estruturas disponíveis, essa é a técnica mais fácil e utilizada para se resolver uma

²⁹⁷ Green, D.W., Ingram, V.M., and Perutz, M.F. (1958) *Proc. R. Soc. London Ser* 225:287-307.

²⁹⁸ Hendrickson, W.A. (1985) *Trans. Am. Cryst. Assoc.* 21:11.

²⁹⁹ Rossmann, M.G., and Blow, D.M. (1962) *Acta Cryst.* 15:24-31.

³⁰⁰ Hauptman, H.A. (1997) *Methods Enzymol.* 276:3-13.

estrutura. A busca por soluções foi feita pelo programa MOLREP³⁰¹ e o modelo empregado para resolução das estruturas com Triac, GC-1 e T3 foi o próprio LBD ligado à T3, depositado no banco de dados a uma resolução de 3.7Å (PBD ID 1BSX).

Após a obtenção do conjunto inicial de fases, é imprescindível o refinamento de parâmetros necessários para se descrever o modelo. Para cada átomo na unidade assimétrica, um número mínimo de 4 (posição e vibração isotrópica) até um máximo de 10 parâmetros (em situações de ocupação parcial e vibrações anisotrópicas) pode ser definido. E uma vez definidos, estes parâmetros devem ser modificados para melhorar a concordância com os dados experimentais, com abordagem tanto no espaço recíproco (acordo entre fatores de estrutura teóricos e experimentais) como no espaço real (inspeção dos mapas de densidade eletrônica do modelo).

O empacotamento cristalino das moléculas foi manualmente inspecionado e o modelo foi subsequenteiramente sujeito a refinamentos pelo algoritmo de máxima verossimilhança (*Maximum Likelihood*) com fatores de temperatura isotrópicos utilizando-se o pacote de programas CNS (*Crystallographic & NMR System*³⁰²) e o programa REFMAC (Collaborative Computational Project Number 4).

Ciclos de refinamento no espaço real, com modificações manuais do modelo, foram feitos através da inspeção dos mapas de densidade eletrônica $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$, α_{calc} , e Fourier diferença ($F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$, α_{calc}), usando o programa gráfico 'O'³⁰³, alternados com cálculos intermediários (no espaço recíproco) para refinamento de posições atômicas,

³⁰¹ Vagin, A., and Teplyakov, A. (1997) *J. Appl. Cryst.* 30:1022-25.

³⁰² Brünger, A., Adams, P., Clore, M., Gros, P., Nilges, M., and Read, R. (1998) *Acta Cryst.* D54:905-21.

³⁰³ Jones, T.A., Zou, J.Y., Cowan, S.W., and Kjeldgaard, M. (1991) *Acta Cryst.* A47:110-19.

dinâmica molecular (*Simulated Annealing*³⁰⁴), restrições geométricas e de contato, refinamento de fator de temperatura individual para todos os átomos, além de minimização de funções de energia.

A resolução limitada e a qualidade do conjunto inicial de fases, característicos de dados de difração para macromoléculas, faz com que às vezes o refinamento seja guiado de maneira tendenciosa. Isto torna muito grande a probabilidade de introdução de erros no modelo, principalmente quando o conjunto inicial das fases vem de substituição molecular. Desta maneira, deve-se conduzir um constante monitoramento na qualidade do que está sendo feito durante todo o processo de construção. Diversos programas computacionais têm sido desenvolvidos nesta área, permitindo a visualização, a manipulação, cálculo e refinamento dos parâmetros e a análise da qualidade do modelo em construção. A validação dos modelos finais foi feita através dos programas PROCHECK³⁰⁵ e SFCHECK³⁰⁶.

³⁰⁴ Brünger, A.T. and Rice, L.M. (1997) *Methods Enzymol.* 277:243-69.

³⁰⁵ Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., and Moss, D.S., and Thornton, J.M. (1993) *J. Appl. Cryst.* 26:283-91.

³⁰⁶ Vaguine, A.A., Richelle, J., and Wodak, S.J. (1999) *Acta Cryst.* D55:191-205.

4.3. RESULTADOS

4.3.1. PURIFICAÇÃO DO HETERODÍMERO TR LBD (T3) / APO-RXR LBD

Para exemplificar o processo de purificação do heterodímero, descreve-se um procedimento no qual misturou-se TR LBD ligado à T3, purificado pelas técnicas de afinidade, interação hidrofóbica e gel filtração, com *apo*-RXR purificado por cromatografia de afinidade e troca aniônica. Estas proteínas, depois de misturadas, foram incubadas e purificadas pela coluna de gel filtração Superdex 200 HL 26/60.

A **Figura 47** ilustra o perfil cromatográfico obtido após passagem da mistura *holo*-TR + *apo*-RXR pela coluna de gel filtração. Simultaneamente mostram-se perfis normalmente obtidos quando da aplicação isolada do *apo*-RXR LBD ou do *holo*-TR.

Figura 47. Purificação do heterodímero TR LBD (T3) / *apo*-RXR LBD.

Cromatogramas superpostos mostrando perfis de eluição isocrática (monitorada pela absorbância no ultravioleta a 280nm, no eixo vertical, *versus* volume no eixo horizontal) da coluna de gel filtração Superdex 200 HL 26/60. Aplicou-se, em experimentos independentes, a proteína TR LBD ligada ao T3 e misturada com *apo*-RXR LBD (linha vermelha), o *apo*-RXR LBD (linha verde) e o *holo*-TR LBD (linha azul). Eluição com tampão 20mM Hepes-Na pH8.0, 0.5mM EDTA, 300mM NaCl, 3mMDTT. O segundo eixo Y

indica o *Rh* de proteínas padrões aplicadas na coluna, estando o volume de eluição das mesmas indicado por pontos pretos no gráfico (Ferritina, 6.1nm, Catalase, 5.22nm, Aldolase, 4.81nm, Ovalbumina, 3.05nm, Quimitripsinogênio, 2.09nm, e Ribonuclease A, 1.64nm)

É visível na **Figura 47** que, quando aplicou-se a mistura TR+RXR, um pico intermediário (P2) surgiu entre os picos que são normalmente observados com a passagem da proteína *apo*-RXR pela coluna. Além disto, os mesmos picos que surgem neste último caso, são ligeiramente coincidentes com os outros dois picos que surgem da mistura TR+RXR (P1 e P3). O pico 3 também coincidiu com o pico que se obteve após cromatografia da forma *holo*-TR. Vale ressaltar que todas as purificações foram realizadas nas mesmas condições de volume aplicado, fluxo, tampão e coluna cromatográfica.

Nota-se no gel SDS-PAGE a presença de duas bandas, com ligeira diferença de tamanho (ambas proteínas possuem massas teóricas muito próximas). As frações referentes ao pico 1 (P1) indicaram a presença de RXR LBD. O pico 2 (P2) mostrou conter uma mistura de TR LBD com RXR LBD, em quantidades aparentemente equimolares, o que é um indicativo da possibilidade de estar presente somente o heterodímero em solução. O pico 3 (P3) apresentou tanto RXR LBD quanto TR LBD (dados não mostrados).

Os volumes de eluição puderam ser utilizados no cálculo dos raios hidrodinâmicos (*R_h*) das proteínas eluídas, uma vez que a coluna foi calibrada com proteínas de *R_h* conhecidos (veja **Capítulo 3**). Os raios obtidos indicaram que os picos 1, 2 e 3 do cromatograma obtido pela passagem da mistura TR + RXR correspondem, respectivamente, ao tetrâmero de RXR, dímero de LBDs (somente heterodímero, provavelmente) e monômeros de TR e RXR. Estudos de *Dynamic Light Scattering* concordaram com a existência de dímero na solução de proteína obtida do pico 2.

Estes dados apontam para a possibilidade de estar-se, por este procedimento de purificação, separando o heterodímero TR/RXR das demais formas, dado que homodímeros de *holo*-TR e *apo*-RXR se dissociam durante este processo de purificação. Os estudos de cristalização foram realizados somente com frações da porção central do pico 2.

4.3.2. ENSAIOS DE CRISTALIZAÇÃO

4.3.2.1. Cristalização dos Complexos TR LBD com T3, Triac e GC-1

A cristalização da porção LBD do receptor TR, com os ligantes T3, Triac e GC-1, aconteceu em uma ampla faixa de pH e concentração de Acetato de Sódio. Em algumas condições também utilizou-se Succinato de Sódio. O tamanho dos cristais obtidos foram diversos, tendo sido encontrado cristais com dimensão máxima de 0.05mm até 0.3mm.

O complexo TR LBD + T3 formou cristais tanto à 4°C quanto à 18°C. Estes começaram a crescer a partir de 12 horas da montagem das gotas, formando-se mais rapidamente e em maior número quanto maior a concentração de precipitante na gota (para dada combinação de temperatura de pH). Nas concentrações menores de sal eles surgem após 2-10 dias.

A 18°C, eles cresceram entre 1.0 e 1.4M Acetato de Sódio. Nestas condições observou-se, para pHs entre 6.8 à 7.5, um maior número de cristais (muitas vezes mais de 50), quanto maior a concentração de sal. Nos pHs 7.8 e 8.0, mesmo nas mais altas concentrações de sal, se formaram poucos, mas geminados cristais. A 4°C, utilizou-se maiores concentrações de Acetato de Sódio (faixa de 1.2 - 2.0M) e desta maneira forçou-se o aparecimento de um maior número de monocristais mesmo a pH maiores.

Na presença do GC-1, observou-se cristais após 2 dias da montagem da gota. Os cristais cresceram com 1.1 e 1.2M Acetato de Sódio, combinados com 200 e 250mM Succinato de Sódio, em 100mM Cacodilato de Sódio pH7.2. Os cristais também se formaram em 30mM Cacodilato de Sódio pH8.0, 1.3M Acetato de Sódio. Os ensaios com as combinações 100mM Cacodilato de Sódio pHs 7.2, 7.5, 7.8 e 8.0, com 1.6, 1.8 e 2.0M Acetato de Sódio também geraram vários cristais por gota. Não observou-se cristal, após dois dias de montagem das gotas, nos pHs 6.8 e 7.0. Todas as gotas feitas com soluções em pH5.0 precipitaram no ato da montagem das mesmas. Não fez-se mais observações.

Observou-se os cristais de TR LBD + Triac também após 2 dias da montagem da gota. Os cristais cresceram com 1.4M Acetato de Sódio, 70mM Cacodilato de Sódio pH7.7 e pH 7.5. Os ensaios com as combinações de 100mM Cacodilato de Sódio pHs 7.2, 7.5, 7.8 e 8.0, com 1.4, 1.6, 1.8 e 2.0M Acetato de Sódio geraram vários cristais por gota. Nos pHs 6.8 e 7.0 eles cresceram com 1.3 e 1.4M Acetato de Sódio (não foram testadas concentrações maiores para estes pHs). Obtiveram-se também cristais nas condições 100mM Cacodilato de Sódio, 2M Acetato de Sódio e 10, 15 ou 20% Etilenoglicol. Todas as gotas feitas com soluções em pH5.0 precipitaram no ato da montagem das mesmas. Não fez-se mais observações.

A **Figura 48** apresenta três fotos relativas a cristais de TR LBD com T3, GC-1 e Triac.

Figura 48. Fotos de alguns cristais obtidos dos complexos hTRβ LBD com T3, GC-1 e Triac (da esquerda para direita) juntamente com as condições que os geraram.

4.3.2.2. Ensaios de Cristalização do Heterodímero TR LBD (T3) / *apo*-RXR LBD e do *apo*-TR LBD

Para tentar cristalizar o heterodímero TR/RXR fez-se ensaios com o *kit* Cristal Screen I (Hampton Research) à 18°C. Nenhum resultado significativo foi obtido. Igualmente, os ensaios com as condições de cristalização da porção LBD com ligante, assim como com o *kit* de Cristalização de Receptores Nucleares, à 4°C, não geraram cristais. Muitas gotas permaneceram claras, algumas esferulitas foram obtidas, entretanto nenhum resultado concreto foi gerado.

Na tentativa de se cristalizar a porção LBD sem ligante primeiramente tentou-se o ensaio de Cacodilato de Sódio e Acetato de Sódio normalmente empregado para cristalização desta mesma porção na forma *holo*. Independente do pH, da concentração de sal empregada e da temperatura do ensaio, observou-se precipitado forte nas gotas, sendo que muitos destes precipitados se formaram no ato da montagem do experimento. Os ensaios com os *kits* da Hampton também geraram precipitados em várias gotas.

Algumas gotas permaneceram claras, mas não geraram cristais. Os ensaios com condições baseadas na cristalização do receptor RXR LBD mostraram que, apesar das soluções nas quais foram solubilizadas as proteínas (soluções 1 e 2, veja **Metodologia**) terem tornado o receptor menos propenso a precipitação durante a montagem das gotas, nenhum cristal foi obtido.

O ensaio com o *kit* de Cristalização de Receptores Nucleares também promoveu a precipitação de proteína em diversas gotas. Duas condições geraram esferulitas e tentou-se otimizá-las conforme descrito na **Metodologia**. Não se obteve cristais adequados para os experimentos de difração.

4.3.3. COLETA E PROCESSAMENTO DOS DADOS DE DIFRAÇÃO DE RAIOS X, OBTENÇÃO DAS FASES E REFINAMENTO DAS ESTRUTURAS

Com o intuito de se caracterizar a qualidade dos dados obtidos com os cristais gerados será apresentada uma tabela com diversos parâmetros relativos ao processamento dos dados e refinamento das estruturas (**Tabela 7**).

Tabela 7. Parâmetros e valores finais do processamento dos dados coletados, e estatísticas de refinamento das estruturas.

PARÂMETROS	TR LBD + T3	TR LBD + GC-1	TR LBD + Triac
Coleta e Processamento dos Dados			
Grupo espacial	P3 ₁ 21	P3 ₁ 21	P3 ₁ 21
Parâmetros da cela unitária	a = b = 68.94 Å, c = 131.05 Å, $\alpha = \beta = 90^\circ, \gamma = 120.0^\circ$	a = b = 68.91 Å, c = 130.80 Å, $\alpha = \beta = 90^\circ, \gamma = 120.0^\circ$	a = b = 68.79 Å, c = 131.02 Å, $\alpha = \beta = 90^\circ, \gamma = 120.0^\circ$
Unidade assimétrica	1 molécula	1 molécula	1 molécula
Mosaicidade	0.3 °	0.5 °	0.75°
Faixa de resolução (camada externa)	50.0 – 2.4 Å (2.53 – 2.4)	35.1 – 2.55 Å (2.69 – 2.55)	30.0 – 2.75 Å (2.90 – 2.75)
Solução crioprotetora	líquido-mãe + 10% etilenoglicol	líquido-mãe + 10% etilenoglicol	líquido-mãe + 10% etilenoglicol
Total de imagens ($\Delta\phi = 1^\circ$)	360	70	160
Reflexões totais	446455	96227	252398
Reflexões únicas	14675	12214	10658
Redundância (camada externa)	21.1 (20.6)	4.1 (4.2)	4.9 (5.0)
R_{sym}^a total (camada externa)	9.0 % (40.9 %)	8.6 % (49.5%)	7.6 % (41.8 %)
Completeza total (camada externa)	99.9 % (99.9 %)	99.9 % (99.9 %)	99.9 % (99.9 %)
$\langle I/\sigma(I) \rangle^c$ total (camada externa)	6.4 (1.8)	6.2 (1.5)	8.6 (1.8)
Estatísticas Finais dos Refinamentos			
Rfactor (%)	20.4	em andamento	22.8
Rfree (%)	25.4	em andamento	24.8
r.m.s.d ângulos de ligação (°)	0.948	em andamento	0.866
r.m.s.d comprimento de ligação (Å)	0.006	em andamento	0.006
Análises de Ramachandran			
Regiões mais favorecidas (%)	94.1	em andamento	91.4
Regiões permitidas (%)	5.9	em andamento	8.6

^a $R_{\text{sym}}(F) = \frac{\sum_{hkl} |F_i(hkl) - \overline{F(hkl)}|}{\sum_{hkl} F_i(hkl)}$: discrepância entre os fatores de estrutura simetricamente relacionados

^b $R_{\text{meas}}(F) = \frac{\sum_{hkl} \sqrt{\frac{N}{N-1}} |F_i(hkl) - \overline{F(hkl)}|}{\sum_{hkl} F_i(hkl)}$: discrepância corrigida pela multiplicidade do conjunto

^c $\langle I/\sigma(I) \rangle$: intensidade média dividido pelo erro médio associado a cada medida

Tabela 7. Parâmetros e valores finais do processamento dos dados coletados para os cristais dos complexos TR LBD + T3, TR LBD + GC-1 e TR LBD + Triac, além dos dados referentes ao refinamento das estruturas.

Abaixo são ilustradas as estruturas cristalográficas obtidas, com ênfase na densidade eletrônica traçada para os ligantes (**Figura 49**).

Figura 49. Ilustrações dos modelos cristalográficos do TR LBD com diferentes ligantes. Em detalhe, a densidade eletrônica observada no sítio ativo, como contribuição dos ligantes T3 (A), GC-1 (B), e Triac (C) através do mapa de Fourier $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$, α_{calc} , contornado a 1σ .

4.3.3.1. Análise dos Contatos Cristalinos

A verificação dos contatos cristalinos da molécula de TR LBD revelou um aspecto interessante que merece ser comentado. A construção usada para a cristalização continha a região LBD acrescida de uma parte da região *hinge*. A resolução da estrutura cristalográfica revelou que, curiosamente, quando são gerados os simétricos cristalográficos da molécula de TR LBD, um dos contatos entre as moléculas é feito entre o segmento do *hinge* de uma molécula, com o sítio de interação de coativadores de outra molécula relacionada (**Figura 50**).

Desta maneira, o segmento de *hinge* mimetizou o posicionamento da região LXXLL dos coativadores, como pode ser confirmado na **Figura 50**, onde se sobrepôs a estrutura do TR LBD-T3 aqui resolvida, com a estrutura depositada no PDB (ID 1BSX) do TR LBD-T3 associado com um peptídeo do coativador GRIP1. Nos detalhes da figura verifica-se que as interações químicas, do segmento de *hinge*, e do peptídeo de GRIP1, com o sítio de coativador (H3-H5), são bastante similares entre si.

Este efeito pode ser considerado a princípio como um simples artefato originado da construção empregada na cristalização. A truncagem da região *hinge* gerou uma hélice com características similares às da hélice de GRIP1. Em função disto, este segmento do *hinge* pôde associar-se com o sítio de CoAs dada as forças de interações moleculares envolvidas no empacotamento cristalino. É importante ressaltar que a construção usada para cristalização do TR LBD-T3 com o coativador é idêntica a empregada aqui. Na presença do peptídeo de GRIP1, entretanto, a hélice do *hinge* não ocupou o sítio de CoAs e de fato não foi identificada na densidade eletrônica²⁸⁰.

A

B

C

Hinge	CoAs	Dist. (Å)
E203/C _β	L454/C _{δ1}	3.92
L204/C _{δ1}	V458/C _{γ2}	3.74
L204/C _{δ2}	V458/C _{γ2}	4.5
L204/C _{δ2}	V284/C _{γ2}	3.78
Q205/C _γ (n.m.)	I302/C _{δ1} (n.m.)	3.6
S207/C _β	V284/C _{γ1}	3.9
I208/C _{γ1}	V284/C _{γ1}	3.86
I208/C _{γ1}	L305/C _{δ1}	3.57
I208/C _{γ2}	F293/C _{ε2}	4.16

Grip1	CoAs	Dist. (Å)
I689/C _{γ2}	L454/C _{δ1}	4.74
L690/C _{δ2}	L454/C _{δ1}	3.07
L690/C _{δ2}	V458/C _{γ2}	4.19
L693/C _{δ1}	V284/C _{γ2}	3.95
L693/C _{δ1}	V284/C _{γ1}	4.56
L693/C _β	V284/C _{γ1}	3.74
L694/C _{δ2}	F293/C _{ε2}	4.29
L694/C _{δ1}	I302/C _{δ1} (n.m.)	3.21
L694/C _{δ2}	L305/C _{δ1}	3.92
L694/C _{δ1}	L305/C _{δ1}	4.33

Figura 50. Contato cristalino entre moléculas de TR LBD cristalizado com o ligante T3 e comparação com a estrutura de TR LBD *holo* associado com a região NR-box 2 de GRIP1.

(A) À direita, estrutura cristalográfica do LBD do receptor TR β 1 complexado com o hormônio T3 (ligante não mostrado) e com a região NR-box 2 do coativador GRIP1 (PDB ID 1BSX, LBD em amarelo e peptídeo do GRIP1 em magenta), sobreposta à estrutura da mesma construção protéica cristalizada sem o peptídeo coativador e com o hormônio T3 (ligante não mostrado) (LBD em cinza). À esquerda, também em cinza, outro monômero, gerado por simetria cristalográfica, do LBD cristalizado sem o peptídeo. Em verde tem-se evidenciado a hélice 12. Em detalhe observa-se a comparação entre as seqüências do peptídeo de GRIP1 e da porção do *hinge* que contata o sítio de CoAs. (B) Detalhes sobre os contatos entre a porção do *hinge* de um monômero com o sítio de CoAs de outro monômero relacionado por simetria (hélices H3-H5, em cinza); os tracejados em vermelho indicam pontes salinas, enquanto que dentro da tabela listam-se os contatos hidrofóbicos e suas respectivas distâncias. (C) Detalhes sobre os contatos entre o peptídeo de GRIP1 e o sítio de CoAs do LBD de TR (hélices H3-H5, em amarelo); os tracejados em vermelho indicam pontes salinas, enquanto que dentro da tabela listam-se os contatos hidrofóbicos e suas respectivas distâncias. n.m., resíduo não mostrado na figura.

É bastante curiosa a forma como esta parte do *hinge* mimetiza quase perfeitamente o peptídeo coativador. É fato que esta pequena região tem um caráter anfipático, assim como o tem a hélice de GRIP1. A princípio pode-se pensar em uma coincidência estrutural que tenha permitido que esta interação entre monômeros aconteça. Entretanto, sabe-se que um mutante de TR descrito em galinha, o qual é truncado e não apresenta os domínios N-terminal e DBD (truncamento no aminoácido 120, equivalente ao aminoácido 176 no TR β 1 de humano), é capaz de inibir *in vivo* a atividade transcricional do receptor selvagem^{167, 218}. A detecção da interação entre monômeros descrita aqui levanta a possibilidade de um monômero truncado, apresentado o domínio LBD e o *hinge*, poder inibir a atividade transcricional de um receptor selvagem via complexação com o sítio de interação de CoAs.

Outra observação interessante é a de que a região *hinge* está envolvida, entre os receptores de uma maneira geral, no contato com correpressores¹⁶. Estudos com o mutante v-erbA, o qual atua como um repressor constitutivo, identificou, entre outros, um subdomínio na região *hinge* importante para a interação com o CoRs. Este subdomínio contém a seqüência homóloga à presente na hélice aqui descrita que faz o

contato entre os monômeros³⁰⁷. Levanta-se então a hipótese de que, *in vivo*, esta região do *hinge* estaria de fato ocupada por contatos com CoRs.

Outra possibilidade é a de que, no contexto de homodímeros da proteína completa, o caráter anfipático desta porção do *hinge* promova interações hidrofóbicas simétricas entre os monômeros, podendo ser esta uma superfície de dimerização ainda não descrita em TR.

³⁰⁷ Busch, K., Martin, B., Baniahmad, A., Renkawitz, R., and Muller, M. (1997) *Mol. Endocrinol.* 11:379-89.

4.3. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Obteve-se com os estudos descritos neste capítulo estruturas cristalográficas do hTR β 1 LBD complexado com diferentes ligantes, além de ter-se estabelecido a técnica de produção e cristalização desta isoforma. Em paralelo, o grupo também realizou a cristalização e resolução das estruturas da isoforma hTR α 1 com diversos ligantes (**Anexo 4**).

A combinação dos dados sobre as interações moleculares importantes para associação das diferentes isoformas com os ligantes promete desvendar detalhes sobre os mecanismos da ação seletiva, e promover as bases para o desenvolvimento de novos tiromiméticos. Além disto, as estruturas dos LBDs podem ser empregadas na procura de novos compostos utilizando-se banco de dados virtuais.

Deve-se insistir na cristalização do heterodímero TR/RXR devido à importância deste heterodímero para a função do receptor TR. Ainda há muito que explorar em termos de condições de cristalização, podendo-se ainda pensar em outros processos de purificação para o heterodímero, além de maneiras mais adequadas para se aferir a homogeneidade das purificações.

Além disto, seria também muito interessante conhecer a estrutura do domínio LBD na forma *apo*, informação que traria resposta a muitas perguntas. De certo este domínio é bastante instável na ausência de ligante e poderia se pensar em artifícios para torná-lo mais estável, como soluções mais adequadas ou até a presença de outras proteínas, como as histonas, que reconhecidamente aumentam a estabilidade deste receptor quando na ausência de hormônio.

Por fim, pode se investir no entendimento funcional do contato entre o *hinge* e o sítio de CoAs encontrado nos estudos cristalográficos. Neste intuito, uma possibilidade seria a de gerar mutações nos resíduos envolvidos no contato e monitorar alterações no padrão de ação do receptor, tanto *in vivo*, quanto *in vitro*, como propriedades de dimerização e associação à DNA, assim como ativação da transcrição.

Anexo 1

Low Resolution Structures of the Retinoid X Receptor DNA-binding and Ligand-binding Domains Revealed by Synchrotron X-ray Solution Scattering*

Received for publication, July 11, 2002, and in revised form, December 4, 2002
Published, JBC Papers in Press, January 17, 2003, DOI 10.1074/jbc.M206953200

Hannes Fischer†§¶, Sandra M. G. Dias†¶, Maria A. M. Santos‡, Adriana C. Alves||, Nilson Zanchin||, Aldo F. Craievich§, James W. Apriletti**, John D. Baxter***, Paul Webb**, Francisco A. R. Neves§§, Ralff C. J. Ribeiro†§§, and Igor Polikarpov‡¶¶

From the †Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, Av. Trabalhador São Carlense, 400 São Carlos, SP, Brazil 13560-970, the §Instituto de Física, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil 05508-900, the ||Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, Campinas, SP, Brazil 13084-971, the **Diabetes Center, Metabolic Research Unit, and the Department of Medicine, University of California San Francisco, San Francisco, California 94143, and the §§Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil 70900-910

Nuclear receptors are ligand-inducible transcription factors that share structurally related DNA-binding (DBD) and ligand-binding (LBD) domains. Biochemical and structural studies have revealed the modular nature of DBD and LBD. Nevertheless, the domains function in concert *in vivo*. While high-resolution crystal structures of nuclear receptor DBDs and LBDs are available, there are no x-ray structural studies of nuclear receptor proteins containing multiple domains. We report the solution structures of the human retinoid X receptor DBD-LBD (hRXR α Δ AB) region. We obtained *ab initio* shapes of hRXR α Δ AB dimer and tetramer to 3.3 and 1.7 nm resolutions, respectively, and established the position and orientation of the DBD and LBD by fitting atomic coordinates of hRXR α DBD and LBD. The dimer is U-shaped with DBDs spaced at $\sim$ 2 nm in a head to head orientation forming an angle of about 10° with respect to each other and with an extensive interface area provided by the LBD. The tetramer is a more elongated X-shaped molecule formed by two dimers in head to head arrangement in which the DBDs are extended from the structure and spaced at about 6 nm. The close proximity of DBDs in dimers may facilitate homodimer formation on DNA; however, for the homodimer to bind to a DNA element containing two directly repeated half-sites, one of the DBDs would need to rotate with respect to the other element. By contrast, the separation of DBDs in the tetramers may account for their decreased ability to recognize DNA.

The nuclear receptor gene family in humans consists of at least 48 structurally related proteins that regulate transcription of target genes (1). These include receptors for the steroid and thyroid hormones, retinoids, vitamin D, prostaglandins, fatty acids, and unknown ligands, the orphan receptors. Nuclear receptors are comprised of single polypeptide chains that contain modular domains (2–4). The N termini of the receptors, which are the most variable in length, have transcription transactivation functions. The centrally placed and highly conserved DNA-binding domain (DBD)¹ directs receptor binding to DNA and is also involved in dimerization. The carboxyl-terminal ligand-binding domain (LBD) binds the ligand and undergoes ligand-induced conformational changes that promote dissociation of corepressors and association of coactivators that mediate receptor-induced changes in transcriptional control. The LBD also participates in receptor homodimerization, heterodimerization, and oligomerization (5, 6).

Retinoids exert multiple effects on morphogenesis and differentiation in fetal and adult organs and regulate glucose and lipid homeostasis. They also act as potent inhibitors of oncogenesis in rodent models and are used as chemo-preventive and therapeutic agents in several types of cancers in humans (7–12). In mice retinoid X receptor (RXR) selective agonists function as insulin sensitizers and can decrease hyperglycemia, hypertriglyceridemia, and hyperinsulinemia (13). The three RXR isoforms (α , β , and γ) bind to 9-cis retinoic acid and can function either as homodimers or heterodimers with many other members of the nuclear receptor family, including the receptors for thyroid hormones (TRs), vitamin D, and the peroxisome proliferator-activated receptors. RXR homodimers bind preferentially to direct repeats (DRs) of the AGGTCA half-site spaced by one nucleotide (DR-1), whereas heterodimers with peroxisome proliferator-activated receptors, vitamin D receptors, TRs, and retinoic acid receptors bind to DRs spaced by 1, 3, 4, or 5 nucleotides, respectively.

The RXR has been reported to exist either as a mixed population of monomers, dimers, and tetramers (14) or monomers and tetramers (15) in solution. In the absence of ligand, the values for K_d monomer $\rightarrow$ dimer and K_d dimer $\rightarrow$ tetramer are 130 and 2.8 nM, respectively, as calculated from fluorescence anisotropy

* This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) Grants 333991-2 (to R. C. J. R.) and 300220/96-0 (to I. P.), Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico Grant 333449-x (to R. C. J. R.), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) Grants 99/03387-4, 00/00021-8, and 99/09471-7, and National Institutes of Health Grants DK41842 and DK09516 (to J. D. B.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

† Deceased.

¶ Both authors contributed equally to this work.

‡ Has proprietary interests in, and serves as a consultant and Deputy Director to, Karo Bio AB, which has commercial interests in this area of research.

|| To whom correspondence should be addressed: Dept. de Física e Informática, Universidade de São Paulo, Av. Trabalhador São Carlense 400, São Carlos, SP, Brazil 13560-970. Tel.: 55-16-273-8088; Fax: 55-16-273-9881; E-mail: IPolikarpov@ifsc.usp.br.

¹ The abbreviations used are: DBD, DNA-binding domain; LBD, ligand-binding domain; RXR, retinoid X receptor; TRs, thyroid receptors; DRs, direct repeats; SAXS, small-angle x-ray scattering; DTT, dithiothreitol; DAM, dummy atom model; CRBP, cellular retinol-binding protein.

titration studies, indicating that in this setting tetramer formation is favored (14). Addition of ligand to tetramers in solution leads to their rapid dissociation to form homodimers (14, 15). Moreover, unliganded RXR dimers bind DR-1 relatively strongly, but the tetramers do not. Addition of DR-1 DNA to tetramer-containing solutions leads to formation of dimers. Thus, both ligand and the RXR cognate DNA element shift the dynamic equilibrium between RXR tetramer and dimer so that dimer formation is enhanced.

A large number of isolated nuclear receptor DBD and LBD structures have been obtained in crystal and in solution. The RXR α DBD has been solved in complexes with DNA as homodimers and as heterodimers with the TR DBD and retinoic acid receptor DBD (16–18). The RXR homodimer DBD binds to the DR-1 element as a head to tail dimer. The distance between the DR-1 half-site sequences is ~ 3 nm, and part of the α -helix connecting DBDs to LBD (T-box) unwinds allowing efficient DNA binding and DBD dimerization (18). RXR LBDs have been crystallized in a variety of forms, including dimers and tetramers (19–23). The LBDs are mostly α -helical with the ligand buried in the interior of the holo-receptor and contributing to formation of the hydrophobic core of the protein. There are significant structural differences between the RXR LBD apo- and holo-forms. In particular, transactivation helix (H12) protrudes from the body of the receptor in the absence of ligand, but packs against the body of receptor in its presence (19, 20, 24, 25). This repositioning of H12 completes formation of a hydrophobic cleft that also contains residues of H3, 4, and 5 and forms a docking site for LXXLL motifs in nuclear receptor coactivators. The RXR LBD dimer interface overlaps residues from the intersection of helices 7, 9, and 10 (21) and corresponds to the position of the TR homo- and heterodimerization interface as defined by site-directed mutagenesis (26). A crystal structure of an RXR-LBD tetramer, along with solution x-ray scattering studies of the same oligomer (21, 22), reveals that it consists of a head to head “dimer of dimers” with a large (2750 Å²) interface comprised of residues from H3, H11, and H12 (discussed further below). This extensive tetramer interface is thought to contribute to the marked stability of this oligomer (27). Comparison of the liganded homodimer structure with the tetramer structure also suggests a reason for the observed ligand-dependent dissociation of tetramers to dimer pairs. Each of the constituent LBDs of the tetramer adopts the typical apo-receptor conformation, in which H12 protrudes from the body of the LBD but then, instead of protruding away from the receptor, actually docks into the H3-H5 hydrophobic cleft region in the adjacent dimer utilizing its LMEDL sequence that resembles the coactivator LXXLL motif (21). Since ligand repositions H12, addition of ligand to tetramers would be expected to remove this part of the interdimer interface and destabilize the tetramer.

While each of these crystal structures has provided major insights into receptor function, it will be necessary to understand the relationships between distinct receptor domains to completely understand how nuclear receptors work. For example, it is not clear why the RXR dimer binds DR-1 elements with higher affinity than the tetramer. The structures of any nuclear receptor containing multiple domains have not yet been solved. In this study, we report the structural organization of a hRXR protein containing the linked DBD and LBD (hRXR α ΔAB) as revealed by solution synchrotron x-ray scattering studies. We used the available crystallographic structures of the isolated hRXR α DBD and LBD domains to place them inside low resolution *ab initio* small-angle x-ray scattering (SAXS) models, which allowed us to assemble models of both a dimer and a tetramer of hRXR α ΔAB. The results show

that the dimer is a U-shaped molecule with the two DBDs in close proximity (2 nm) forming the tips of the U and separated by an angle of 10°. By contrast, the tetramer is a more elongated X-shaped molecule formed by two dimers in head to head arrangement in which the DBDs are extended from the structure and further apart (6 nm) than in the dimer configuration and are separated by an angle of $\sim 30^\circ$. These solution structures represent the first x-ray structural studies of nuclear receptors that contain more than one domain and may explain why RXR dimers recognize target genes with higher affinity than tetramers.

MATERIALS AND METHODS

Protein Expression and Purification—The hRXR α ΔAB construct encompassing amino acid residues 126–462 was overexpressed in *Escherichia coli* cells from strain BL21(DE3) harboring a pET28a(+) plasmid (Novagen). A Luria broth (LB) starter culture was inoculated with a single colony of a LB-agar culture and grown overnight at 37 °C. The initial culture was inoculated at 1% in a 2 $\times$ YT culture (1.6% tryptone, 1% yeast extract, 0.5% NaCl w/v) and grown at 37 °C in 50 μ g/ml kanamycin medium until $A_{600\text{ nm}}$ reached 0.8. Then 5 μ M of zinc sulfate and 0.5 mM isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside was added, and the culture was allowed to grow for 2 h of incubation at 37 °C. After this cells were harvested by centrifugation, and the pellets were resuspended in 10 ml/liter culture of buffer A (50 mM sodium phosphate, pH 7.5, 100 mM NaCl, 10% glycerol, 2 mM 2-mercaptoethanol, and 10 mM imidazole). Phenylmethylsulfonyl fluoride and lysozyme were added to 1 mM and 220 μ g/ml, respectively, and the culture was placed on ice for 30 min. The lysate was sonicated for six times in 1-min intervals (power 40, Branson Sonifier 450), keeping the culture on ice, and then clarified by centrifugation for 1 h at 20,000 rpm in a Sorval SS34 rotor. The supernatant was loaded onto a 1.5-ml (per liter culture) Talon Superflow Metal Affinity Resin (Clontech) packed in a c10/10 column (Amersham Biosciences) and equilibrated in buffer A (flow rate 70 cm/h). The column was washed with buffer A, until the $A_{280\text{ nm}}$ of the eluent returned to baseline, and then subsequently with buffer B (50 mM sodium phosphate, pH 7.5, 300 mM NaCl, 10% glycerol, 2 mM 2-mercaptoethanol, and 10 mM imidazole). Then, buffer A was applied until the conductivity returned to that expected for the buffer A. The protein was eluted with buffer C (50 mM sodium phosphate, pH 7.5, 100 mM NaCl, 10% glycerol, 2 mM 2-mercaptoethanol, and 300 mM imidazole). Fractions containing hRXR α ΔAB were pooled, diluted 1:1 with a buffer of 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10% glycerol, 5 mM DTT (dithiothreitol), and 0.5 mM EDTA. The fractions were then loaded onto Q-Sepharose High Performance Resin (7 ml, Amersham Biosciences) and packed in a c10/10 column (Amersham Biosciences) (1 $\times$ 10 cm, flow rate 70 cm/h) that had been pre-equilibrated with this same buffer (plus 50 mM NaCl). The column was then washed with 10 ml of a buffer of 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM NaCl, 10% glycerol, 5 mM DTT, and 0.5 mM EDTA to remove unbound protein and eluted with a gradient of 50–500 mM NaCl. The protein eluted in two peaks, and the fractions of each peak were pooled and concentrated. Protein content and purity of all chromatographic fractions were checked by Coomassie Blue-stained SDS gels. Protein concentrations were determined in parallel using the Bio-Rad dye assay and bovine serum albumin as standard.

Size Exclusion Chromatography and Dynamic Light Scattering Experiments—The protein oligomerization state was assessed by size exclusion chromatography and dynamic light scattering. Each of two protein elution peaks was separately concentrated and loaded onto a Superdex 200 size exclusion column (1 $\times$ 30 cm, Amersham Biosciences). The column was pre-equilibrated with a buffer of 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 200 mM NaCl, and 5 mM DTT at a flow rate of 0.5 ml/min and standardized with the molecular mass calibration kit (Amersham Biosciences) using 100 μ l of protein standard samples of a known Stokes radii (thyroglobulin, 8.5 nm; ferritin, 6.1 nm; catalase, 5.22 nm; aldolase, 4.81 nm; bovine serum albumin, 3.55 nm; ovalbumin, 3.05 nm; chymotrypsinogen, 2.09 nm, and ribonuclease A, 1.64 nm). The different oligomeric forms of RXR α ΔAB receptor were analyzed under the same conditions. The initial protein concentrations of 2.2, 5.6, and 12.3 mg/ml (peak 1) and 3, 8.2, and 11 mg/ml (peak 2) were studied.

Dynamic light scattering measurements were performed with a DynaPro MS200 instrument (Protein Solutions) at 4 °C using a 12- μ l cuvette. The protein samples were concentrated to 1.17 and 7 mg/ml (separately peak 1 and peak 2) in 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 200 mM NaCl, 10% glycerol, and 5 mM DTT prior to measurements.

Small-angle X-ray Scattering Measurements and Data Analysis—SAXS data were collected at the small-angle scattering beamline on the LNLS (National Synchrotron Light Laboratory, Campinas, Brazil) using one-dimensional position-sensitive detector (28). hRXR α at the concentrations 2, 3.1, 6.3, and 14 mg/ml was measured at a wavelength $\lambda = 0.138$ nm for sample-detector distances of 632.5 and 1345.2 mm covering the momentum transfer range $0.1 < q < 6$ nm $^{-1}$ ($q = 4\pi\sin\theta/\lambda$, where 2θ is the scattering angle). The scattering curves of the protein solutions and the corresponding solvents were collected in a number of short 30-s to 1-min frames to monitor radiation damage and beam stability. The data were normalized to the intensity of the incident beam and corrected for detector response.

The scattering of the buffer was subtracted, and the difference curves were scaled for concentration. The distance distribution functions $p(r)$ and the radii of gyration R_g were evaluated by the indirect Fourier transform program GNOM (29). The molecular masses of the oligomers of hRXR α in solution were estimated by comparison of the extrapolated forward scattering $I(0)$ with that of a reference solution of bovine serum albumin with a known molecular mass of 66 kDa. Prior to the shape analysis, a constant was subtracted from the experimental data to ensure that the intensity at higher angles decays as q^{-4} following Porod's law for the homogeneous particles (30). The value of the constant is derived automatically from the outer part of the curve by linear fitting in coordinates $q^4 I(0)$ versus q^4 by the shape determination program DAMMIN (31). This procedure reduces the contribution from scattering due to the internal protein structure and yields an approximation of the "shape scattering" curve (*i.e.* scattering from the excluded volume of particle filled by constant density).

The experimental pair distribution functions do not contain any negative part, which is an indication of the absence of interference effects in the scattering curves produced by spatial correlations. This argues that all solutions were sufficiently dilute to remove interference effects. The structure function that describes interparticle correlations may be equal to unity even at high concentrations for proteins of very anisotropic shape (32).

Shape Determination—Low resolution particle shapes were restored from the experimental SAXS data using two *ab initio* procedures. In the first procedure (33, 34), the shape is represented by an angular envelope function, parameterized in terms of spherical harmonics using multipole expansion methods (35). The maximum number of the spherical harmonics L is selected to keep the number of free parameters $M = (L + 1) - 6$ close to the number of Shannon channels $N_s = D_{\max} q_{\max} / \pi$ in the experimental data (36).

The computed scattering intensity of the envelope is compared with the experimentally obtained one. The envelope is modified by minimizing the discrepancy χ between the calculated and the experimental data (36, 37). The discrepancy χ is defined in Equation 1,

$$\chi = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{j=1}^N \left[\frac{I(q_j) - I_{\exp}(q_j)}{\sigma(q_j)} \right]^2} \quad (\text{Eq. 1})$$

where N is a number of the experimental points and $I_{\exp}(q_j)$ is the experimental intensity and $\sigma(q_j)$ is its standard deviation in the j th point.

The shapes of the hRXR α dimers and tetramers were also restored from the experimental data using another *ab initio* method as implemented in DAMMIN (31). A sphere of diameter $D_{\max}$ was filled by a regular grid of points corresponding to a dense hexagonal packing of small spheres (dummy atoms) of radius $r_0 \ll D_{\max}$. The structure of the dummy atom model (DAM) is defined by a configuration X , assigning an index to each atom corresponding to solvent (0) or solute particle (1). The method searches for a compact interconnected configuration X , minimizing the goal function in Equation 2,

$$f(X) = \chi^2 + \alpha P(X) \quad (\text{Eq. 2})$$

where $\alpha > 0$ is the weight of the looseness penalty (31). Starting from the initial spherical configuration, simulated annealing is employed for the minimization (31).

Both models assume that the protein structure in solution can be described by a constant electron density over its whole volume. However, short range fluctuations in electronic density that exist inside the proteins actually yield a constant contribution at small q . To apply SASHA and DAMMIN this constant contribution should be previously subtracted from the experimental scattering curves. The assumption of a two-electron density model (corresponding to the protein and the

solvent) is progressively weaker for increasing q outside the range covered in the present measurements.

The coordinate sets for both hRXR α LBD and DBD domains were obtained from Protein Data Bank (PDB accession numbers 1GIU and 2NLL) (16, 19). Relative positions of the LBD and DBD domains were found by iterative rotation of their envelope functions to minimize the discrepancy with the *ab initio* low resolution structure using an automated procedure. The models were displayed using the program MASSHA (38). Radii of gyration (R_g), maximum intraparticle distances ($D_{\max}$), envelop functions, and scattering curves, were calculated from these atomic coordinates with use of the program CRY SOL taking into account the influence of the hydration shell (39). SUPCOMB (40) was used to superimpose *ab initio* low resolution models with crystallographic structures.

RESULTS

SAXS Measurements of hRXR α DBD-LBD Dimers and Tetramers—The bacterially expressed hRXR α ΔAB preparation eluted from the Q-Sepharose high performance resin ion exchange column in two peaks (1 and 2; see "Material and Methods"). The protein of both chromatographic fractions migrated on SDS-polyacrylamide gels at a molecular weight that is consistent with hRXR α ΔAB region at high purity (>95%; "Material and Methods"). Thus, our preparation of hRXR α ΔAB exists in two distinct forms. To assess the structural organization of the hRXR α ΔAB in solution, separate synchrotron SAXS measurements were performed on each peak. Experimental scattering curves from hRXR α are presented in Fig. 1, and the structural parameters derived from these curves are given in Table I.

The hRXR α ΔAB oligomers eluted in peaks 1 and 2 correspond to molecular masses of 79 and 185 kDa, respectively, as determined in SAXS experiments by comparison with a reference solution of bovine serum albumin (Table I). This suggests that peaks 1 and 2 are composed respectively of hRXR α ΔAB dimers and tetramers. Further support for this finding comes from the size exclusion chromatography analysis (Fig. 2). Peak 1 protein Stokes radius was equal to 4.48 and 4.66 nm at protein concentrations of 5.6 and 12.3 mg/ml, respectively. Peak 2 protein Stokes radius varied from 5.2 to 5.7 nm at several protein concentrations between 3 and 11 mg/ml. Dynamic light scattering experiments conducted on peak 1 and peak 2 fractions at the concentrations 1.2 and 7 mg/ml gave, respectively, experimental Stokes radii of 4.42 and 4.3 nm for peak 1 and 5.13 and 5.42 nm for peak 2. These results are both consistent with the idea that peaks 1 and 2 represent dimer and tetramer, respectively. Determinations of Stokes radius from size exclusion chromatography and dynamic light scattering agree with Stokes radii calculated from proposed low resolution SAXS models of the hRXR α ΔAB dimer and tetramer (see below), which are 4.15 nm for dimer and 5.6 nm for tetramer (41).

Concentration of the protein from peak 1 from 3 to 14 mg/ml yielded SAXS curves that were virtually identical to the SAXS data of the protein from the elution peak 2 at similar concentration (data not shown). This suggests that the hRXR α ΔAB dimer population in peak 1 can be converted to a tetramer population at high protein concentration and is consistent with the previous idea that the DBD-LBD dimer and tetramer populations are in dynamic equilibrium that is influenced by protein concentration (14, 15).

The experimental values of $D_{\max}$ and R_g , 19 and 5.27 nm for the tetramer and 11.5 and 3.38 nm for the dimer, respectively, suggest that the protein in both peaks is rather elongated (Table I). The profiles of the distance distribution function $p(r)$ in Fig. 3 are typical for elongated particles (42). Nevertheless, the $D_{\max}$ of the tetramer (19 nm) is 7.5 nm larger than the dimer (11.5 nm), which indicates that the tetramer is more elongated than the dimer.

FIG. 1. **Experimental solution scattering curves of hRXR α ΔAB and results of the fitting procedures.** *a*, dimer. *b*, hRXR α ΔAB tetramer. Above, log I versus q focusing on the fitting of the experimental curve at high q . Below, details of the same curve at small q in linear scale with an inset containing the correspondent Guinier plots (log I versus q^2). (1), experimental curve; (2) experimental curve after subtraction of a constant value as described under “Materials and Methods”; (3) scattering intensity from the DAMs (DAMMIN); (4) scattering intensity from the envelope model (SASHA).

TABLE I
Structural parameters derived from SAXS data

Parameter/Sample	hRXR α dimer			hRXR α tetramer		
	Exp. ^a	Env. ^b	DAM ^c	Exp.	Env.	DAM
Mass (kDa)	79 (5)			185 (10)		
$D_{\max}$ (nm)	11.5 (5)	12.0	11.0 (2)	19 (1)	20	18 (2)
R_g (nm)	3.38 (5)	3.41	3.36 (1)	5.27 (4)	5.27	5.2 (2)
V (nm ³)	105	151	119 (5) ^d	246	338	285 (3)
Free parameters	6.7 ^e	13 ^d	2718	14.1 ^e	31 ^f	3884
Discrepancy χ		0.57	1.32 (1)		0.99	1.30 (2)
Resolution (nm)	3.0	3.3	3.0	1.05	2	2.1

^a Exp., calculated from the experimental data.

^b Env., parameters of the envelope models.

^c DAM, parameters of the dummy atoms models averaged over 10 models.

^d Symmetry P2 imposed.

^e Number of Shannon channels is given.

^f Symmetry P222 imposed.

Ab Initio Shape Determination Using Envelope Functions (SASHA)—Shape determinations of the hRXR α dimer and the hRXR α tetramer were performed using multipole expansion methods. The experimental data were fitted *ab initio* by the scattering from an envelope function starting from a spherical initial approximation (33, 34). The envelopes were represented with spherical harmonics up to $L = 4$ (13 independent parameters) and $L = 10$ (31 independent parameters) for dimer and tetramer, respectively. This was justified by the

fact that the portions of the scattering curves used for *ab initio* shape determination using the envelope functions contained $N_s = 6.7$ Shannon channels for hRXR α dimer and $N_s = 14.1$ Shannon channels for hRXR α tetramer. The P2 symmetry was imposed in the case of dimer and P222 in the case of tetramer.

The restored envelope for the dimer is displayed in Fig. 4, and the fits to experimental data presented in Fig. 1. The crystallographic models of hRXR α LBD homodimer and two

FIG. 2. **Representative size exclusion chromatograms of peak 1 and peak 2 protein fractions.** RXR α AB from Q-Sepharose peak 1 and peak 2 elution fractions at initial concentrations of 5.6 and 8.2 mg/ml, respectively, were loaded onto size exclusion Superdex HR200 10/30 column (Amersham Biosciences). Respective elution profiles are shown as a dashed line (peak 1) and a solid line (peak 2). The value at the top of each peak eluted from size exclusion column corresponds to the elution volume of the RXR α AB. The presence of the receptor in these peaks was confirmed by SDS-electrophoresis (data not shown). The elution volumes were used to calculate the K_{av} values ($K_{av} = (\text{elution volume} - \text{column void volume}) / (\text{column total volume} - \text{column void volume})$). The value of $\sqrt{-\log K_{av}}$ was used to determine the Stokes radius for each peak from the column calibration plot (shown as an inset). The column calibration plot was obtained eluting the protein standards of known Stokes radii. Thyroglobulin, ferritin, catalase, aldolase, albumin, ovalbumin, chymotrypsinogen, and ribonuclease with the correspondent Stokes radii of 8.5, 6.1, 5.22, 4.81, 3.55, 3.05, 2.09, and 1.64 nm, respectively, were employed.

FIG. 3. **Distance distribution functions of the hRXR α ΔAB dimer and tetramer.** Distance distribution functions of hRXR α ΔAB dimer and tetramer are given in hollow circles and filled circles, respectively.

hRXR α DBD fragments could be unambiguously positioned inside the envelope for the hRXR α dimer. The restored envelope for the tetramer is displayed in Fig. 5, and fits to the experimental data are displayed in Fig. 1. By contrast to the dimer, one hRXR α LBD tetramer and four hRXR α DBD fragments fit an envelope for the hRXR α tetramer. Two models of the hRXR α LBD dimers obtained by superposition of the crystallographic structures with *ab initio* hRXR α dimer structure were placed within the tetramer *ab initio* models allowing for their relative rotation and translation around common 2-fold

axis and adjustment of a relative orientation of the DBDs. This superposition fits the *ab initio* retrieved low resolution tetramer structure. Stokes radii calculated on the basis of retrieved low resolution structures of dimer and tetramer is equal to 4.15 and 5.6 nm, respectively (41). These values agree with experimental values observed for dimer and tetramer populations in size exclusion chromatography and dynamic light scattering.

Ab Initio Shape Determination Using DAM Technique (DAM-MIN)—The particle shapes were also computed by the second *ab initio* procedure using the DAMMIN program (31). In this method, a sphere of diameter $D_{\max}$ is filled with densely packed small spheres (dummy atoms) with radius $r_0 \ll D_{\max}$. The method searches to minimize differences between experimentally determined scattering curves and those calculated from DAM models using simulated annealing algorithm. The “looseness” penalty term ensures that the procedure yields a compact and interconnected model. The models were derived from the experimental data assuming a 2-fold symmetry for the dimer and p222 symmetry for the tetramer. The symmetry restrictions resulted in a significant reduction in the number of free parameters of the models. The search volume for hRXR α dimer has been filled with $N_{\text{DAM}} = 2718$ dummy atoms with a packing radius $r_a = 0.375$ nm within a sphere with the diameter $D_{\max} = 11.5$ nm. The search volumes for hRXR α tetramer have been filled with $N_{\text{DAM}} = 3884$ dummy atoms with a packing radius $r_a = 0.575$ nm within a sphere with the diameter $D_{\max} = 20.0$ nm. Forty independent *ab initio* simulations were performed. Of those, 395 ± 10 dummy atoms were attributed to the final model of hRXR α dimer, and 265 ± 5 atoms were assigned to the final model of the hRXR α tetramer.

The obtained DAMs are presented in Figs. 4 and 5. DAM-derived structure parameters also agree with the experimental values (Table I). To verify the uniqueness of the shape restoration using DAM, several independent restorations were performed using different starting conditions yielding reproducible results. Maximum concentrations of the protein used for SAXS solution studies of the hRXR α dimer (3.1 mg/ml) and the hRXR α tetramer (14 mg/ml) limited the maximum resolution of the final models to 3.0 and 2.1 nm, respectively (Table I). These resolutions do not permit unambiguous determination of the spatial positions of their secondary structure elements, but allowed us to obtain the overall shape of the molecules and relative position of their individual domains.

hRXR α Dimer and Tetramer Solution Structure—The best fitting SAXS hRXR α ΔAB dimer model, constructed as described in the preceding two sections, is shown in Fig. 4. The dimer is an anisometric U-like-shaped molecule with two clearly developed substructures that correspond to homodimers of the LBD and DBD. The two LBDs form the plate-like base of the U, and each LBD is connected by a long α -helical peptide, protruding like an arm, to its DBDs placed at the extreme of the U (Fig. 4). The LBDs dimerize through the interface described in the hRXR α crystal structure (19, 20), involving contacts between H9 and H10. The two long α -helices connecting LBDs to DBDs are slightly twisted around the 2-fold symmetry axis of the molecule. The DBDs form an angle of ~ 10 degrees in and out of plane of the LBDs but adopt a position that is relatively close together in a head to head orientation. The distance between the DBDs in solution is slightly over 2 nm, which is comparable to the distance between half-sites of a DR-1 element (3 nm). However, since these are placed in a head to head orientation, rotation of one of the DBDs by about 180° would be required for the homodimer to bind to a DR-1 element. Assuming that this rotation could occur, the data are consistent with the notion that the

FIG. 4. SAXS hRXR α Δ AB dimer envelopes derived from *ab initio* calculations. *a*, upper row shows a superposition of the envelop model computed by SASHA (34) to the average of ten DAMs obtained by DAMMIN (31), and the lower row represent the superposition of the same ten DAMs to the x-ray structure of the hRXR α LBD dimer (21) and two hRXR α DBDs (23). Grid space is 2 nm. *b* and *c* are the same model rotated counterclockwise by 90° around the *z*- and *y*-axes, respectively.

hRXR α Δ AB homodimer that we observe in solution is capable of binding to its cognate DNA response element.

The hRXR α tetramer is an oblate and more elongated X-shaped molecule (Fig. 5 and Table I). Like the dimer, the tetramer contains well developed substructures that correspond to the LBDs and DBDs (Fig. 5). However, in the tetramer, the LBDs comprise the center of the molecule and the four DBDs protrude from the center. The relative position of the LBDs is consistent with previous crystallographic and solution studies of the hRXR α LBDs, which show that the tetramer is composed of a dimer of dimers where the LBDs of one dimer are in head to head arrangement with the LBDs of the other dimer. To fit better experimental scattering curves we allowed for relative rotation of homodimers around their 2-fold symmetry axis and for adjustment of the distance between their centers of masses. The model is consistent with the idea that individual dimer pairs utilize the previously defined interface that overlaps the intersection of H9 and H10 and that the extensive tetramerization interface utilizes interactions between H3-H3, H11-H11, and H12 with the H3-H5 hydrophobic cleft region in the adjacent dimer (21), although limited resolution of SAXS models does not allowed detailed description (Fig. 5). However, in striking contrast to the DBD-LBD homodimers, the DBDs of the tetramer were not close together (Figs. 4 and 5). Individual distances between the DBDs of each dimer pair were 6 nm. This suggests that the DBDs of the RXR tetramer would not be able to interact with the DR-1 element without significant conformational changes. Thus, the x-ray solution studies of the RXR tetramer present an explanation why it may not bind well to DNA.

DISCUSSION

Small-angle x-ray scattering analyses yield data that permits assembly of structural models of protein in solution. The technique has some obvious disadvantages, especially relative to x-ray crystallography. First, the data is collected at relatively low resolution (nm range relative to angstrom range) and therefore does not permit accurate determinations of the position of individual amino acids and their side chains within the structure. Second, the technique relies on modeling of relatively low amounts of data and therefore depends upon assumptions about the tertiary and quaternary structure of the protein and internal symmetries of the overall structure (see "Materials and Methods"). Should these assumptions prove incorrect, then the deduced structures may prove to be inaccurate. Nevertheless, the technique is useful for less detailed descriptions of overall protein conformations and, further, can be used in conjunction with published high resolution crystal structures to infer the likely conformation of proteins in solution. In this sense, small-angle scattering may have some advantages over x-ray crystallography, which provides a high resolution "snapshot" of a particular conformation within a crystal lattice, which might be influenced by the crystal packing and can not always be readily interpreted in terms of the oligomeric units of the protein in solution.

In this study, we reported low resolution synchrotron small-angle scattering structures of unliganded hRXR α Δ AB oligomers. We employed two independent *ab initio* shape restoration methods to obtain a molecular envelope of RXR α in its dimeric and tetrameric forms to 3.0 and 2.1 nm, respectively. The two *ab initio* shape restoration methods differ in that

FIG. 5. SAXS hRXR α Δ AB tetramer models obtained by two independent *ab initio* approaches. *a*, upper row shows a superposition of the envelop model obtained by SASHA (34) to the average of ten DAM calculated by DAMMIN (31), and the lower row represents the superposition of the same ten DAM to the x-ray structure of the hRXR α LBD tetramer (21) and four hRXR α DBDs (23). Grid space is 2 nm. *b* and *c* are the same model rotated counterclockwise by 90° around the *z*- and *y*-axes, respectively.

SASHA modeling yields an overall molecular envelope, whereas DAMMIN modeling provides a dummy atoms model. Figs. 4 and 5 demonstrate that the dummy atoms derived from the DAMMIN model are highly dense inside the envelope derived from the SASHA model, whereas density of dummy atoms outside it is low. Given the differences in the number of adjustable parameters (Table I), the methods therefore agree well within the limits imposed by the intrinsically low resolution of SAXS. Our models for dimer and tetramer forms indicate that both oligomers are relatively elongated and further suggest that the dimer adopts an oblate conformation, whereas the tetramer adopts an X-shaped conformation. The Stokes radii computed on the basis of the proposed low resolution models for both oligomers agrees well with the experimental measurements of Stokes radii independently obtained by size exclusion chromatography and dynamic light scattering studies (see “Results”), providing independent biochemical verification of our models.

In an attempt to understand the divergent nature of the dimer and tetramer shapes, we positioned published crystallographic models of the hRXR α DBD fragment (23) and hRXR α LBD homodimers/homotetramers (21) within the *ab initio* dimer and tetramer structures. Internal P2 and P222 symmetries were imposed in the case of the dimer and the tetramer, respectively (Figs. 4 and 5). These symmetries correspond to the internal symmetry of the previously determined RXR α LBD crystal structure (21) and were also previously confirmed by solution scattering studies of the same LBD protein (20). Given these constraints, the crystallographic models show a relatively good fit into the dimer and tetramer envelopes. The likeliest hRXR α Δ AB dimer conformation is a U-shaped struc-

ture with the two DBDs occupying the tips of both arms of the U. The DBDs are closely positioned in such a way that they could contact DNA without major conformational changes of the protein. However, as discussed in the Introduction, RXR homodimers preferentially bind to DR-1 elements containing DNA half-sites spaced as direct repeats. Thus, if the LBDs are dimerized as shown in this structure and by mutational analyses one of the DBDs would have to rotate by ~ 170 – 180° for the homodimer to bind to DNA. Alternatively, the DBD-LBD conformation that is revealed in this structure could bind DNA if one of the DBDs were to bind nonspecifically to one of the half-sites. By contrast, the hRXR α Δ AB tetramer adopts an X-shaped structure in solution. The LBDs are known to tetramerize by forming a head to head arrangement of paired dimers (dimer of dimers) with extensive contacts between H3-H3, H11-H11, and H12 with the coactivator cleft of the neighboring molecule. The likeliest tetramer structure fits the head to head arrangement of LBD homodimers into the middle of the X shape, and the DBDs would occupy the tips of the four points. Interestingly, the DBDs of the tetramer would be widely spaced in this configuration and therefore unlikely to bind DR-1 elements with high affinity without major conformational changes. Thus, we propose that the dimeric and tetrameric forms of the LBD differentially position the RXR DBDs, suggesting that RXR tertiary structure is sensitive to alterations in its quaternary state. These low resolution structures represent the first models proposed for a nuclear receptor containing both a DBD and LBD. Moreover, our models suggest an explanation for the observed inability of the unliganded tetramer to bind to DNA.

Although these results cannot absolutely assure that other

models would not give a better fit, we believe that the obtained solutions must be close to reality. First, the molecular envelopes obtained by two independent shape restoration methods (SASHA and DAMMIN) give similar solutions and the deduced Stokes radii from the models correspond well to the observed Stokes radii. Second, the DBD and LBD crystal structures fit well into the overall molecular envelopes. Third, the maximum dimensions retrieved from the $p(r)$ function impose rather elongated shapes that are hard to explain by alternative placements of RXR LBDs and DBDs without invoking conformations that contradict previous results from high resolution crystallography and molecular genetics. Nevertheless, while the majority of dummy atoms derived from the DAMMIN modeling technique fit into the molecular envelope derived from the SASHA modeling technique, we recognize that there are discrepancies in the placement of some DAMs (Figs. 4a and 5a). These differences could reflect a natural level of error in modeling techniques or uncertainties in the structure of the molecule in solution at these locations. We can not distinguish these possibilities, but it is interesting that the greatest disagreements in the dimer structure lie around the upper part of the LBD around the predicted position of H12 and the greatest disagreements in the tetramer structure lie close to the predicted position of the DBDs. It is intriguing to suggest that these discrepancies between techniques may reflect relative mobility of these regions of the protein in solution.

While solution x-ray studies can tell us that the relative orientation of the LBD and DBD may differ in the dimer and tetramer forms, the relatively low resolution of the structures prevents us from learning why. We suggest that differences in the conformation of the LBDs in the dimer and tetramer form alter the relative position of the H1/hinge region and reposition the DBDs. However, these subtle changes, if they exist, would be too small to be perceived in solution x-ray scattering. Nonetheless, we note that several distinct lines of evidence indicate that nuclear receptor LBDs must be able to influence the behavior of the DBD. For instance, RXR homodimer binding to DR-1 elements is enhanced by hormone. Thus, ligand-induced conformational changes in the LBD must improve the fit between hRXR and DR-1 and increase the affinity of the interaction. Likewise, TR homodimer binding to DR-4 and to an inverted palindromic element (F2) is reduced by hormone (43–45). In the case of TR homodimers, we hypothesize that ligand-induced conformational changes alter the relative position of the TR DBDs and thus reduce the fit of the TR for both types of response element. It will be important to obtain crystal structures of liganded nuclear receptors containing more than one domain and bound to a variety of DNA elements to understand these phenomena.

The dynamic equilibrium between RXR oligomers is influenced by receptor concentrations, ligand, and DNA (14, 15). Thus, it seems plausible that sequestration of RXR in tetramers *in vivo* could provide a mechanism for the cell to store an excess of receptors until physiological functions related to RXR homodimer and heterodimer activities are called into action (14, 15). In addition to the inactivation revealed by the current studies through separation of the RXR DBDs, a second mechanism for inactivation is provided by structural studies of the RXR LBD tetramer (21). In this case, H12 of one receptor binds to the H3-H5 region of the neighboring molecule, an interaction that is partially analogous to the way that coactivator peptides bind to the nuclear receptor hydrophobic cleft. Placement of H12 from one receptor into the H3-H5 region of the other receptor prevents coactivator binding by occluding the hydrophobic cleft. Our recent studies revealed that the TR and RXR hydrophobic cleft also binds the corepressor N-CoR, suggesting

that the orientation of H12 in the tetramer could also occlude the RXR N-CoR interaction surface (46).

While our studies have uncovered possible structures of the unliganded hRXR α Δ AB tetramer, RXR may also be able to form biologically active tetramers in a different configuration. The cellular retinol-binding protein II (CRBP-II) promoter contains two non-optimal DR-1 sites that are poorly recognized by the RXR dimer, suggesting that the RXR tetramer is the active species for controlling expression of CRBP-II (47–49). These data argue that RXR tetramers control gene regulation *in vivo* through cooperative DNA binding to the CRBP-II promoter (47) and to a wide variety of four differently oriented half-sites both *in vitro* and *in vivo* (49). While the interactive surfaces leading to the formation of this type of tetramer are also located in the LBD (49), it is likely that this tetramer is different from the one that we have described here because hormone-dependent activation of CRBP-II gene expression will require coactivator recruitment, which as discussed above would be excluded in the tetramer structure that was used to obtain the model in the current studies. We also stress that our studies exclude the RXR N-terminal domain. RXR α or RXR γ , but not RXR β , can form tetramers cooperatively on the CRBP-II promoter and regulate this gene efficiently (49), and the differences between the isoforms maps to the RXR β N-terminal domain. This suggests the RXR N-terminal domain may play an important role in regulating formation of the active DNA and ligand-dependent tetramer.

In conclusion, the low resolution solution structures for the hRXR α Δ AB region determined in this work provides the first three-dimensional model for the member of the nuclear receptor super family containing more than one functional domain. Our studies suggest a possible explanation for the previously observed differences in DNA binding activity between dimers and tetramers. The present *ab initio* models of hRXR α dimer and hRXR α tetramer also provide a basis for further analysis of the hRXR α interaction with ligands and DNA response elements.

REFERENCES

- Maglich, J. M., Sluder, A., Guan, X., Shi, Y., McKee, D. D., Carrick, K., Kamdar, K., Willson, T. M., and Moore, J. T. (2001) *Genome Biol.* **2**, 1–7
- Evans, R. M. (1988) *Science* **240**, 889–895
- Lazar, M. A. (1993) *Endocr. Rev.* **14**, 184–193
- Ribeiro, R. C. J., Apriletti, J. W., Wagner, R. L., West, B. L., Feng, W., Huber, R., Kushner, P. J., Nilsson, S., Scanlan, T. S., Fletterick, R. J., Schaufele, F., and Baxter, J. D. (1998) *Rec. Prog. Horm. Res.* **53**, 351–394
- Tsai, M. J., and O'Malley, B. W. (1994) *Ann. Rev. Biochem.* **63**, 451–486
- Horwitz, K. B., Jackson, T. A., Rain, D. L., Richer, J. K., Takimoto, G. S., and Tung, L. (1996) *Mol. Endocrinol.* **10**, 1167–1177
- Sporn, M. B., Roberts, A. B., and Goodman, D. S. (eds) (1994) *The Retinoids: Biology, Chemistry, and Medicine*, Raven Press, Ltd., New York
- Mangelsdorf, D. J., and Evans, R. M. (1995) *Cell*, **83**, 841–850
- Kastner, P., Mark, M., and Chambon, P. (1995) *Cell*, **83**, 859–869
- Chawla, A., Repa, J. J., Evans, R. M., and Mangelsdorf, D. J. (2001) *Science*, **294**, 1866–1870
- Mukherjee, R., Strasser, J., Jow, L., Hoener, P., Paterniti, J. R., Jr., and Heyman, R. A. (1998) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **18**, 272–276
- de Urzula, A. M., Liu, S., Sjoberg, M., Zetterstrom, R. H., Griffiths, W., Sjovall, J., and Perlmann, T. (2000) *Science*, **290**, 2140–2144
- Mukherjee, R., Davies, P. J. A., Crombie, D. L., Bischoff, E. D., Cesario, R. M., Jow, L., Hamann, L. G., Boehm, M. F., Mondon, C. E., Nadzan, A. M., Paterniti, J. R., and Heyman, R. A. (1997) *Nature* **386**, 407–410
- Kersten, S., Pan, L., Chambon, P., Grommeyer, H., and Noy, N. (1995) *Biochemistry* **34**, 13717–13721
- Chen, Z.-P., Iyer, J., Bourguet, W., Held, P., Mioskowski, C., Lebeau, L., Chambon, P., and Grommeyer, H. (1998) *J. Mol. Biol.* **275**, 55–65
- Rastinejad, F., Wagner, T., Zhao, Q., and Khorasanizadeh, S. (2000) *EMBO J.* **19**, 1045–1054
- Zhao, Q., Khorasanizadeh, S., Miyoshi, Y., Lazar, M. A., and Rastinejad, F. (1998) *Mol. Cell* **1**, 849–861
- Zhao, Q., Chasse, S. A., Devarakonda, S., Sierk, M. L., Ahvazi, B., and Rastinejad, F. (2000) *J. Mol. Biol.* **296**, 509–520
- Bourguet, W., Ruff, M., Chambon, P., Grommeyer, H., and Moras, D. (1995) *Nature* **375**, 377–382
- Egea, P. F., Mitschler, A., Rochel, N., Ruff, M., Chambon, P., and Moras, D. (2000) *EMBO J.* **19**, 2592–2601
- Gampe, R. T., Jr., Montana, V. G., Lambert, M. H., Wisely, G. B., Milburn, M. V., and Xu, H. E. (2000) *Genes Dev.* **14**, 2229–2241

22. Egea, P. F., Rochel, N., Birck, C., Vachette, P., Timmins, P. A., and Moras, D. (2001) *J. Mol. Biol.* **307**, 557–576
23. Rastinejad, F., Perlmann, T., Evans, R., and Sigler, P. B. (1995) *Nature* **375**, 203–211
24. Wurtz, J.-M., Bourguet, W., Renauld, J.-P., Vivat, V., Chambon, P., Moras, D., and Gronemeyer, H. (1996) *Nat. Struct. Biol.*, **3**, 87–94
25. Moras, D., and Gronemeyer, H. (1998) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **10**, 384–391
26. Ribeiro, R. C. J., Feng, W., Wagner, R. L., Costa, C. H. R. M., Pereira, A. C., Apriletti, J. W., Fletterick, R. J., and Baxter, J. D. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 14987–14995
27. Kersten, S., Pan, L., and Noy, N. (1995) *Biochemistry*, **34**, 14263–14269
28. Kellermann, G., Vicentin, F., Tamura, E., Rocha, M., Tolentino, H., Barbosa, A., et al. (1997) *J. Appl. Crystallogr.* **30**, 880–883
29. Svergun, D. I. (1992) *J. Appl. Crystallogr.* **25**, 495–503
30. Porod, G. (1982) in *Small-angle X-ray Scattering* (Glatter, O., and Kratky, O., eds) pp. 17–51, Academic Press, London
31. Svergun, D. I. (1999) *Biophys. J.* **76**, 2879–2886
32. Guinier, A., and Fournet, G. (1955) *Small-angle Scattering of X-rays*, John Wiley & Sons, NY
33. Svergun, D. I., Volkov, V. V., Kozin, M. B., and Sturmann, H. B. (1996) *Acta Crystallogr. Sect. A* **52**, 419–426
34. Svergun, D. I., Volkov, V. V., Kozin, M. B., Sturmann, H. B., Barberato, C., and Koch, M. H. J. (1997) *J. Appl. Crystallogr.* **30**, 798–802
35. Sturmann, H. B. (1970) *J. Phys. Chem.* **72**, 177–182
36. Shannon, C. E., and Weaver, W. (1949) *The Mathematical Theory of Communication*, University of Illinois Press, Urbana, IL
37. Svergun, D. I., and Sturmann, H. B. (1991) *Acta Crystallogr. Sect. A* **47**, 736–744
38. Konarev, P. V., Petoukhov, M. V., and Svergun, D. I. (2001) *J. Appl. Crystallogr.* **34**, 527–532
39. Svergun, D. I., Barberato, C., and Koch, M. H. (1995) *J. Appl. Crystallogr.* **28**, 768–773
40. Kozin, M. B., and Svergun, D. I. (2001) *J. Appl. Crystallogr.* **34**, 33–41
41. Garcia de la Torre, J., Huertas, M. L., and Carrasco, B. (2000) *Biophys. J.* **78**, 719–730
42. Feigin, L. A., and Svergun, D. I. (1987) *Structure Analysis by small-angle X-ray and Neutron Scattering*, pp. 83–87, Plenum Press, New York
43. Ribeiro, R. C., Kushner, P. J., Apriletti, J. W., West, B. L., and Baxter, J. D. (1992) *Mol. Endocrinol.* **6**, 1142–1152
44. Yen, P. M., Darling, D. S., Carter, R. L., Forgione, M., Umeda, P. K., and Chin, W. W. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 3565–3568
45. Ribeiro, R. C., Apriletti, J. W., Yen, P. M., Chin, W. W., and Baxter, J. D. (1994) *Endocrinology* **135**, 2076–2085
46. Marimuthu, A., Feng, W., Tagami, T., Nguyen, H., Jameson, L. J., Fletterick, R. J., Baxter, J. D., and West, B. L. (2002) *Mol. Endocrinol.* **16**, 271–286
47. Mangelsdorf, D. J., Umenson, K., Kliewer, S. A., Borgmeyer, U., Ong, E. S., and Evans, R. M. (1991) *Cell* **66**, 555–561
48. Chen, H., and Privalsky, M. L. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 422–426
49. Lin, B. C., Wong, C. W., Chen, H. W., and Privalsky, M. L. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 9860–9867

Anexo 2

Mecanismo Molecular da Ação do Hormônio Tireoideano

revisão

RESUMO

Os hormônios tireoideanos (HTs) são necessários para a diferenciação, crescimento e metabolismo de diversos tecidos de vertebrados. Seus efeitos são mediados pelos receptores do hormônio tireoideano (TRs), membros da superfamília dos receptores nucleares. Estes receptores são fatores de transcrição modulares que se ligam em seqüências específicas do DNA denominadas elementos responsivos ao TR, que são encontrados nos promotores dos genes regulados pelo HT. Os TRs são codificados por dois genes distintos, α e β , localizados nos cromossomos 17 e 3, respectivamente. Estas isoformas apresentam diferentes funções e sua expressão é específica para cada tecido. O TR se liga ao DNA como monômero, homodímero ou heterodímero com o receptor de retinóide X (RXR). Além disso, o TR modula a atividade transcricional (repressão ou ativação) através da interação com correpressores e co-ativadores, na ausência e na presença do T_3 , respectivamente. A compreensão do mecanismo molecular da ação do receptor do hormônio tireoideano e a definição de sua estrutura cristalográfica contribuirão para a aquisição de novos conceitos envolvidos na transcrição e nos distúrbios hormonais presentes nas doenças endócrinas, assim como facilitará o desenho de novas drogas, agonistas ou antagonistas, com grande valor terapêutico. (Arq Bras Endocrinol Metab 2004;48/1: 23-38)

Descritores: Receptores nucleares; Receptor do hormônio tireoideano; Co-reguladores; Dimerização; Região de dobradiça; Síndrome de resistência ao hormônio tireoideano

ABSTRACT

Molecular Mechanism of Thyroid Hormone Action.

Thyroid hormones (TH) are involved in normal differentiation, growth, and metabolism in several tissues of all vertebrates. Their actions are mediated by the TH receptors (TRs), members of the nuclear hormone receptor superfamily. These receptors are transcription factors that bind to DNA on specific sequences, the TR response element (TREs), in promoters of target genes. Two genes encode TRs, α and β , located in chromosomes 17 and 3, respectively. These isoforms show different functions and exhibit a tissue specific expression. TRs function as monomers, homodimers or heterodimers with retinoid X receptor (RXR) and modulate transcription activity (repression or activation) by interacting with co-repressor and co-activators, which associate with TR in the absence or presence of T_3 , respectively. Understanding the molecular mechanism of TR action and the definition of its crystallographic structure will provide new insights into transcription mechanisms and will facilitate the design of new drugs with greater therapeutic value. (Arq Bras Endocrinol Metab 2004;48/1: 23-38)

Keywords: Nuclear receptor; Thyroid hormone receptor; Co-regulators; Dimerization; Hinge region; Thyroid hormone resistance

Gustavo B. Barra
Lara F.R. Velasco
Rutnéia P. Pessanha
Alessandra M. Campos
Fanny N. Moura
Sandra M.G. Dias
Igor Polikarpov
Ralf C.J. Ribeiro
Luiz Alberto Simeoni
Francisco A.R. Neves

*Laboratório de Farmacologia
Molecular, Departamento de
Ciências Farmacêuticas,
Faculdade de Ciências da Saúde,
Universidade de Brasília, Brasília,
DF; Instituto de Física de São
Carlos (IP), Universidade de São
Paulo, São Carlos, SP; e
Laboratório Nacional de Luz
Síncrotron, Campinas, SP.*

*Recebido em 18/10/03
Aceito em 30/10/03*

A IMPORTÂNCIA DOS HORMÔNIOS tireoideanos (HTs) no desenvolvimento, homeostase, proliferação e diferenciação celular tem sido bem documentada. Sabe-se que, nos mamíferos, os HTs atuam em todos os órgãos e vias metabólicas e seus principais efeitos incluem o desenvolvimento de vários tecidos, como o do sistema nervoso central, consumo de oxigênio, regulação da temperatura corporal, frequência cardíaca e também o metabolismo de carboidratos, proteínas e gorduras. Além disso, participam da síntese e a degradação de muitos outros fatores de crescimento e hormônios, o que resulta em outros efeitos secundários (1,2).

A principal forma do hormônio tireoideano secretada pela glândula tireóide é a 3,5,3',5'-tetraiodo-L-tironina (tiroxina ou T_4) e uma menor quantidade é secretada como 3,5,3'-triiodotironina (T_3), a forma ativa do hormônio. O total plasmático de T_4 é cerca de 45 vezes maior que o de T_3 (90nM versus 2nM) (3) e a principal fonte de produção de T_3 ocorre através da conversão de T_4 em T_3 por meio da 5' desiodação de T_4 nos tecidos periféricos promovida pelas desiodases (1,3).

Uma vez secretados, os hormônios tireoideanos circulam comumente ligados às proteínas plasmáticas, e somente 0,03% de T_4 e 0,3% de T_3 estão livres. A ligação destes hormônios às proteínas plasmáticas aumenta suas meias-vidas e assegura uma distribuição regular do hormônio nos tecidos alvos. A entrada e a saída do hormônio nas células ocorre, em uma menor parcela, por difusão passiva, e outra principal através de transportadores específicos que regulam a captação e o efluxo dos hormônios tireoideanos (4,5). No interior da célula, o T_3 liga-se a receptores específicos localizados no núcleo, os receptores do hormônio tireoideano (TRs). Os TRs medeiam a ação do hormônio ligando-se diretamente na região promotora dos genes alvos, regulando a transcrição em todos os tecidos de mamíferos (5).

Superfamília dos Receptores Nucleares

Os TRs pertencem à superfamília de receptores nucleares que compreende 49 genes que codificam 75 proteínas diferentes, que estão envolvidas na transdução de sinais hormonais extracelulares em respostas transcricionais (6). A identificação de receptores em insetos como membros da superfamília sugere uma origem comum destes receptores e, claramente, demonstra que a sua evolução antecede a divergência de vertebrados e invertebrados (7).

Os membros da superfamília de receptores nucleares são fatores de transcrição dependentes do ligante e atuam por ligarem-se a seqüências específicas no

DNA, denominadas elementos responsivos ao hormônio (HRE). Os HREs geralmente estão localizados na região promotora dos genes alvos, são específicos para cada receptor e possuem duas cópias imperfeitas de um hexanucleotídeo, que podem estar arranjadas em diferentes orientações, com espaçamento e seqüências flanqueadoras diferentes. Os receptores nucleares ligam-se aos HREs de diversas formas, podendo atuar como monômeros, homodímeros ou heterodímeros (5,8,9).

A superfamília dos receptores nucleares incluem os receptores para esteróides, vitamina D, retinóides, hormônios tireoideanos e prostaglandinas, além de outros receptores órfãos, em maior número, que não possuem ligantes conhecidos no momento de sua identificação (10). Para alguns destes receptores, os ligantes têm sido identificados, por exemplo, como o ácido 9-cis-retinóico para o receptor do retinóide X (RXR), oxisteróis para os receptores hepáticos X (LXR), ácidos biliares para os receptores de farnesóides X (FXR), ácidos graxos para os receptores de proliferadores peroxissomais (PPAR), pregnanos para os receptores de pregnanos X (PXR) e androstanos para os receptores constitutivos de androstanos (CAR) (11,12).

Os receptores para os hormônios esteróides formam uma subclasse da superfamília de receptores nucleares (9). Na ausência do ligante, os receptores dos esteróides glicocorticóides (GRs), mineralocorticóides (MRs), androgênios (ARs), estrogênio (ER) e progesterona (PR) estão associados em um complexo com proteínas de choque térmico (HSPs) no citoplasma e, em alguns casos, no núcleo da célula. A ligação do hormônio dissocia os receptores deste complexo e induz a formação de homodímeros que se dirigem ao núcleo onde se ligam aos seus respectivos HREs, regulando a transcrição (5,13).

Outra subclasse da superfamília de receptores nucleares é representada pelos receptores dos hormônios tireoideanos (TRs), do ácido retinóico (RAR), da vitamina D (VDR) e dos proliferadores peroxissomais (PPAR), que formam heterodímeros com o RXR (9). Esses receptores, na ausência do hormônio, estão localizados predominantemente no núcleo, em solução ou ligados ao DNA. Quando associados ao DNA, estão predominantemente ligados a seqüências de repetições diretas (DRs) do hexâmero AGGTCA (AGGTCA N AGGTCA), onde 'N' é o número de bases que separa cada hexâmero (5). A capacidade de cada receptor reconhecer os HREs constituídos por DRs é chamada de regra 1 a 5 (figura 1). Dessa forma, o PPAR e o RXR se ligam a uma DR espaçada por uma base (DR-1), o RAR se liga a DRs espaçadas por duas ou cinco bases (DR-2 e DR-5), o VDR a uma DR

Figura 1. Ligação dos receptores nucleares não esteróides com o RXR em repetições diretas (DRs) separadas por espaçadores de tamanhos variados (N) - Regra 1 a 5.

espaçada por três bases (DR-3) e o TR a uma DR espaçada por quatro bases (DR-4) (5,10,14). O RAR também pode se ligar a uma DR-1 heterodimerizado com o RXR (15). Além das DRs, os elementos responsivos aos hormônios podem estar na forma de palíndromos e palíndromos invertidos (5). Chama a atenção que alguns receptores órfãos podem se ligar, como monômeros, a uma única sequência de hexanucleotídeos (12).

Na ausência do ligante, os membros da subclasse dos receptores dos hormônios tireoideanos ligam-se ao DNA na forma de homo ou heterodímeros. Esses dímeros, por sua vez, se associam a outras proteínas conhecidas como correpressores, pois atuam reprimindo a transcrição gênica. Com a ligação do hormônio ao receptor, observa-se formação predominante de heterodímeros com o RXR, seguida de dissociação das proteínas correpressoras e a associação com proteínas co-ativadoras que passam agora a estimular a transcrição dos genes alvos (3,5).

Domínios Funcionais dos Receptores do Hormônio Tireoideano

A análise estrutural e funcional do TR e de outros receptores nucleares demonstram que esta superfamília exibe uma estrutura modular com domínios funcionais distintos. Os três principais domínios são: o amino-terminal, o de ligação ao DNA (DBD) e o de ligação ao ligante (LBD). Existe, também, uma pequena região que conecta o DBD ao LBD, que é conhecida como dobradiça *hinge* (figura 2) (5).

O domínio amino-terminal é extremamente variável entre os membros da superfamília dos receptores nucleares, tanto no tamanho quanto na sequência

Figura 2. Estrutura primária representando os domínios funcionais dos receptores nucleares: Domínio amino-terminal (NH₂-t), domínio de ligação ao DNA (DBD), dobradiça (*Hinge*), domínio de ligação ao ligante (LBD) e suas respectivas funções.

cia de aminoácidos, e exibe uma função de ativação transcricional independente do ligante, denominada função de ativação 1 (AF-1) (16). Para o TR, sua importância ainda não é totalmente conhecida, pois alguns estudos mostraram que a deleção do domínio amino-terminal tem pouco efeito sobre a resposta transcricional positiva ao T₃ (5,17).

O DBD é o domínio mais bem conservado entre todos os receptores nucleares e tem como função principal a ligação ao DNA. Este domínio situa-se na porção central dos receptores e é organizado por dois segmentos estruturais conhecidos como dedos de zinco. Nestes segmentos, quatro resíduos de cisteína de cada dedo formam complexos coordenados por íons de zinco, formando duas estruturas independentes em forma de alça (10). Os dois dedos de zinco são separados por uma sequência de 15 a 17 aminoácidos. Três aminoácidos da base do primeiro dedo representam a região chamada de caixa P (*P-box*). Estes aminoácidos são responsáveis pelo reconhecimento do elemento responsivo específico para cada receptor (18), ao passo que uma sequência de cinco aminoácidos, localizada entre a primeira e a segunda cisteína na base do segundo dedo, é denominada de caixa D (*D-box*), uma região importante para a dimerização do receptor (5,18). Os termos *P-box* e *D-box* estão relacionados com a posição proximal e distal dessas regiões, respectivamente (figura 3) (8).

O domínio de ligação do hormônio ou ligante é menos conservado que o DBD, refletindo a variedade de ligantes que atuam nestes receptores. Este domínio localiza-se na região carboxi-terminal e possui várias funções, como a homo e heterodimerização do receptor, localização nuclear, dissociação das HSPs (7) e interação com proteínas correpressoras e co-ativadoras (19,20). Além dessas funções, o LBD contém uma superfície que é fundamental para a ativação transcricional, que se forma com a ligação do hormônio ao receptor. Após a ligação do hormônio, essa

Figura 3. Domínio de ligação ao DNA (DBD) do receptor do hormônio tireoideano: segmento representativo dos dedos de zinco e das regiões P-box (P-proximal) e D-box (D-distal).

região, denominada função de ativação 2 (AF-2), passa a se interagir com os co-ativadores, que permitirão a formação do complexo protéico envolvido na ativação da transcrição (17).

A região que conecta o DBD ao LBD, e que age como uma dobradiça, é extremamente variável entre os diferentes receptores (3). No caso específico do TR, a principal função desta região seria promover o movimento de rotação do DBD em relação ao LBD, possibilitando que o TR se ligue nos TREs com diferentes orientações (5,8,10,21).

A identificação desses domínios funcionais dentre os membros da superfamília de receptores nucleares foi baseada na comparação das seqüências dos receptores, análises mutacionais (18) e, mais recentemente, na determinação da estrutura cristalográfica do DBD (associado ao DBD do RXR em DR-4) e do LBD do TR ligado ao hormônio (22-24).

Receptores dos Hormônios Tireoideanos

Após a identificação dos cDNAs codificando os receptores de glicocorticóide (GRs) e estrógeno (ER) em 1985, estudos de homologia demonstraram que os TRs, clonados em 1986 a partir de bibliotecas de embriões de galinha e placenta humana, eram homólogos celulares do oncogene viral v-erbA (vírus da eritroblastose aviária) (5).

Existem dois genes distintos que codificam os TR e TR, que, nos humanos, localizam-se nos cromossomos 17 e 3, respectivamente. Cada um destes genes codificam várias proteínas (1, 2, 1, 2, 1, 2, 3 e 3), que são o resultado do processamento alternativo do RNA mensageiro (*splicing* alternativo) ou da utilização de promotores alternativos (figura 4) (25). Dessa forma, as diferentes isoformas do TR são 1, 2, 1, 2 e 3, sendo que somente 1, 1, 2 e 3 se ligam ao hormônio. As isoformas 1 e 2 diferem somente em sua região carboxi-terminal e, por esse motivo, a isoforma 2 não se liga ao hormônio, enquanto que as isoformas 1, 2, 3

Figura 4. Estrutura primária das diferentes isoformas codificadas pelos genes receptores do hormônio tireoideano: as isoformas TR 1, TR 2, TR 3 e TR 3 são codificadas pelo gene THRB através da utilização de promotores alternativos. O gene THRA, por *splicing* alternativo e também pela utilização de promotores alternativos, produz as proteínas TR 1, TR 2, TR 1 e TR 2.

diferem em sua região amino-terminal (26). A isoforma TR 3 foi recentemente descrita em ratos (27) e, a partir da comparação das seqüências genômicas destes animais com os humanos, pode-se prever que esta isoforma está conservada entre as duas espécies (25). A isoforma TR 2, por não se ligar ao T₃ pode inibir a transcrição mediada por TR 1 ou TR 1, provavelmente por competir com a ligação aos TREs e com a formação de heterodímeros com RXR (5).

A expressão dos mRNAs dos TRs varia com o desenvolvimento e com a diferenciação celular (26). Os mRNAs do TR 1, TR 2 e TR 1 são expressos em quase todos os tecidos, ainda que em níveis diferentes. Assim, o TR 1 é abundante nos músculos esqueléticos, gordura marrom e no coração, o TR 2 é particularmente abundante no cérebro e o TR 1 é expresso em grande quantidade no fígado, rim e cérebro. Já o TR 2 é expresso principalmente na glândula pituitária e em outras áreas do cérebro (26,28). O TR 1 e TR 2 são encontrados principalmente no epitélio do intestino delgado, pulmão e durante os estágios precoces do desenvolvimento (25). Em ratos, o TR 3 é expresso no fígado, rim e pulmão, enquanto que o TR 3 no músculo esquelético, coração, baço e cérebro (27). Essa expressão variada dos TRs pode constituir um mecanismo usado pelo T₃ para a regulação da transcrição de forma seletiva para alguns tecidos (3).

Os TR 1, TR 1, e TR 2 possuem papéis funcionais distintos na fisiologia hormonal tireoideana.

Por exemplo, a síndrome de resistência ao hormônio tireoideano é causada por mutações no LBDs do TR (29). Por razões ainda desconhecidas, nenhum paciente com mutações no TR foi descrito. Acredita-se que estas mutações, quando ocorrem nas células germinativas, não são detectadas por serem letais, inconseqüentes, ou por não estarem associadas a nenhuma anormalidade encontradas na síndrome de resistência ao hormônio tireoideano. Porém, em algumas neoplasias, como carcinoma hepatocelular, foram encontrados TR mutantes capazes de exercerem ação dominante negativa (30). Além disto, camundongos com deleção do TR apresentam sinais semelhantes à resistência ao hormônio tireoideano, como, por exemplo, elevação dos níveis séricos de T_3 , T_4 e TSH. Entretanto, camundongos com deleção do TR 1 possuem níveis baixos de T_4 e TSH circulante (31). Possivelmente, as mutações em TR que poderiam exercer o efeito dominante negativo não seriam visualizadas, porque o controle dos níveis de TSH é dependente do TR e não do TR . Como podemos perceber, a importância das isoformas TR e TR foram evidenciadas nos modelos de animais com deleção dos genes induzida pela recombinação homóloga. Assim, o fenótipo do camundongo com deleção do TR (TR 1 e TR 2) é caracterizado por, além dos altos níveis séricos de TSH, T_4 e T_3 , hiperplasia da glândula tireóide, frequência cardíaca basal elevada, má formação da cóclea (defeitos auditivos graves) e da retina. Desta forma, refletindo a ausência do TR e os altos níveis séricos dos hormônio tireoideano, estes animais apresentam hipotireoidismo nos órgãos que predominantemente expressam o TR (fígado e hipófise) e hipertireoidismo nos que expressam TR (coração). Quando somente o TR 2 foi deletado, os animais apresentaram níveis elevados de T_4 , T_3 e TSH e ausência de defeitos na audição, sugerindo que o TR 2 seja a principal isoforma reguladora dos níveis de TSH. Os camundongos com deleção do TR 1 apresentam diminuição da temperatura corporal e da frequência cardíaca, e o TSH é normal. Já os animais com deleção de TR , incluindo o TR 1 e 2, apresentam hipotireoidismo, má formação intestinal, retardo do crescimento e morrem logo após o nascimento, sugerindo um papel importante do TR 2, que não se liga ao T_3 , na modulação da transcrição. Entretanto, a deleção isolada do TR 2 não diminui a sobrevivência dos animais (3,25).

Considerando que as deleções isoladas de TR 1 e TR 1 não provocaram grandes distúrbios, é possível que cada isoforma possa compensar, de certa forma, a ausência da outra. Este fato foi comprovado

em camundongos com deleção do TR , no qual foi acrescentado um TR dominante negativo (337T), cuja expressão foi restrita à hipófise. Estes animais, quando comparados aos portadores de deleção do TR 1 isolada, apresentaram níveis significativamente maiores do TSH, cuja regulação não era suprimida por T_3 (32). Estes resultados sugerem que o TR dominante negativo inibiu o TR remanescente na deleção isolada do TR .

A combinação da deleção de TR e TR 1 gerou animais com retardo do crescimento, diminuição da fertilidade, redução do conteúdo mineral e do desenvolvimento dos ossos, bradicardia e incapacidade da regulação da temperatura corpórea. Já a deleção de TR , TR 1 e TR 2 produziu animais com um fenótipo semelhante à deleção do TR 1 e TR 2, só que com alterações mais severas, incluindo a dificuldade de supressão do TSH. Estes resultados sugerem que a regulação da transcrição pelos TRs depende de todas as isoformas, mesmo daquelas que não se ligam ao T_3 . A explicação para todos estes achados não é clara, mas demonstra que a ausência do TR é menos prejudicial que a falta dos hormônios tireoideanos e aponta para a importância do papel da repressão na ausência do ligante (3,25).

A complexidade da importância das isoformas, e também do mecanismo de ação do TR, foi demonstrada mais recentemente com a utilização da técnica de mutação dirigida em camundongos. Shibusawa e cols. geraram animais com uma mutação específica na região do DBD (P-box), que, *in vitro*, elimina completamente a ligação do TR 1 ao DNA. Estes animais, de forma semelhante à deleção completa do TR 1, apresentaram distúrbio na regulação do eixo hipotálamo hipofisário caracterizada pelo aumento do TSH e hiperplasia da tireóide. Contudo, ao contrário da deleção completa do TR 1, o camundongo mutante apresentou uma audição muito próxima ao normal, pelo menos para algumas frequências, indicando que o mecanismo de ação do TR no ouvido interno deve ser diferente dos outros tecidos (33).

Transporte dos Hormônios Tireoideanos

Para exercer seu efeito, os HTs necessitam entrar nas células. Por esse motivo, a magnitude das respostas celulares é totalmente dependente da concentração intracelular dos hormônios tireoideanos, que, por sua vez, está relacionada ao transporte de T_3 e T_4 na membrana plasmática das células. O controle da entrada e/ou saída de HT pode alterar sua concentração no interior da célula e, assim, ser um ponto regulador para sua ação final (34,35).

A importância do transporte e da concentração intracelular do HT como fator regulador de sua ação foi demonstrada em células derivadas de hepatoma de rato que apresentavam resistência à ação de T_3 por não o acumularem em seu interior. A diminuição da concentração de T_3 intracelular nestas células foi devida ao aumento do seu efluxo pela membrana plasmática (35). Experimentos posteriores em células de tireóide de ratos (FRTL-5), fibroblastos de camundongos (NIH-3T3) e em células primárias de átrio, ventrículo, rim e placenta mostraram que, tanto o influxo quanto o efluxo de HT, variam consideravelmente entre os diversos tecidos (35-37). Além disso, o transporte de HTs pode compensar a diminuição de seus níveis plasmáticos observada, por exemplo, em pacientes com insuficiência renal crônica. Assim, hemácias de pacientes urêmicos apresentam aumento do influxo e diminuição do efluxo de T_3 , favorecendo, ao final, o acúmulo do hormônio em seu interior (dados não publicados).

Recentemente, foi demonstrado que a hiperexpressão de proteínas transportadoras do sistema L, que estão envolvidas no influxo de T_3 , aumentam seu influxo para o interior da célula e, conseqüentemente, sua resposta transcricional. No sentido oposto, o bloqueio deste sistema, com inibidores específicos, reduz a concentração intracelular de T_3 , assim como sua ação farmacológica sobre TR (34).

Em resumo, estes resultados demonstram nitidamente a importância do influxo e do efluxo na regulação da concentração intracelular de HTs e, conseqüentemente, na modulação de sua atividade transcricional.

Mecanismo de Ação dos Receptores dos Hormônios Tireoideanos

Conforme mencionado anteriormente, os efeitos do TR na regulação da expressão gênica são inicialmente obtidos com a ligação do receptor a seqüências de DNA específicas, presentes na região regulatória dos genes alvo. Essas regiões são compostas pela seqüência hexanucleotídica "AGGTCA" (17,38,39), e podem estar organizadas em três orientações diferentes: na forma de repetição direta espaçada por 4 nucleotídeos quaisquer (DR-4), ou na forma de palíndromo invertido espaçada por seis nucleotídeos quaisquer (F2), ou, ainda, na forma de palíndromo sem nenhum espaçamento (TREpal) (figura 5) (5). Aproximadamente 30 TREs naturais já foram identificados, sendo que a maioria é DR-4, seguido pelo F2 e mais raramente o TREpal (3).

Na ausência do hormônio, os TRs se ligam ao DNA na forma de monômeros, homodímeros e, preferencialmente, como heterodímeros com o receptor

Figura 5. Elementos responsivos do receptor do hormônio tireoideano: repetições diretas (DR-4), palíndromo invertido (F2) e palíndromo (TREpal). N indica o número de nucleotídeos entre os hexâmeros.

RXR. A importância fisiológica da ligação de TR como homodímero ainda não está clara, principalmente na ativação da transcrição, pois, em ensaios de interação proteína DNA realizados *in vitro* (gel shift), foi demonstrado que a adição de T_3 promove a dissociação de homodímeros de TR favorecendo, subseqüentemente, a formação de heterodímeros com o RXR (5). Este efeito ocorre com muita nitidez no elemento responsivo DR-4 (principal TRE encontrado nos genes alvo), e em menor intensidade no palíndromo invertido. Em contraste, o T_3 não altera a ligação de homodímeros de TR no palíndromo (TREpal) (40). Dessa forma, o T_3 em concentrações fisiológicas modifica o equilíbrio entre os TRs que se ligam ao DNA como homodímeros e heterodímeros (5). A relevância destes achados na modulação da transcrição pelo T_3 ainda não está clara. Entretanto, é possível que novos estudos sobre a importância da dimerização e a melhor compreensão sobre a região de dobradiça possam contribuir para a elucidação destes achados.

Com a ligação do hormônio ao receptor, observa-se a dissociação das proteínas correpessoras e a associação com os co-ativadores que medeiam a estimulação de genes alvos (figura 6) (41,3).

Co-reguladores: Correpressores e Co-ativadores

Vários estudos têm demonstrado que TR, na sua forma de aporeceptor (não ligado ao T_3), é capaz de interagir com fatores de transcrição como o TFIIB e TFIID, que são componentes chaves da maquinaria de transcrição basal (31), podendo inibir a montagem do complexo de pré-iniciação da transcrição no promotor. Desta forma, a interação do TR com os componentes da maquinaria de transcrição basal seria uma forma que o TR utilizaria para mediar a repressão basal independente de ligante (42). Por outro lado, o TR não

Figura 6. Representação esquemática do mecanismo de ação do receptor do hormônio tireoideano: na ausência de T_3 , o TR se encontra ligado ao TRE como homodímero (representado) ou heterodímero associado a proteínas correpresoras, que compactam a cromatina na região promotora e inibem a maquinaria de transcrição basal (MTB). A ligação do T_3 (círculo) ao TR promove uma mudança conformacional, dissociando os homodímeros (TR/TR), favorecendo a associação de heterodímeros (TR/RXR). Esta mudança conformacional induz também a liberação dos correpresores e associação do TR com proteínas co-ativadoras, que relaxam a cromatina na região promotora e recrutam a MTB, ativando a transcrição de genes alvo.

exerce esta função isoladamente, e vários estudos sugerem que sua associação com proteínas correpresoras solúveis é crítica e fundamental para o TR reprimir a transcrição basal (3). Dois dos principais correpresores para o TR são o NcoR (*Nuclear Receptor Corepressor*), proteína de 270kDa (43), e o SMRT (*silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor*) (44). Tanto o NcoR quanto o SMRT são capazes de interagir com o TR na ausência de T_3 , tanto em solução como quando o TR está ligado aos seus elementos responsivos. A interação do correpresor com TR ocorre por meio de uma α -hélice do correpresor que contém a sequência de consenso LXXXIXXX(I/L) (onde L corresponde ao aminoácido leucina, I ao aminoácido Isoleucina e X a qualquer outro aminoácido) (45,46). O SMRT possui duas destas sequências, já o NcoR possui 3, duas delas homólogas às do SMRT e uma terceira recentemente descoberta específica para o TR, justificando a maior afinidade do TR pelo NcoR (47). Os correpresores NCoR e SMRT, por sua vez, são capazes de interagir com outros repressores como as histonas des-acetilases (HDACs), formando um complexo de correpresores (3,19,31). Cada componente deste complexo é importante para a repressão gênica, pois a utilização de anticorpos direcionados para cada um dos seus componentes NCoR-Sin3-HDAC provoca a perda da repressão da transcrição (figura 7) (31).

Figura 7. Modelo de repressão da transcrição pelo receptor do hormônio tireoideano na forma de homodímero (TR-TR) ou heterodímero (RXR-TR) na ausência do ligante (T_3). O TR ligado às regiões regulatórias de genes-alvo recruta um complexo correpresor, que des-acetila as histonas na região promotora. A des-acetilação das histonas compacta a cromatina e impede a organização dos fatores de transcrição basal, reprimindo, assim, a transcrição.

A presença das HDACs no complexo correpresor sugere que a repressão seja mediada pela des-acetilação das histonas presentes na região promotora, possivelmente porque a histona acetilada torna a cromatina mais condensada, restringindo o acesso das fatores de transcrição basal ao DNA (3).

A importância da repressão que ocorre na ausência do ligante é mais clara quando observamos os resultados reportados em camundongos com deleção da PAX8, uma proteína responsável pelo desenvolvimento da tireóide. Estes animais morrem logo após o nascimento por hipotireoidismo severo. No entanto, a adição da deleção do TR aos animais com deleção da PAX8 promove um aumento significativo da sobrevivência, demonstrando que o TR, sem estar ligado ao T_3 , é um repressor da transcrição e esta repressão tem significado biológico (25).

A ligação do T_3 ao TR provoca mudanças conformacionais na estrutura do receptor, favorecendo a dissociação do TR com os correpresores (48), seguida da interação com proteínas co-ativadoras (49). O TR se interage com os co-ativadores da família p160 (proteínas cujo peso molecular é da ordem de 160kD). Estes co-ativadores não são específicos, associam-se com vários outros membros da superfamília dos receptores nucleares e exercem seu efeito ativando a transcrição na presença do ligante. Esta associação é feita pela interação de um segmento de α -hélice de sequência LXXLL (onde L corresponde a leucina e X a qualquer aminoácido) presente na região central do co-ativador, com a superfície AF-2 dos receptores nucleares (3,50,51). Cada co-ativador possui 3 cópias desta

seqüência LXXLL e existem evidências de que diferentes receptores nucleares interagem com LXXLL distintos (3,19,20).

Os principais componentes da família p160 são o Co-ativador de Receptores Esteróides 1 (SRC-1/NCoA1) (52), o Fator Transcricional Intermediário 2 (TIF2/GRIP1/SRC-2/NCoA2) (53), e o ativador dos receptores de hormônio tireoideanos e do ácido retinóico (ACTR/pCIP/AIB1/RAC3/TRAM-1/SRC-3/NCoA3) (54). Como a nomenclatura destas proteínas é complexa e várias delas contêm mais de um nome, as diversas denominações encontradas na literatura foram incluídas e separadas por uma barra. Desta forma, SRC-1/NCoA1 representam a mesma proteína (SRC-1 ou NCoA1).

A existência de múltiplas proteínas co-ativadoras p160 sugere uma redundância funcional ou indica que cada um dos co-ativadores poderia apresentar uma função específica. Na realidade, as duas situações parecem existir. Camundongos com deleção do gene de SRC-1 apresentam resistência parcial aos hormônios esteróides (55) e ao T3 (56). Por outro lado, associado à deleção de SRC-1, foi observado um aumento compensatório da expressão de TIF-2, sugerindo um redundância parcial entre as proteínas da família dos co-ativadores (55). No entanto, é interessante observar que recentemente foi descoberto um novo co-ativador específico para o TR e RXR, o NRIF3 (*nuclear receptor-interacting factor 3*), que não é capaz de interagir com nenhum outro receptor nuclear e não possui nenhuma homologia com os outros co-ativadores já descritos (57). A importância deste co-ativador na modulação específica do hormônio tireoideano ainda não está totalmente definida.

Os co-ativadores, por possuírem atividade histona acetil transferase (HAT), estimulam a transcrição ao acetilarem as histonas (3,19,20). A hiperacetilação das histonas relaxa a cromatina e facilita o acesso dos fatores de transcrição basal ao promotor do gene alvo, estimulando a atividade transcricional. Ademais, co-ativadores são capazes de acetilar outras proteínas além das histonas, como o fator de transcrição p53 e fatores de transcrição basal como TFIIE-TFIIF que poderiam contribuir para o aumento da atividade transcricional (figura 8) (31).

Dimerização do Receptor do Hormônio Tireoideano

Já está bem documentado que a formação de heterodímeros entre TR e RXR aumenta a ligação do receptor ao DNA, tanto *in vitro* como *in vivo*, e estimula a transcrição gênica. Geralmente, quando o RXR está dimerizado com VDR, TR ou RAR em DRs, o

Figura 8. Modelo de ativação da transcrição pelo receptor do hormônio tireoideano: a ligação do T₃ ao TR modifica sua estrutura conformacional, desfazendo sua interação com o corepressor. O TR passa, a seguir, a interagir com o complexo de co-ativadores, acetilando histonas e relaxando a cromatina na região promotora. Estas modificações permitem a organização da maquinaria de transcrição basal e ativação da transcrição.

complexo formado não responde ao ligante do RXR, e é por esta razão que o RXR é considerado um parceiro silencioso. Isso ocorre porque o TR induz uma alteração alostérica no LBD do RXR, que o impede de se ligar ao ácido 9-cis-retinóico (3,5,10).

Os receptores nucleares contêm duas regiões independentes para a dimerização, uma no LBD e outra no DBD. Acredita-se que a dimerização ocorra em dois estágios, um entre os LBDs, ainda quando os TRs estão em solução e o segundo entre os DBDs, após a ligação dos TRs ao DNA (10,58-60). Na associação entre os heterodímeros TR/RXR em DR-4, os aminoácidos do segundo dedo de zinco do RXR associam-se com os aminoácidos do primeiro dedo de zinco do TR, adotando uma conformação onde o RXR se liga no hexâmero AGGTCA situado na região 5' e o TR se liga no hexâmero AGGTCA situado na região 3' (22,61).

Recentemente, utilizando mutações nos aminoácidos na superfície do LBD do TR, Ribeiro e cols. identificaram um núcleo de aminoácidos hidrofóbicos nas hélices 10 e 11 do receptor que está envolvido na dimerização do TR. Os resultados mostraram que uma mesma superfície no LBD é empregada para a dimerização do TR em DR-4 e F2, indicando que a homodimerização ou heterodimerização nestes TREs independe da orientação e espaçamento dos hexâmeros AGGTCA. Entretanto, no palíndromo TRE_{pal}, nenhuma mutação foi capaz de impedir a homodimerização do TR, sugerindo que, neste elemento, a banda composta por supostos "homodímeros" é, na verdade, constituída por dois monômeros. Além disso, este estudo mostrou que, dos aminoácidos hidrofóbicos envolvidos, a leucina 422 (L422) do LBD do TR₁ é o resíduo que

cumprir um papel crítico tanto para a homo quanto para a heterodimerização do TR (62). Mais recentemente, observamos em células U937 que a mutação da leucina 422 por arginina (L422R) diminui em aproximadamente 50% a atividade transcrricional do TR no elemento responsivo DR-4, e praticamente extingue a transcrição no elemento responsivo de palíndromo invertido. Já no elemento responsivo TRE-pal, esta mutação aumenta a atividade transcrricional do TR (dados não publicados). Estes resultados sugerem que é possível que os homodímeros exerçam um papel na atividade transcrricional induzida pelo T₃ (dados não publicados).

Em solução, o TR parece utilizar outras superfícies para se homodimerizar, pois já foi observada a presença de tetrâmeros de TR em solução. Além disso, a adição de T₃ promove a dissociação dos tetrâmeros e aumenta a formação de dímeros (dados não publicados). É possível que esses tetrâmeros de TR apresentem uma organização semelhante à do RXR que, em solução, pode-se organizar como dímeros, sob a forma de um U onde os DBD estão orientados de frente um para o outro, formando um ângulo de 10° associados com uma extensa área de interface dos LBDs, ou ainda podem estar agrupados como de tetrâmeros, sob a forma de X (63).

A Região de Dobradiça

Considerando que o modelo atual de dimerização sugere que resíduos idênticos no LBD-TR estão envolvidos na homodimerização ou heterodimerização do TR com o RXR (62), e que tanto o homo quanto o heterodímero ligam-se aos diferentes elementos responsivos (DR-4, F2 e TREpal) independentemente da orientação das bases AGGTCA, é necessário que os DBDs girem em até 180 graus em relação aos LBDs. Para isto, a região que conecta o DBD ao LBD deve atuar como uma dobradiça, permitindo a realização deste movimento de rotação (figura 9) (8,10,21,41,64).

Esta hipótese, apesar de amplamente aceita por vários grupos de pesquisadores, não foi ainda confirmada, assim como não se conhecem ao certo que aminoácidos compõem a região de dobradiça. Com a determinação da primeira estrutura cristalográfica do LBD do TR 1 de rato (23) e, mais recentemente, do LBD do TR 1 humano (24), foi sugerido que a região de dobradiça seria correspondente à alça composta de 6 aminoácidos (209 a 214 - GHKPEP) que separa a -hélice carboxi-terminal do DBD da -hélice amino-terminal do LBD (24). No entanto, estudos com TRs mutantes realizados em nosso laboratório não confirmaram esta região como sendo a de dobradiça, visto que a deleção deste segmento ou a substituição destes

Figura 9. Modelo da ligação do TR aos diferentes elementos responsivos: o TR se dimeriza (homo ou heterodímero) através da interface de dimerização presente no domínio de ligação ao ligante (LBD). Este dímero se liga ao DNA através do domínio de ligação ao DNA (DBD). O LBD está ligado ao DBD por uma região conectora (*Hinge*). Para que o DBD possa se ligar aos TREs em diferentes orientações é necessário que a região conectora tenha flexibilidade para permitir rotações entre o DBD e LBD de até 180 graus, funcionando como uma dobradiça.

aminoácidos por prolina, que a torna rígida, não modificou a capacidade do TR 1 em se ligar aos diferentes elementos responsivos, assim como não alterou sua capacidade de ativar a transcrição em DR-4, F2 ou TREpal (dados não publicados).

Estrutura Cristalográfica do LBD e sua Função na Ação do TR

Até o momento, a estrutura cristalográfica dos receptores nucleares foi determinada para o domínio do LBD e para o DBD separadamente. A estrutura completa de qualquer receptor nuclear ainda não foi definida, em virtude das dificuldades técnicas de se expressar e cristalizar todos os domínios simultaneamente. Em relação ao TR, o LBD é funcionalmente complexo, executando várias atividades, incluindo a ligação ao hormônio, dimerização do receptor e interação com correpressores e co-ativadores, ou seja, repressão da transcrição no estado de apo-receptor e ativação induzida pelo hormônio. A estrutura cristalográfica de muitos LBDs de receptores nucleares, incluindo a do TR 1 de ratos e TR 1 humano, é muito similar. O LBD do TR é composto por 12 -hélices (H) e 4 folhas (S) organizadas em 3 camadas (figura 10b) (23,65). A camada central contém o hormônio alojado em seu interior hidrofóbico e 4 -hélices antiparalelas H5-6, H9 e H10. As -hélices H1, H2, H3, H4, e S1 formam uma das faces do LBD, e as -hélices H7, H8, H9, H11 e H12 formam a face oposta (23).

Figura 10. Cristais de LBD de TR 1 humano (a) e sua estrutura cristalográfica (b). (a) O LBD do TR foi cristalizado a 4°C, em tampão contendo 70mM de cacodilato de sódio pH 7,7 e 1,4M de acetato de sódio. (b) Demonstração das α -hélices e das fitas β que compõem o LBD em presença do hormônio, que se aloja no centro da proteína. Observações: H0 hélice representa a última hélice do DBD. H2 e S2 não são visualizadas. A cristalização e determinação da estrutura do TR foi realizada pelo Grupo de Cristalografia de Proteínas e Biologia Estrutural do Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo.

Nesta estrutura, o ligante se aloja na cavidade localizada no interior do LBD. A parte superior desta cavidade é composta por segmentos da H5-6, a parte inferior por partes das H7, H8 e pelo *looping* entre estas duas hélices. Já as laterais são formadas por segmentos da H2, H3, H11, H12 e pelo *looping* entre S3 e S4 (23). O volume da cavidade é de 600Å³, ou seja, um valor suficiente para alojar os 530Å do hormônio.

A importância do conhecimento da estrutura cristalográfica do TR foi fundamental para a compreensão do seu mecanismo molecular da ação. Desse modo, utilizando-se a estrutura cristalográfica, foi possível realizar uma série de mutações pontuais nos aminoácidos que se encontram na superfície do LBD do TR 1 humano (hTR 1), que levaram à identificação da superfície de interação do TR 1 com os co-ativadores. Como estas mutações foram posicionadas somente na superfície do TR e não em seu interior, a estrutura global do TR não foi rompida, e as alterações na função que por ventura apareceram foram secundárias à perda da função exercida pelo aminoácido mutado. Neste estudo, Feng e cols. demonstraram a participação da hélice 12, e de resíduos da hélice 3 na interação com co-ativadores. Esta região de interação com co-ativadores consiste em uma pequena superfície composta por resíduos das hélices 3, 5, 6 e 12, pois mutações pontuais nestas hélices impedem a ligação dos co-ativadores ao LBD do TR, que, conseqüentemente, perde sua capacidade de ativar a transcrição pelo T₃ (66).

Considerando que, por dificuldades técnicas envolvidas na cristalização, a estrutura do TR na ausência do hormônio ainda não foi determinada. Portanto, as alterações conformacionais induzidas pelo

ligação do hormônio ao TR não foram ainda determinadas com precisão. Por este motivo, para se ampliar o conhecimento sobre as potenciais mudanças conformacionais do TR na presença e na ausência do ligante, a estrutura cristalográfica do TR ligado ao hormônio foi comparada com a do RXR humano, sem este estar ligado ao ácido 9-cis-retinóico (67). Esta comparação revelou que a maioria das hélices do TR e RXR podem ser sobrepostas, e a principal alteração conformacional observada com a presença do hormônio ligado ao TR está na hélice 12. Quando o receptor nuclear está sem o ligante, a hélice 12 encontra-se aberta e, com a ligação do hormônio ao receptor, esta hélice encontra-se dobrada sobre o corpo do receptor. Conseqüentemente, neste modelo, a superfície de interação com o co-ativador é formada quando a hélice 12 se fecha sobre o LBD (3,41).

Repressão da Transcrição Mediada pelo Hormônio Tireoideano

Apesar da ativação da transcrição regulada por T₃ estar mais bem definida, o hormônio tireoideano também reprime a transcrição de vários genes, entre eles um dos mais importantes são os genes que codificam o Hormônio Liberador de Tirotropina (TRH) e o hormônio estimulante da tireóide (TSH) (31,68,69). Através do mecanismo de feedback, o T₃ regula negativamente a atividade transcricional destes genes via elementos responsivos negativos (nTREs) (70). Diferentemente dos elementos responsivos positivos (pTREs), uma sequência consenso para os nTREs ainda não foi estabelecida. Porém, existem evidências de que os genes alvos podem adotar mecanismos distintos para este tipo de repressão, e que uma interação TR-DNA não seja absolutamente necessária para a repressão pelo T₃. No caso dos genes TRH, TSH e TSH, observa-se que a transcrição é suprimida pelo T₃ e ativada pelo TR quando este não está ligado ao T₃. Ademais, é interessante observar que, de maneira oposta ao que ocorre na ativação da transcrição, existem evidências de que os correpressores estão envolvidos na ativação da transcrição por TR sob forma de apo-receptor (68), e os co-ativadores na repressão induzida pelo TR ligado a T₃. Desta forma, mutantes de TR que não se interagem com moléculas correpressoras apresentam redução da ativação da transcrição dos genes TRH e TSH na ausência do hormônio, e a super-expressão de NCoR e SMRT provoca o efeito contrário. Além disto, camundongos com deleção do gene que codifica o co-ativador SRC-1 apresentam resistência à supressão da síntese e secreção de TSH pelo T₃ (31). Neste mesmo sentido, mutações no TR que impedem a ligação

do TR com proteínas co-ativadoras p160 suprimem a repressão mediada pelo T_3 no promotor do TSH, mas não impede a ativação da transcrição mediada pelo TR sem estar ligado ao T_3 (68).

Para a regulação da atividade do promotor do TSH, no qual o TR não se liga diretamente ao DNA, o TR, em solução e não ligado ao T_3 , recruta os cor-repressores que, por sua vez, seqüestram as histonas de-acetilases (HDAC) que reprimem a transcrição. O seqüestro destas de-acetilases não permite a condensação da cromatina, favorecendo a ativação da transcrição. Posteriormente, com a ligação do T_3 ao TR, ocorre a dissociação do complexo correpressor/HDAC e TR, que agora passa a recrutar co-ativadores que seqüestram as histonas acetilases (HATs) e outros fatores de transcrição que relaxam a cromatina. Conseqüentemente, a ausência de co-ativadores e HATs acaba por favorecer a repressão dependente de ligante (68). Na repressão da transcrição que não envolve a associação do TR ao DNA, o TR pode se interagir com outras proteínas que estão ligadas diretamente ao DNA, como, por exemplo, o complexo AP-1 (composto pelo dímero de c-fos e c-jun) (71).

Importância da Estrutura no Desenvolvimento de Agonistas e Antagonistas de TR

Muitos dos efeitos farmacológicos dos THs poderiam ser utilizados no tratamento de patologias não relacionadas à tireóide, como, por exemplo, a hiperlipidemia e obesidade (5,72). No entanto, o TH não é utilizado no tratamento destas condições, porque os efeitos benéficos são acompanhados pelo aparecimento de efeitos colaterais importantes, como, por exemplo, taquicardia e arritmias atriais. Logo, análogos do HTs, que promovam os efeitos desejáveis sem induzir as ações deletérias, seriam de grande interesse na área médica.

Como a distribuição e a função das duas isoformas de TR (TR₁ e TR₂) são, em grande parte, distintas e tecido específicas, o desenvolvimento de análogos seletivos para TR₁, que atuam predominantemente no metabolismo e são mais expressos no fígado e muito pouco no coração, podem se constituir uma nova classe de medicamentos para o tratamento por exemplo da obesidade, hipercolesterolemia e níveis elevados de lipoproteína (73).

O conhecimento da estrutura das isoformas e do TR permitiu o desenvolvimento de alguns agonistas seletivos para TR₁, como, por exemplo, o GC-1 e o KB 141. Em ratos com hipotireoidismo, GC-1, que possui uma afinidade 10 vezes maior para TR₁ que TR₂, reduziu os níveis de colesterol e de TSH sem modificar a frequência cardíaca (74,75). O mesmo foi observado

com o KB-141, que se liga à isoforma TR₁ 14 vezes melhor do que à TR₂. KB-141 diminuiu os níveis de colesterol plasmáticos em camundongos, ratos e primatas sem causar a taquicardia observada nos animais tratados com T_3 . Os resultados são animadores, pois, em primatas, o KB-141 diminuiu o colesterol em 35%, a lipoproteína (a) em 50% e o peso corpóreo em 7%, após somente uma semana de tratamento (73).

Os análogos TR₁ seletivos também são úteis na definição das isoformas envolvidas nas diversas funções do HT. Desta forma, com a utilização de GC-1, foi possível demonstrar que a termogênese e a perda óssea induzida por T_3 é mediada mais especificamente por TR₁ com pouca participação do TR₂ (76,77). Todavia, o interesse não reside somente nos agonistas seletivos, o desenvolvimento de antagonistas do TR podem ser de grande utilidade para o tratamento do hipertireoidismo, principalmente durante os episódios de tireotoxicose quando, em função da meia-vida longa dos hormônios tireoideanos, os efeitos benéficos da inibição da síntese de HT não são obtidos rapidamente. Aliando o conhecimento da relação entre estrutura e função, que mostra a importância da aproximação da hélice 12 sobre o corpo do TR para o recrutamento de co-ativadores e ativação da transcrição, o antagonista do TR deve ser capaz de inserir-se na cavidade ocupada normalmente pelo T_3 e possuir uma extensão que impeça a movimentação da hélice 12. Utilizando-se dessa estratégia, pesquisadores da Universidade da Califórnia, São Francisco, desenvolveram o NH-3, um antagonista de TR que se mostrou efetivo tanto em ensaios *in vitro* como *in vivo* (78).

Síndrome de Resistência ao Hormônio Tireoideano

A síndrome de resistência ao hormônio tireoideano (RTH-*resistance to thyroid hormone*) é caracterizada pela resistência à ação do T_3 , resultando, freqüentemente, em sinais de hipotireoidismo ou eutireoidismo associado a de hipertireoidismo (79). Os indivíduos não tratados freqüentemente mantêm um estado metabólico normal às custas de altos níveis de hormônio tireoideano circulante mantidos pela elevação na secreção de TSH. Entretanto, essa compensação parece ser variável entre os diversos pacientes. Algumas características clínicas comuns a RTH são bócio, retardo mental, déficit de atenção, taquicardia, crescimento e maturação dos ossos alterados e problemas de audição (29,80-82).

A maioria dos pacientes possui resistência generalizada envolvendo os tecidos periféricos e a hipófise. Entretanto, existem pacientes com resistência pitui-

tária ao hormônio tireoideano e responsividade periférica normal (29).

Após a clonagem dos TRs, demonstrou-se que a resistência ao HT está relacionada ao gene TR . Até o presente, não há qualquer caso de mutações no TR . Desde então, inúmeros estudos relataram que os indivíduos afetados são heterozigotos para mutações no gene TR , condizentes com o modo de herança dominante encontrado nesta doença (83,84). A expressão “dominância negativa” é freqüentemente utilizada para caracterizar esta síndrome, para justificar o fato de que a proteína codificada pelo alelo afetado inibe a função da proteína normal. Quase todas as mutações presentes na RTH estão agrupadas em três regiões principais ou *hotspots* no LBD. Estas mutações alteram uma ou mais características funcionais do receptor, principalmente a afinidade pelo T₃ e a ligação com co-reguladores (proteínas co-ativadoras ou co-repressores) (3,5). Entretanto, estas mutações geralmente preservam a capacidade do TR para se ligar ao DNA e formar homo e heterodímeros (3,29,80,81).

O mecanismo molecular envolvido na dominância negativa exercida pelo TR mutado parece ser múltiplo. Como os mutantes para TR são transcricionalmente inativos, eles podem inibir o TR normal por competirem pela ligação ao TRE. Neste sentido, Nagaya e cols. observaram que mutações introduzidas no DBD do alelo mutante às quais impediam a sua ligação ao DNA atenuavam a atividade dominante negativa (85). Além disto, foi demonstrado que os TRs dominantes negativos se interagem com maior afinidade aos correpressores, de forma que a ligação do hormônio não promoveria a dissociação do correpressor e impediria a ativação da transcrição (86).

Mais recentemente, observamos que a dimerização também está envolvida no mecanismo molecular envolvido com o efeito dominante negativo, uma vez que o efeito dominante negativo do TR G345R ou F451X (mutações descritas na RTH) é atenuado quando se acrescenta a mutação (L422R), que impede a dimerização do receptor (dados não publicados).

Ações Não Genômicas do Hormônio Tireoideano

Não existem dúvidas quanto ao fato de que a maioria dos efeitos dos HTs ocorre via regulação transcricional de genes regulados pelo TR ou TR . Entretanto, existem várias evidências de que os HTs, incluindo o T₃ e T₄, podem exercer alguns de seus efeitos via mecanismos não genômicos, pois são efeitos que ocorrem em frações de segundos e não são inibidos pela adição da cicloheximida, substância que bloqueia a síntese protéica. Por esta

via, os HTs ativam cinases, calmodulina, captação de glicose em vários tecidos e modulação do transporte de cálcio. Este efeito pode estar localizado na membrana plasmática ou na mitocôndria (87). Mais recentemente, por exemplo, foi demonstrado que T₄, de forma mais intensa que T₃, ativa a cascata de sinalização da MAP cinase (*mitogen-activated protein kinase*), que, por sua vez, fosforila TR em resíduos de serina localizados no DBD (88). O achado de que o efeito do T₄ foi maior do que o de T₃ sugere que os receptores de membrana são estruturalmente diferentes dos receptores localizados no núcleo. No entanto, a importância fisiológica destes achados ainda não é totalmente conhecida.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Cristina Luisa Simeoni pela ajuda na organização deste trabalho e a Rilva Grigório Pinho pelo apoio técnico.

REFERÊNCIAS

1. Norman AW, Litwack G. Hormones. San Diego: Academic Press; 1997.
2. Ribeiro RCJ, Apriletti JW, West BL, Wagner RL, Fletterick RJ, Schaufele F, et al. The molecular biology of thyroid hormone action. *Ann NY Acad Sci* 1995;758:366-89.
3. Yen PM. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Rev* 2001;81:1097-142.
4. Hennemann G, Docter R, Friesema EC, de Jong M, Krenning EP, Visser TJ. Plasma membrane transport of thyroid hormones and its role in thyroid hormone metabolism and bioavailability. *Endocr Rev* 2001;22:451-76.
5. Ribeiro RCJ, Apriletti JW, Wagner RL, West BL, Feng W, Huber R, et al. Mechanisms of Thyroid Hormone Action: Insights from X-ray Crystallographic and Functional Studies. *Recent Prog Horm Res* 1998;53:351-94.
6. Robinson-Rechavi M, Carpentier AS, Duffraisse M, Laudet V. How many nuclear hormone receptors are there in the human genome? *Trends Genet* 2001;17:554-6.
7. Ribeiro RCJ, Kushner PJ, Baxter JD. The nuclear hormone receptor gene superfamily. *Ann Rev Med* 1995;46:443-53.
8. Glass CK. Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers. *Endocr Rev* 1994;15:391-407.
9. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, et al. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 1995;83:835-9.
10. Mangelsdorf DJ, Evans RM. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 1995;83:841-50.
11. Giguere V. Orphan nuclear receptors: from gene to function. *Endocr Rev* 1999;20:689-725.

12. Olefsky JM. Nuclear receptor minireview series. *J Biol Chem* 2001;276:36863-4.
13. Neves FAR, Webb P, Ribeiro RCJ, Baxter, JD. Syndrome of Resistance to glucocorticoid and mineralocorticoid hormones. In: *Genetics in Endocrinology*, Lippincott Williams & Wilkins 2002.
14. Mangelsdorf DJ. Vitamin A receptors. *Nutr Rev* 1994; 52:S32-44.
15. Mangelsdorf DJ, Umesono K, Kliewer SA, Borgmeyer U, Ong ES, Evans RM. A direct repeat in the cellular retinol-binding protein type II gene confers differential regulation by RXR and RAR. *Cell* 1991;66:555-61.
16. Warnmark A, Treuter E, Wright AP, Gustafsson JA. Activation functions 1 and 2 of nuclear receptors: molecular strategies for transcriptional activation. *Mol Endocrinol* 2003;17:1901-9.
17. Wu Y, Xu B, Koenig RJ. Thyroid hormone response element sequence and the recruitment of retinoid X receptors for thyroid hormone responsiveness. *J Biol Chem* 2001;276:3929-36.
18. Umesono K, Evans RM. Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. *Cell* 1989;57:1139-46.
19. Glass CK, Rosenfeld MG. The co-regulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev* 2000;14:121-41.
20. McKenna NJ, O'Malley BW. Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and co-regulators. *Cell* 2002;108:465-74.
21. Kurokawa R, Yu VC, Naar A, Kyakumoto S, Han Z, Silverman S, et al. Differential orientations of the DNA-binding domain and carboxy-terminal dimerization interface regulate binding site selection by nuclear receptor heterodimers. *Genes Dev* 1993;7:1423-35.
22. Rastinejad F, Perlmann T, Evans RM, Sigler PB. Structural determinants of nuclear receptor assembly on DNA direct repeats. *Nature* 1995;375:203-11.
23. Wagner RL, Apriletti JW, McGrath ME, West BL, Baxter JD, Fletterick RJ. A structural role for hormone in the thyroid hormone receptor. *Nature* 1995;378:690-7.
24. Wagner RL, Huber BR, Shiao AK, Kelly A, Cunha Lima ST, Scanlan TS, et al. Hormone selectivity in thyroid hormone receptors. *Mol Endocrinol* 2001;15:398-410.
25. Flamant F, Samarut J. Thyroid hormone receptors: lessons from knockout and knock-in mutant mice. *Trends Endocrinol Metab* 2003;14:85-90.
26. Lazar MA. Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities. *Endocr Rev* 1993;14:184-93.
27. Williams GR. Cloning and characterization of two novel thyroid hormone receptor beta isoforms. *Mol Cell Biol* 2000;20:8329-42.
28. Hodin RA, Lazar MA, Wintman BI, Darling DS, Koenig RJ, Larsen PR, et al. Identification of a thyroid hormone receptor that is pituitary-specific. *Science* 1989;244:76-9.
29. Refetoff S, Weiss RE, Usala SJ. The syndromes of resistance to thyroid hormone. *Endocr Rev* 1993;14:348-99.
30. Lin KH, Zhu XG, Hsu HC, Chen SL, Shieh HY, Chen ST, et al. Dominant negative activity of mutant thyroid hormone alpha1 receptors from patients with hepatocellular carcinoma. *Endocrinology* 1997;138:5308-15.
31. Wu Y, Koenig RJ. Gene regulation by thyroid hormone. *Trends Endocrinol Metab* 2000;11:207-11.
32. Abel ED, Moura EG, Ahima RS, Campos-Barros A, Pazos-Moura CC, Boers ME, et al. Dominant inhibition of thyroid hormone action selectively in the pituitary of thyroid hormone receptor-beta null mice abolishes the regulation of thyrotropin by thyroid hormone. *Mol Endocrinol* 2003;17:1767-76.
33. Shibusawa N, Hashimoto K, Nikrodhanond AA, Liberman MC, Applebury ML, Liao XH, et al. Thyroid hormone action in the absence of thyroid hormone receptor DNA-binding in vivo. *J Clin Invest* 2003;112:588-97.
34. Ritchie JW, Shi YB, Hayashi Y, Baird FE, Muchekeh RW, Christie GR, et al. A role for thyroid hormone transporters in transcriptional regulation by thyroid hormone receptors. *Mol Endocrinol* 2003;17:653-61.
35. Ribeiro RCJ, Cavalieri RR, Lomri N, Rahmaoui CM, Baxter JD, Scharschmidt BF. Thyroid hormone export regulates cellular hormone content and response. *J Biol Chem* 1996;271:17147-51.
36. Cavalieri RR, Simeoni LA, Park SW, Baxter JD, Scharschmidt BF, Ribeiro RC, et al. Thyroid hormone export in rat FRTL-5 thyroid cells and mouse NIH-3T3 cells is carrier-mediated, verapamil-sensitive, and stereospecific. *Endocrinology* 1999;140:4948-54.
37. Neves FA, Cavalieri RR, Simeoni LA, Gardner DG, Baxter JD, Scharschmidt BF, et al. Thyroid hormone export varies among primary cells and appears to differ from hormone uptake. *Endocrinology* 2002;143:476-83.
38. Chen S, Cui J, Nakamura K, Ribeiro RC, West BL, Gardner DG. Co-activator-vitamin D receptor interactions mediate inhibition of the atrial natriuretic peptide promoter. *J Biol Chem* 2000;275:15039-48.
39. Williams GR, Ga B. Thyroid hormone response elements. In: *Molecular endocrinology: Basic concepts and clinical correlations*. Weintraub BD, editor. New York:Raven Press; 1995.p.217-39.
40. Ribeiro RC, Kushner PJ, Apriletti JW, West BL, Baxter JD. Thyroid hormone alters *in vitro* DNA binding of monomers and dimers of thyroid hormone receptors. *Mol Endocrinol* 1992;6:1142-52.
41. Ribeiro RC, Apriletti JW, Wagner RL, Feng W, Kushner PJ, Nilsson S, et al. X-ray crystallographic and functional studies of thyroid hormone receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1998;65:133-41.
42. Fondell JD, Brunel F, Hisatake K, Roeder RG. Unliganded thyroid hormone receptor alpha can target TATA-binding protein for transcriptional repression. *Mol Cell Biol* 1996;16:281-7.
43. Horlein AJ, Naar AM, Heinzel T, Torchia J, Gloss B, Kurokawa R, et al. Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* 1995;377:397-404.
44. Chen JD, Evans RM. A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* 1995;377:454-7.
45. Perissi V, Staszewski LM, McInerney EM, Kurokawa R, Krones A, Rose DW, et al. Molecular determinants of

- nuclear receptor-co-repressor interaction. *Genes Dev* 1999;13:3198-208.
46. Nagy L, Kao HY, Love JD, Li C, Banayo E, Gooch JT, et al. Mechanism of co-repressor binding and release from nuclear hormone receptors. *Genes Dev* 1999;13:3209-16.
 47. Webb P, Anderson CM, Valentine C, Nguyen P, Marimuthu A, West BL, et al. The nuclear receptor co-repressor (N-CoR) contains three isoleucine motifs (I/LXXII) that serve as receptor interaction domains (IDs). *Mol Endocrinol* 2000;14:1976-85.
 48. Makowski A, Brzostek S, Cohen RN, Hollenberg AN. Determination of nuclear receptor co-repressor interactions with the thyroid hormone receptor. *Mol Endocrinol* 2003;17:273-86.
 49. Zhang J, Lazar MA. The mechanism of action of thyroid hormones. *Ann Rev Physiol* 2000;62:439-66.
 50. Heery DM, Kalkhoven E, Hoare S, Parker MG. A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature* 1997;387:733-6.
 51. McInerney EM, Rose DW, Flynn SE, Westin S, Mullen TM, Krones A, et al. Determinants of co-activator LXXLL motif specificity in nuclear receptor transcriptional activation. *Genes Dev* 1998;12:3357-68.
 52. Onate SA, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW. Sequence and characterization of a co-activator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science* 1995;270:1354-7.
 53. Voegel JJ, Heine MJ, Zechel C, Chambon P, Gronemeyer H. TIF2, a 160kDa transcriptional mediator for the ligand-dependent activation function AF-2 of nuclear receptors. *EMBO J* 1996;15:3667-75.
 54. Torchia J, Rose DW, Inostroza J, Kamei Y, Westin S, Glass CK, et al. The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function. *Nature* 1997;387:677-84.
 55. Xu J, Qiu Y, DeMayo FJ, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW. Partial hormone resistance in mice with disruption of the steroid receptor co-activator-1 (SRC-1) gene. *Science* 1998;279:1922-5.
 56. Weiss RE, Xu J, Ning G, Pohlenz J, O'Malley BW, Refetoff S. Mice deficient in the steroid receptor co-activator 1 (SRC-1) are resistant to thyroid hormone. *Embo J* 1999;18:1900-4.
 57. Li D, Desai-Yajnik V, Lo E, Schapira M, Abagyan R, Samuels HH. NRIF3 is a novel co-activator mediating functional specificity of nuclear hormone receptors. *Mol Cell Biol* 1999;19:7191-202.
 58. Kurokawa R, Di Renzo J, Boehm M, Sugarman J, Gloss B, Rosenfeld MG, et al. Regulation of retinoid signaling by receptor polarity and allosteric control of ligand binding. *Nature* 1994;371:528-31.
 59. Dahlman-Wright K, Grandien K, Nilsson S, Gustafsson JA, Carlstedt-Duke J. Protein-protein interactions between the DNA-binding domains of nuclear receptors: influence on DNA-binding. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1993;45:239-50.
 60. Hirst MA, Hinck L, Danielsen M, Ringold GM. Discrimination of DNA response elements for thyroid hormone and estrogen is dependent on dimerization of receptor DNA binding domains. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:5527-31.
 61. Zechel C, Shen XQ, Chambon P, Gronemeyer H. Dimerization interfaces formed between the DNA binding domains determine the cooperative binding of RXR/RAR and RXR/TR heterodimers to DR5 and DR4 elements. *EMBO J* 1994;13:1414-24.
 62. Ribeiro RCJ, Feng W, Wagner RL, Costa HRM, Pereira AC, Apriletti JW, et al. Definition of the surface in the Thyroid Hormone Receptor ligand binding domain for association as homodimers and heterodimers with retinoid X receptor. *J Biol Chem* 2001.
 63. Fischer H, Dias SM, Santos MA, Alves AC, Zanchin N, Craievich AF, et al. Low resolution structures of the retinoid X receptor DNA-binding and ligand-binding domains revealed by synchrotron X-ray solution scattering. *J Biol Chem* 2003;278:16030-8.
 64. Aranda A, Pascual A. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev* 2001;81:1269-304.
 65. Wurtz JM, Bourguet W, Renaud JP, Vivat V, Chambon P, Moras D, et al. A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors. *Nature Struct Biol* 1996;3:87-94.
 66. Feng W, Ribeiro RCJ, Wagner RL, Nguyen H, Apriletti JW, Fletterick RJ, et al. Hormone-Dependent Co-activator Binding to a Hydrophobic Cleft on Nuclear Receptors. *Science* 1998;280:1747-9.
 67. Bourguet W, Ruff M, Chambon P, Gronemeyer H, Moras D. Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR-alpha. *Nature* 1995;375:377-82.
 68. Tagami T, Park Y, Jameson JL. Mechanisms that mediate negative regulation of the thyroid-stimulating hormone alpha gene by the thyroid hormone receptor. *J Biol Chem* 1999;274:22345-53.
 69. Sasaki S, Lesoon-Wood LA, Dey A, Kuwata T, Weintraub BD, Humphrey G, et al. Ligand-induced recruitment of a histone deacetylase in the negative-feedback regulation of the thyrotropin beta gene. *EMBO J* 1999;18:5389-98.
 70. Chin WW, Carr FE, Burnside J, Darling DS. Thyroid hormone regulation of thyrotropin gene expression. *Rec Prog Horm Res* 1993;48:393-414.
 71. Lazar MA. Thyroid hormone action: a binding contract. *J Clin Invest* 2003;112:497-9.
 72. McKenna NJ, Lanz RB, O'Malley BW. Nuclear receptor co-regulators: Cellular and Molecular Biology. *The Endocrine Society* 1999;20:321-44.
 73. Grover GJ, Mellstrom K, Ye L, Malm J, Li YL, Bladh LG, et al. Selective thyroid hormone receptor-beta activation: a strategy for reduction of weight, cholesterol, and lipoprotein (a) with reduced cardiovascular liability. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:10067-72.
 74. Trost SU, Swanson E, Gloss B, Wang-Iverson DB, Zhang H, Volodarsky T, et al. The thyroid hormone receptor-beta-selective agonist GC-1 differentially affects plasma lipids and cardiac activity. *Endocrinology* 2000;141:3057-64.
 75. Chiellini G, Apriletti JW, Yoshihara HA, Baxter JD, Ribeiro RC, Scanlan TS. A High Affinity Subtype-Selective Agonist Ligand for the Thyroid Hormone Receptor. *Chem Biol* 1998;5:299-306.
 76. Ribeiro MO, Carvalho SD, Schultz JJ, Chiellini G, Scanlan TS, Bianco AC, et al. Thyroid hormone — sympathetic

- interaction and adaptive thermogenesis are thyroid hormone receptor isoform — specific. *J Clin Invest* 2001;108:97-105.
77. Freitas FR, Moriscot AS, Jorgetti V, Soares AG, Passarelli M, Scanlan TS, et al. Spared bone mass in rats treated with thyroid hormone receptor TR β -selective compound GC-1. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003;285:E1135-E41.
78. Webb P, Nguyen NH, Chiellini G, Yoshihara HA, Cunha Lima ST, Apriletti JW, et al. Design of thyroid hormone receptor antagonists from first principles. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2002;83:59-73.
79. Safer JD, Langlois MF, Cohen R, Monden T, John-Hope D, Madura J, et al. Isoform variable action among thyroid hormone receptor mutants provides insight into pituitary resistance to thyroid hormone. *Mol Endocrinol* 1997;11:16-26.
80. Yen PM. Molecular basis of resistance to thyroid hormone. *Trends Endocrinol Metab* 2003;14:327-33.
81. Refetoff S. Resistance to thyroid hormone with and without receptor gene mutations. *Ann Endocrinol (Paris)* 2003;64:23-5.
82. Beck-Peccoz P, Chatterjee VK. The variable clinical phenotype in thyroid hormone resistance syndrome. *Thyroid* 1994;4:225-32.
83. Adams M, Matthews C, Collingwood TN, Tone Y, Beck-Peccoz P, Chatterjee KK. Genetic analysis of 29 kindreds with generalized and pituitary resistance to thyroid hormone. Identification of thirteen novel mutations in the thyroid hormone receptor beta gene. *J Clin Invest* 1994;94:506-15.
84. Chatterjee VK. Resistance to thyroid hormone. *Horm Res* 1997;48:43-6.
85. Nagaya T, Madison LD, Jameson JL. Thyroid hormone receptor mutants that cause resistance to thyroid hormone. Evidence for receptor competition for DNA sequences in target genes. *J Biol Chem* 1992;267:13014-9.
86. Safer JD, Cohen RN, Hollenberg AN, Wondisford FE. Defective release of co-repressor by hinge mutants of the thyroid hormone receptor found in patients with resistance to thyroid hormone. *J Biol Chem* 1998;273:30175-82.
87. Davis PJ, Davis FB. Nongenomic actions of thyroid hormone. *Thyroid* 1996;6:497-504.
88. Lin HY, Zhang S, West BL, Tang HY, Passaretti T, Davis FB, et al. Identification of the putative MAP kinase docking site in the thyroid hormone receptor-beta1 DNA-binding domain: functional consequences of mutations at the docking site. *Biochemistry* 2003;42:7571-9.

Endereço para correspondência:

Francisco de Assis Rocha Neves
Laboratório de Farmacologia Molecular
Universidade de Brasília
Caixa Postal 4473
70919-970 Brasília, DF
Fax: (61) 347-4622
e.mail: chico@unb.br

Anexo 3

Human thyroid receptor forms tetramers in solution[‡].

Sandra M. G. Dias[#], Ana C. M Figueira[#], James W. Apriletti^{*}, John D. Baxter^{*§}, Paul Webb^{*}, Francisco A. R. Neves[±], Luiz A. Simeoni[±], Ralff C. J. Ribeiro[±] and Igor Polikarpov^{##*}.

From the [#]Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, Av. Trabalhador Saocarlense, 400, São Carlos, SP, Brazil, 13560-970, the ^{*}Diabetes Center, Metabolic Research Unit and Department of Medicine, University of California San Francisco, San Francisco, California, USA, 94143, and the [±]Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil, 70900-9101.

Running Title: Thyroid receptor forms tetramers

[‡] This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) to IP (300220/96-0 and 473875/2003-9), by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) grants #99/03387-4, 00/00021-8 and 02/02503-5 and by grants from the National Institutes of Health to J.D.B. (DK41842 and DK51281).

[§] Has proprietary interests in, and serves as a consultant and Deputy Director to, Karo Bio AB, which has commercial interests in this area of research.

^{**} To whom correspondence should be addressed: Dept. de Física e Informática, Universidade de São Paulo, Av Trabalhador São Carlense 400, São Carlos, SP, Brazil 13560-970. Tel.: 55-16-273-8088; Fax: 55-16-273-9881; E-mail: ipolikarpov@if.sc.usp.br.

ABSTRACT: Thyroid hormone receptors (TRs), like many members of the nuclear receptor superfamily, bind to DNA and activate transcription as heterodimers with the retinoid X receptor (RXR) or as homodimers or monomers. RXR also binds to DNA and activates transcription as homodimers but can, in addition, self-associate into homo-tetramers in the absence of ligand and DNA templates. It is thought that homo-tetramer formation serves to sequester excess RXRs into an inactive pool within the cell. Here, we report systematic studies of the multimeric state of a recombinant human TR beta 1 truncation (hTR β 1 Δ AB) that encompasses the complete DNA binding domain (DBD) and ligand binding domain (LBD) in solution. Native gel electrophoresis, chemical cross-linking, dynamic light scattering and gel filtration experiments reveal that hTR β 1 Δ AB forms a mixture of monomers, dimers and tetramers in solution. Like RXR, increasing protein concentration shifts the equilibrium between TR multimers toward tetramer formation whereas binding of cognate thyroid hormone (T₃) leads to dissociation of tetramers and increased formation of dimers. This work represents the first evidence that hTR β 1 forms homo-tetramers. The findings raise the possibility that tetramer formation provides an additional, and previously unsuspected, level of control of TR activity (through regulating the availability of TRs) and that the capacity for homo-tetramer formation may be more widespread in the nuclear receptor family than previously thought.

INTRODUCTION

Thyroid hormone (TH), of which 3,5,3'-triiodo-L-thyronine (T_3) is the most important form in mammals, is required for the normal function of nearly all tissues, with major effects on oxygen consumption and metabolic rate [1]. Indeed, disorders of the thyroid gland are among the most common endocrine problems. Although TH exerts its effects at a number of intracellular *loci*, its primary effects are on the transcriptional regulation of target genes. These effects are mediated by specific thyroid hormone receptors (TRs), which are members of the nuclear receptor superfamily, which also includes receptors for steroid hormones, vitamins A and D and a variety of fatty acid and cholesterol metabolites [1,2].

TRs are constitutively associated with chromatin and modulate gene expression by binding specific DNA sequences called thyroid response elements (TREs) that are found in the promoters of T_3 -regulated genes. TREs are composed of repeats of the consensus half-site AGGTCA in a variety of different orientations, including direct repeats spaced by four nucleotides (DR4), inverted palindromes (F2) and palindromes (for review see [3]). TR activities are primarily controlled by the presence of ligand. Unliganded TRs recruit co-repressor proteins such as N-CoR and SMRT, which, in turn, form part of a large corepressor complex that represses transcription of nearby genes (for review see [4,5]). Hormone binding induces changes in receptor conformation, that lead to corepressor release and subsequent recruitment of p160 co-activators such as GRIP1 and SRC-1 and the TRAP/DRIP complex [4,5]. TR activities are, however, also influenced by choice of multimeric state. TRs form heterodimers with retinoid X receptors (RXRs), but also function as homodimers or monomers [3].

The abbreviations used are: TR, thyroid hormone receptor; LBD, ligand binding domain; DBD, DNA binding domain; RXR, retinoid X receptor; T_3 , 3,5,3'-triiodo-L-thyronine; TRE, thyroid hormone response element; DR, direct repeat; N-CoR, nuclear receptor corepressor; SMRT, silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor; GRIP-1, glucocorticoid receptor interacting protein 1; SRC-1, Steroid Receptor Coactivator-1; TRAP, T_3 receptor associated protein; DRIP, vitamin receptor D interacting protein; DR-1, direct repeats spaced by 1 base pair; F2, inverted repeats with a 6-base pair separation.

TR homodimers recruit corepressors to DNA more efficiently than RXR-TR heterodimers [6, 7] and bind preferentially to F2 elements, possibly accounting for the increased ability of unliganded TRs to repress transcription from this type of response elements [8].

RXRs serve as heterodimer partners for many nuclear receptors [9, 10], but can also activate transcription in response to their cognate ligand, 9-cis retinoic acid, as homodimers bound to direct repeats of the AGGTCA half site spaced by a single nucleotide (DR1) [11]. RXR binds co-activators in response to hormone but only interacts weakly with co-repressors [12, 13, 14, 15, 16]. Thus, ligand-dependent activation of RXR does not involve the ligand-dependent co-regulator exchange described above for TR. RXR forms a mix of monomers, dimers and tetramers in solution [17, 18, 19]. 9-Cis retinoic acid induces rapid dissociation of tetramers into dimers and monomers [17, 18, 19, 20]. Moreover, tetramers bind poorly to DNA and oligonucleotides corresponding to the cognate RXR DR1 elements promote dissociation of apo-RXR (unliganded) tetramers into dimers [20]. It has therefore been suggested that homo-tetramer formation acts as an auto-silencing mechanism to sequester excess unliganded RXR into inactive pools within the cell [17, 18, 19, 20, 21, 22, 23]. Here, RXR interactions with its cognate ligand or response element would release active species, dimers and monomers, from the tetrameric pool where they would be available for DNA binding or heterodimer formation.

Analysis of the structural basis for dimer and tetramer formation suggests possible molecular mechanisms for the inactivity of RXR tetramers. Nuclear receptors are modular structures with separable DNA-binding and ligand-binding domains [24, 25, 26]. The ligand-binding domains (LBDs) participate in several activities, including hormone binding, transcriptional activation and repression and homo- and/or heterodimerization [25, 26] and, in the case of the RXR, homo-tetramer formation [27, 28]. The classic nuclear receptor dimer interface is located at the junction of LBD helices (H) 10 and 11 (or 9 and 10 in the nomenclature of the RXR) [29, 30]. RXR LBD homo-tetramers are composed of pairs of dimers linked through a large interface comprised of residues from H3 and H11 at the base of the LBD. In addition, LBD C-terminal H12 docks into a hydrophobic cleft composed of residues in H3 and H5 in the neighboring LBD to provide additional tetramer specific contacts [27]. H12 rearranges on

ligand binding to pack against the lower part of the H3-H5 cleft to form the co-activator binding pocket. Thus, ligand disrupts a key part of the tetramer interface (H12), thereby releasing active RXR dimers and monomers, and simultaneously promotes co-activator recruitment by these species. Our recent X-ray small angle scattering studies of RXR DBD-LBD region revealed low resolution structures of the dimer and tetramer forms [31]. The dimer is U-shaped with DBDs spaced at approximately 2 nm forming an angle of about 10° with respect to each other. The tetramer forms a more elongated X-shape composed of two dimers in head to head arrangement with the DBDs extended from the structure and spaced at about 6 nm. This arrangement could not readily form a dimer on direct repeat response elements and, thus, tetramer formation restricts DNA binding by altering the relative position of the DBDs.

While RXR self-association in solution is well understood, the way that the TR self-associates and role of hormone in regulating these processes are not well defined. Here, we report a systematic analysis of the multimeric state of TR in solution. Surprisingly, we find that the human TR (beta 1 isoform, hTR β 1) forms tetramers in solution, in addition to dimers and monomers. Like RXR, tetramer formation is favored by high protein concentrations and constrained by ligand (T_3 for TR) binding. Our results raise the possibility that tetramer formation provides an additional level of control of TR activity and represent the first evidence that the potential for nuclear receptor tetramer formation is not unique to RXR.

MATERIALS AND METHODS

Protein Expression and Purification. The human TR β 1 Δ AB construct including amino acid residues 102 to 461 fused in frame to the C-terminus of a poly-histidine (his) tag was expressed in the *Escherichia coli* strain BL21(DE3) harboring a pET28a(+) plasmid (Novagen). A Luria Broth (LB) starter culture was inoculated with a single colony of a LB-agar culture and grown overnight at 37 °C. The initial culture was inoculated at 1-5% in a major 2XYT culture (1,6% triptose, 1% yeast extract,

0.5% NaCl -w/v) and grown at 22°C in kanamycin medium until the $A_{600\text{nm}}$ reached 1.2-1.3. Then 5 μM of zinc sulfate and 1 mM isopropylthio- β -D-galactoside (IPTG) was added and the culture was incubated for 3-6 hours at 22 °C. The induced cultures were harvested by centrifugation and the pellets were resuspended in 50mM sodium phosphate, pH 7.5, 300mM NaCl, 10% glycerol, 2mM 2-mercaptoethanol and 10mM imidazol. Phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF) and lysozyme were added to 1mM and 250 $\mu\text{g/ml}$, respectively, and the culture was placed on ice for 30 min. The lysate was sonicated and clarified by centrifugation for 1 hour at 20,000 rpm in a Sorvall SS34 rotor at 4°C. The supernatant was loaded onto a Talon Superflow Metal Affinity Resin (Clontech). The resin was washed with buffer A until the $A_{280\text{nm}}$ of the eluent returned to baseline. The bound TR β 1 Δ AB protein was eluted with 100 % of 50mM sodium phosphate, pH 7.5, 100mM NaCl, 10% glycerol, 2mM 2-mercaptoethanol and 300mM imidazol in a single step. Fractions containing hTR β 1 Δ AB were pooled, and corrected for the conductivity of the phenyl solution HIC A600. The protein was applied onto a *Phenyl* 5PW 8/75 (TosoHaas) column pre-equilibrated with buffer HIC A600 (20mM Hepes-Na pH 8.0, 0.5mM EDTA, 600mM (NH₄)₂SO₄, 1mM dithiotreitol - DTT). The column was then washed with 65 ml of buffer A to remove unbound protein and eluted with 65 % of buffer HIC B (20mM Hepes-Na pH 8.0, 0.5mM EDTA, 20% glycerol, 10% acetonitrile, 1mM DTT) in a single step. To produce the holo protein T₃ hormone (3,5,3'-triiodo-L-thyronine, Sigma) was added right after supernatant clarification in a final concentration of 20 μM and incubated for 1 hour at 4 °C. The holo protein was eluted with 45% of buffer HIC B at phenyl column.

Protein content and purity of all chromatographic fractions were checked by Coomassie Blue stained sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The average yield of the protein, with purity higher than 95%, is 1-2 mg per liter of culture. Protein concentrations were determined using the Bradford dye assay (Bio-Rad) and bovine serum albumin as standard.

Native polyacrylamide gel electrophoresis. Apo-hTR β 1 Δ AB and holo-hTR β 1 Δ AB in complex with T₃, both at 12 μM concentration, were electrophoresed on a 8% to 25% (w/v) pH 8.8 gradient

polyacrylamide gel using the Phast System (Amersham Bioscience), at 10 °C, and silver-stained following standard protocols. Protein standards of known hydrodynamic radii (thyroglobulin, 8.5 nm; ferritin, 6.1 nm; catalase, 5.22 nm; lactate dehydrogenase, 4.3 nm; bovine serum albumin, 3.55 nm) were electrophoresed in the same conditions. The mobility of the individual bands of the protein standards were plotted as the retardation factor (R_f) *versus* the hydrodynamic radii (R_h). The linear equation obtained from this calibration was employed to calculate the R_h of the multimeric fractions of hTR β 1 Δ AB.

Chemical Cross-linking of TR β 1 Δ AB. One microliter of suberic acid bis-N-hydroxysuccinimide ester (DSS, Sigma) dissolved in dimethyl sulfoxide in growing concentrations was added to 9 μ l of either apo- hTR β 1 Δ AB or holo-hTR β 1 Δ AB at a concentration of 17 μ M in phenyl column elution buffer (20mM Hepes pH 8.0, 0.5mM EDTA, 200-300mM NH₄SO₄, 9-13% glycerol, 4.5-6.5 % glycerol, 1mM DTT). Mixtures were incubated for 15 min at room temperature, and the reaction was terminated by addition of 3 μ l of ethanolamine in 1M concentration. Samples were resolved by SDS-PAGE in 10% acrylamide gels, and bands were visualized by Coomassie blue staining. In a control experiment, transthyretin, a protein with a subunit molecular mass of 16 kDa known to exist as a tetramer under physiological conditions, was chemically cross-linked using the same protocol. Proteins bands corresponding to monomers and tetramers were observed at the SDS-PAGE gel (results not shown).

Gel filtration chromatography. A Superdex 200 HR 10/30 size exclusion column (1 x 30cm, Amersham Bioscience) was equilibrated with buffer 20mM Hepes-Na pH 8.0, 0.5mM EDTA, 200mM NaCl, 1mM DTT at a flow rate of 0.5 ml/min and standardized with the Gel Filtration Calibration kits of Amersham Bioscience, applied in a volume of 100 μ l. Ferritin, catalase, aldolase, albumin, ovalbumin, chymotrypsinogen and ribonuclease A with hydrodynamic radii of 6.1 nm, 5.22 nm, 4.81 nm, 3.55 nm, 3.05 nm, 2.09 nm and 1.64 nm, respectively, were utilized as calibration standards. The elution volumes of these proteins were used to calculate the K_{av} values ($K_{av} = \{\text{elution volume} - \text{column void volume}\} /$

{column total volume – column void volume}). The value of $\sqrt{-\log K_{av}}$ for each standard protein was plotted against its hydrodynamic radius and the points were related by a linear regression. To evaluate the multimeric forms presents at solution of apo- and holo-TR β 1 Δ AB, the receptor was applied onto the column in the same conditions and the hydrodynamic radii of the multimeric fractions were derived from K_{av} values for the eluted peaks. Estimated hydrodynamic radii for hTR β 1 Δ AB monomers, dimers and tetramers were computed on the basis of the SAXS model of hRXR α Δ AB multimers [31].

All eluted fractions were analyzed for protein content by SDS-PAGE and the Bradford assay (Bio-Rad) using bovine serum albumin as standard.

Dynamic Light Scattering. A DynaPro MSTC014 (Protein Solutions Inc., Lakewood, NJ, USA) dynamic light scattering instrument was used to monitor ligand dependent changes in oligomeric state of the receptor at different concentrations of the protein, both in its apo- and holo-form. The assays were performed at 4 °C with acquisition time of 2,5 seconds using 12 μ l cuvette. Thirty acquisitions were used in a single measurement. Three sequential measurements were performed for each concentration of apo- and holo- form of TR β 1 Δ AB and the mean and the standard deviations were computed. Apo- and holo-forms of TR β 1 Δ AB contained 15% and 9% of glycerol, respectively. Change in the viscosity, introduced by the variable quantity of glycerol present in solution, was taken into account during evaluation of the hydrodynamic radii of TR multimers with use of the software DYNAMICS TM v. 5.26.39 (Protein Solutions Inc.)

RESULTS

Bacterially expressed human TR β 1 Δ AB binds to TREs both as dimers and as monomers and dissociates from DNA in response to T₃. To facilitate analysis of TR multimerization states, we expressed a truncated protein corresponding to the human TR β 1 DBD-LBD region (TR β 1 Δ AB) in

E.coli. This truncation is similar to those used in studies of RXR multimerization in solution and contains all of the functions required for appropriate DNA and hormone binding, and for multimerization. In each case, bacterially expressed histidine-tagged hTR β 1 Δ AB was purified by cobalt chelating affinity chromatography and phenyl column chromatography. After the second purification step, purity was higher than 95% as judged by Coomassie gel (Figure 1A) and silver stain (not shown). A similar method was used for isolation of holo-TR, but here T₃ was added during the preparation of extract and re-supplied one hour before application onto the phenyl column. Once again, this preparation consisted predominantly of a single species that migrated at the expected size of the TR β 1 DBD-LBD region (data not shown).

We first confirmed that the TR β 1 Δ AB protein showed oligomerization properties that were comparable to the wild type TR by performing gel shift assays using DR-4 and F2 inverted palindromic elements (Figure 1B) as described by Ribeiro *et al.* [32]. As developed in the Introduction, TR homodimers bind both TREs, but show preferential binding to F2 elements. Moreover, T₃ promotes release of TR homodimers from both response elements. Figure 1C shows bacterially expressed apo-hTR β 1 Δ AB bound to both DR-4 (lane 1) and F2 elements (lane 3), but showed stronger binding to the latter TRE. Moreover, addition of T₃ promoted dissociation of TR β 1 Δ AB homodimers into monomers (lanes 2 and 4). TR β 1 Δ AB also bound well to both elements as a heterodimer with bacterially expressed RXR α Δ AB (not shown). Thus, bacterially expressed hTR β 1 Δ AB recapitulates the DNA binding and oligomerization properties of full length TR, suggesting that it is fully functional. Moreover, hTR β 1 Δ AB also retains the capacity to bind ligand, as evidenced by the hormone-dependent release from DNA, and to heterodimerize with RXR.

Electrophoresis of hTR β 1 Δ AB Under Nondenaturing Conditions. To examine the oligomeric state of our TR β preparations in solution, apo-hTR β 1 Δ AB and holo hTR β 1 Δ AB (14 μ M) were electrophoresed under nondenaturing conditions. Surprisingly, three distinct bands were observed for

the apo-form of the protein (Figure 2). By contrast, the hTR β 1 Δ AB-T₃ complex consisted of a single band that migrated at the approximate position of the middle band of the apo-form (see Discussion). However, no band that corresponded to the higher molecular weight species of the apo-form was detectable at this concentration of TR, even when the gel was overloaded.

Analysis of the migration of each of these hTR β 1 Δ AB species (Materials and Methods) yielded their hydrodynamic radii (Rh). The fastest band showed a hydrodynamic radius of 3.5 nm, the only middle band of the apo-form gave a value of 4.02 nm whereas the slowest band (present only at apo-form) gave a value of 4.86 nm. The band of the TR-T₃ complex gave a value of 3.95 nm. These values favorably agree with the theoretical hydrodynamic radii of 3.39 nm, 4.35 nm and 6.08 nm, estimated, respectively, for hTR β 1 Δ AB monomer, dimer and tetramer as described in Materials and Methods. Thus, apo-hTR β 1 Δ AB forms a mix of monomers, dimers and tetramers in solution, and addition of ligand promotes dimer formation (Figure 2).

Chemical Cross-linking of hTR β 1 Δ AB. To obtain independent confirmation of the composition of TR multimers in solution, we subjected our hTR β 1 Δ AB preparations (14 μ M) to covalent cross-linking with the reagent DSS and analyzed the products by SDS-PAGE (Figure 3). Two protein bands with electrophoretic mobilities corresponding to monomer and dimer were observed at low DSS concentrations for apo-form of the protein (Figure 3A). At higher concentrations of the cross-linking agent, a protein band just below that of a molecular marker of 200 kDa became visible, confirming the presence of a species that migrated at the expected position of tetramers. In general, there was a gradual change of the composition of cross-linked species from monomer to dimer to tetramer as a function of increasing DSS concentration.

By contrast, DSS cross-linking of T₃-bound TR yielded strong bands that corresponded to monomer and dimer forms and the relative intensity of both species did not vary as a function of DSS concentrations (Fig. 3B). A weak band corresponding to the tetramer form could only be observed at very high DSS concentrations when the gel was stained for longer periods. These data further support

the notion that apo-TR preparations form a mix of monomers, dimers and tetramers in solution and that addition of ligand inhibits tetramer formation.

Concentration-Dependence of hTR β 1 Δ AB tetramer formation. To understand the concentration dependence of the formation of different TR multimeric species we analyzed the composition of both hTR β 1 Δ AB preparations by analytical gel filtration chromatography. For these experiments, we concentrated the apo-TR and holo-TR preparations by standard methods and applied the samples to a Superdex 200 10/30 size exclusion column (Amersham Biosciences). The elution profiles of each sample, which were diluted by a factor of ten fold as they passed over the column, were then determined and compared with standards of known hydrodynamic radii.

Apo-hTR β 1 Δ AB was applied to the gel filtration column at concentrations of 22 μ M, 79 μ M, 144 μ M and 240 μ M. The hydrodynamic radius of each eluate, as inferred from the position of the elution peak, gradually increased from 4.4 nm to 5.2 nm as a function of protein concentration (Figure 4A). Taking into account ten-fold dilution of the gel filtration column, the results are consistent with the notion that the dimeric form predominates at the lowest final concentration of hTR β 1 Δ AB (2.2 μ M) and that progressive increases in hTR β 1 Δ AB final protein concentration up to 24 μ M shift the equilibrium between multimeric species toward tetramer formation.

Holo-hTR β 1 Δ AB was applied to the gel filtration column at concentrations of 24 μ M, 67 μ M, 144 μ M and 240 μ M. Here, the elution volume of the protein peaks corresponded to hydrodynamic radii of 3.2 nm for the lowest concentration, and 4.1-4.2 nm for the second and third concentrations. The highest concentration also yielded a predominant peak at 4.1 nm but yielded a shoulder in the curve with a peak that corresponded to a species of hydrodynamic radius 5.7 nm (Fig. 4C). These results suggest that the monomeric form of TR predominates at the lowest protein concentration (2.4 μ M) and that the dimeric form predominates at the concentrations between 6.7 μ M and 24 μ M with a small fraction of tetramer appearing only at the highest concentration.

The protein concentration range amenable to gel filtration analysis is limited by the maximum concentration of the protein to be applied to the column. To characterize dimer-tetramer equilibrium at higher protein concentrations, we performed systematic dynamic light scattering studies (DLS) for the apo- and holo-forms of TR at increasing protein concentrations.

The hydrodynamic radii (R_h) and polydispersity mean values as well as the standard deviation (SD) of these variables are presented in Table 1, along with estimates of the relative proportion of monomers, dimers and tetramers. The results suggest that apo-TR exists approximately as a 3:1 mixture of dimers and tetramers at the lowest TR concentration ($2.3\mu\text{M}$) but the tetramer becomes the predominant multimeric form as the concentration of the TR increases. By contrast, TR+T₃ complex at the lowest concentrations ($2.3\mu\text{M}$) exists as an approximate 1:1 mixture of monomers and dimers. Furthermore, although the fraction of holo-TR tetramers also increases as a function of protein concentration, the TR-T₃ complex adopts a mostly dimeric form up to the concentrations of $276\mu\text{M}$. Thus, gel filtration analysis and DLS confirm the idea that TR can exist as at least three distinct multimeric species in solution that correspond to monomers, dimers and tetramers. Moreover, both techniques suggest that these three species seem to exist in a dynamic equilibrium with tetramer formation enhanced by increasing protein concentration and inhibited by ligand.

DISCUSSION

Nuclear receptor oligomerization state influences nuclear receptor activity (see Introduction). The TRs, like many other nuclear receptors, are thought to function either as heterodimers with RXR or as dimers and monomers. Nevertheless, the way that the TR self-associates in solution, and the way that hormone governs this process, has not yet been studied systematically. In this study, we analyzed the multimeric state of hTR β 1 in solution using non-denaturing gel electrophoresis, chemical cross-linking, gel filtration and DLS. We utilized bacterially expressed histidine-tagged hTR β 1 lacking the N-terminal A/B region (TR β 1 Δ AB), which contains all of the functions required for appropriate ligand binding,

DNA binding and oligomerization and is similar to truncations used for analysis of RXR α multimeric state [17, 18, 19].

We found that the purified TR β 1 Δ AB preparation consisted primarily of a single species that migrated at the appropriate size on SDS-polyacrylamide gels and resembled wild type TR in its DNA binding properties, heterodimerization properties and hormone binding properties (Figure 1 and data not shown). Nevertheless, four distinct methods (non-denaturing gel electrophoresis, chemical cross-linking, gel filtration and DLS) all confirm that apo-TR and holo-TR preparations both form a mix of multimeric species in solution that correspond in size to that predicted for monomers, dimers, and, most surprisingly, to tetramers. In this regard, our work provides the first evidence that hTR β 1 forms homo-tetramers in the absence of cognate ligand and DNA binding sites and the first demonstration that homo-tetramer formation is not unique to RXR.

The behavior of TR in solution contrasts strikingly with the behavior of a similar fragment of another nuclear receptor that can form heterodimers with the RXR, the retinoic acid receptor α (RAR α). RAR α does not form tetramers or dimers in solution and exists exclusively as monomers [20]. Instead, the behavior of the TR shows strong parallels to that of the RXR itself. TR forms different multimeric species in solution, and these species exist in a dynamic equilibrium that is influenced by protein concentration. TR monomers are only detectable at low protein concentrations whereas tetramers tend to predominate at higher protein concentrations. Moreover, the dynamic equilibrium between species is reversible. Both apo- and holo-receptor species exclusively form tetramers at concentrations above 144 μ M (Figure 4). Nevertheless, application of tetramer preparations to gel filtration columns (which results in a ten-fold dilution of protein), yields a mix of dimers and tetramers in the elute in the case of apo-TR, and dimers in the case of the holo-TR. Thus, tetramers must rapidly dissociate into dimers as they migrate through the gel filtration column. Finally, like RXR, the equilibrium between multimeric TR species was influenced by ligand, which promoted dissociation of tetramers to dimers and also showed some tendency to promote dimer dissociation into monomers at low protein concentrations

(Figure 3). Taken together, each of these parallels suggests that RXR and TR tetramer formation may involve similar mechanisms.

Could tetramer formation have a physiological role in TR function? In regard to this point, the number of TR molecules per nucleus is about 2,000-10,000 with highest concentration found in TH-responsive tissues such as pituitary, brown fat, liver, heart, placenta and kidney [33, 34, 35]. Assuming that the radius of a nucleus is about 1 μm [17], estimated receptor concentration is between 0.8 μM and 4 μM in the nucleus. However, much of the nucleus is not fluid, so the actual liquid volume would be less. This means that the TR concentrations used in these studies ($\geq 2.2\mu\text{M}$) are either within the physiologically relevant range or very close to its upper limit and that apo-TR therefore has the potential to exist as a mixture of monomers, dimers and tetramers at a physiological concentration range. Whereas apo-RXR only interacts weakly with corepressors, apo-TR is thought to be primarily complexed with co-repressors. Thus, it is not clear what fraction of apo-TR (if any) would be available for homo-tetramer formation under typical conditions and whether this process would play an important role in regulation of TR action. Nevertheless, we note nuclear transcription factors are often sequestered into small subdomains within the nucleus, or concentrated at target promoters with multimerized DNA binding sites, elevating the limits for local TR concentration in the nucleus to even higher values, raising the possibility that tetramer formation could regulate TR activities in particular contexts. It will be interesting to identify TR mutants that inhibit tetramerization and ask whether they also affect any of the known properties of TR in living cells, including nuclear localization, cofactor association or influences on gene expression.

In addition to effects on tetramer formation, T_3 also inhibits dimer formation at low TR concentrations in some conditions. In particular, apo-TR exists mostly as dimers of hydrodynamic radius 4.4nm in gel filtration assays at relatively low (2.2 μM) concentrations, whereas holo-TR exists as monomers of hydrodynamic radius 3.2 nm under similar conditions (Figure. 3). T_3 promotes dissociation of TR-TR homodimers from DNA elements, but the molecular basis for this effect is unclear. It is interesting to speculate that this effect is related to the hormone-dependent (DNA independent) alterations in dimer-

monomer equilibrium that we have observed here, raising the possibility that ligand might influence TR DNA binding activity *via* direct effects on the conformation of the dimer surface within the TR-LBD.

Tetramerization is a frequent event in the regulation of protein-DNA recognition and transcription regulation [36, 37, 38]. The human tumor suppressor protein p53 is capable of forming tetramers both free in solution [39, 40] and bound to DNA [41]. The sequence specific DNA binding protein TraM, essential for conjugative DNA transfer forms stable tetramers in solution [42]. It also is tetrameric when bound to the minimal DNA binding site [42]. *S. aureus* regulator QacR represses transcription of the *quaA* multidrug pump gene by binding to IR1 DNA binding site as a dimer of dimers [43, 44]. Furthermore, bacteriophage 434 repressor binds DNA as a tetramer in a cooperative manner, but fails, however, to form tetramers in solution [45]. Finally, single-stranded binding protein (SSB) from *E. coli* is a homotetrameric DNA binding protein, playing essential roles in DNA replication, recombination and repair, which can bind single stranded DNA in a number of different modes, depending on solution conditions [46]. In view of our evidence for tetramer formation by human thyroid and retinoic X receptors, it will be interesting to ask whether self-association into tetramers could represent a general level of regulation of cellular signaling by nuclear receptors. The self-assembly of the nuclear receptors into inactive tetramer forms inside the cell could allow for an accumulation and storage of the receptors that can easily be activated in the presence of respective ligand or specific DNA binding sites or by decreases in the receptor concentration.

References

1. Oppenheimer, J. H., Schwartz, H. L., Mariash, C. N., Kinlaw, W. B., Wong, N. C. W., and Freake, H. C. (1987) *Endocr. Rev.* **8**, 288-308.
2. Samuels, H. H., Forman, B. M., Horowitz Z. D., and Ye, S. (1988) *J. Clin. Invest.* **81**, 957-967.

3. Apriletti, J. W., Ribeiro, R. C. J., Wagner, R. L., Feng, W., Webb, P., Kushner, P. J., Westl B. L., Nilsson, S., Scanlan, T. S., Fletterick, R. J., and Baxter, J. D. (1998) *Clin. Exp. Pharmacol. Phys.* **25**, S2-S11.
4. Aranda, A., and Pascual, A. (2001) *Physiol. Rev.* **81**, 1269-1304.
5. Yen, P. M. (2001) *Physiol. Rev.* **81**, 1097-1142.
6. Makowski, A., Brzostek, S., Cohen, R. N., and Hollenberg, A. N. (2003) *Mol. Endocrinol.* **17**, 273-286
7. Liang, F., Webb, P., Marimuthu, A., Zhang, S., and Gardner, D. G. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 15073-15083.
8. Wong, C. and Privalsky, M. L., (1998) *Mol. Cell. Biol.* **18**, 5724-5733.
9. Kurokawa, R., Yu, V. C., Näär, A., Kyakumoto, S., Han., Z., Silverman, S., Rosenfeld, M. G., and Glass, C. K. (1993) *Genes & Dev.* **7**, 1423-1435.
10. Glass, C.K. (1994) *Endocr. Rev.* **15**, 391-407.
11. Mader, S., Chen, J. Y., Chen, Z., White, J., Chambon, P., and Gronemeyer, H. (1993) *EMBO J.* **11**, 5029-5041.
12. Chen, J. D., and Evans, R. M. (1995) *Nature* **377**, 454-457.
13. Horlein, A. J., Naar, A. M., Heinzl, T., Torchia, J., Gloss, B., Kurokawa, R., Ryan, A., Kamei, Y., Soderstrom, M., and Glass, C. K. (1995) *Nature* **377**, 397-404.
14. Sande, S., and Privalsky, M. L. (1996) *Mol. Endocrinol.* **10**, 813-825.
15. Seol, W., Mahon, M. J., Lee, Y. K., and Moore, D. D. (1996) *Mol. Endocrinol.* **10**, 1646-1655.

16. Marimuthu, A., Feng, W., Tagami, T., Nguyen, H., Jameson, L. J., Fletterick, R. J., Baxter, J. D., and West, B. L. (2002) *Mol. Endocrinol.* **16**, 271-286.
17. Kersten, S., Kelleher, D., Chambon, P., Gronemeyer, H., and Noy, N. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 8645-8649.
18. Kersten, S., Pan, L., Chambon, P., Gronemeyer, H., and Noy, N. (1995) *Biochemistry* **34**, 13717-13721.
19. Kersten, S., Pan, L., and Noy, N. (1995) *Biochemistry* **34**, 14263-14269.
20. Chen, Z. P., Iyer, J., Bougert, W., Held, P., Mioskowski, C., Lebeau, L., Noy, N., Chambon, P., and Gronemeyer, H. (1998) *J. Mol. Biol.* **275**, 55-65.
21. Kersten, S., Reczek, P., and Noy, N. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 29759-29768.
22. Kersten, S., Gronemeyer, H., and Noy, N. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 12771-12777.
23. Kersten, S., Dong, D., Lee, W., Reczek, P., and Noy, N. (1998) *J. Mol. Biol.* **284**, 21-32.
24. Evans, R. M. (1988) *Science* **240**, 889-895.
25. Ribeiro, R. C. J., Kushner, P. J., and Baxter, J. D. (1995) *Annu. Rev. Med.* **46**, 443-453.
26. Tsai, M. J., and O'Malley, B. W. A. (1994) *Rev. Biochem.* **63**, 451-486.
27. Gampe, R. T., Jr, Montana, V. G., Lambert, M. H., Wisely, G. B., Milburn, M. V., and Xu, H. E. (2000) *Genes & Dev.* **14**, 2229-2241.
28. Egea, P. F., Rochel, N., Birck, C., Vachette, P., Timmins, P. A., and Moras, D. (2001) *J. Mol. Biol.* **307**, 557-576.
29. Ribeiro, R. C. J., Feng, W., Wagner, R. L., Costa, C. H. R. M., Pereira, A. C., Apriletti, J. W., Fletterick, R. J., and Baxter, J. D. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 14987-14995.

30. Bourguet, W., Ruff, M., Chambon, P., Gronemeyer, H., and Moras, D. (1995) *Nature* **375**, 377-382.
31. Fischer, H., Dias, S. M. G., Santos, M. A. M., Alves, A. C., Zanchin, N., Craievich, A. F., Apriletti, J. W., Baxter, J. D., Webb, P., Neves, F. A. R., Ribeiro, R. C. J. and Polikarpov, I. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 16030-16038.
32. Ribeiro, R. C. J., Kushner, P., Apriletti, J. W., West, B. L., and Baxter, J. D. (1992) *Mol. Endo.* **6**, 1142-1152.
33. Oppenheimer, J. H., Schwartz, H. L., and Surks, M. I. (1974) *Endocrinology* **95**, 897-903.
34. Shahrara, S., Drvota, V., and Sylven, C. (1999) *Biol. Pharm. Bull.* **22**, 1027-1033.
35. Neves, F. A. R., Cavalieri, R. R., Simeoni, L. A., Gardner, D. G., Baxter, J. D., Scharschmidt, B. F., Lomri, N., and Ribeiro, R. C. J (2002) *Endocrinology* **143**, 476-483.
36. Ayer, D. E., Kretzner, L., and Eisemann, R. N. (1993) *Cell* **72**, 211-222.
37. Patel, L. R., Curran, T., and Kerppola, T. K. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 7360-7364.
38. Lahoz, E. G., Xu, A., Agus, N., and Depinho, R. A. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 5503-5507.
39. Brox, R. D., Bolewska-Pedyczak, E., and Gariépy, J. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 2327-2332.
40. Mateu, M. G., Del Pino, M. M. S., and Fersht, A.R. (1999) *Nature Struct. Biol.* **6**, 191-198.
41. Rippin, T. M., Freund, S. M. V., Veprintsev, D. B. and Fersht, A. R. (2002) *J. Mol. Biol.* **319**, 351-358.
42. Verdino, P., Keller, W., Strohmaier, H., Bischof, K., Lindner, H., and Koraimann, G. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 37421-37428.

43. Schuemacher, M. A., Miller, M. C., Grkovic, S., Brown, M. H., Skurray, R. A., and Brennan, R.G. (2002) *EMBO J.* **21**, 1210-1218.
44. Schumacher, M. A., and Brennan, R. G. (2003) *Res. Microb.* **154**, 69-77.
45. Ciubotaru, M., and Koudelka, G. B. (2003) *Biochemistry* **42**, 4253-4264.
46. Kozlov, A. G., and Lohman, T. M. (2002) *Biochemistry* **41**, 11611-11627.

Table 1: Summary of Dynamic Light Scattering experiments of apo- and holo-TR as a function of concentration.

Form	Concentration	Rh (nm) ¹ ± SD	Polydispersity (nm) ¹ ± SD	%Monomer ²	%Dimer ³	%Tetramer ⁴
Apo-TR	2.3 µM	5.26 ± 0.32	0.81 ± 0.51	0	72.2	27.8
	7 µM	5.70 ± 0.18	0.69 ± 0.35	0	44.8	55.2
	11.5 µM	5.71 ± 0.14	0.19 ± 0.12	0	44	56
	23 µM	6.05 ± 0.41	0.70 ± 0.27	0	4.8	95.2
	46 µM	6.39 ± 0.10	0.98 ± 0.15	0	0	100
	92 µM	6.87 ± 0.21	1.63 ± 0.74	0	0	100
	115 µM	6.75 ± 0.35	1.47 ± 0.38	0	0	100
	170.2µM	7.01 ± 0.52	1.67 ± 0.81	0	0	100
TR-T3 complex	2.3 µM	4.14 ± 0.11	0.66 ± 0.12	46.6	53.4	0
	11.5 µM	4.29 ± 0.10	0.60 ± 0.01	17.2	82.8	0
	18.4 µM	4.24 ± 0.15	0.39 ± 0.34	28.7	71.3	0
	23 µM	4.54 ± 0.13	0.70 ± 0.17	0	95.9	4.13
	34.5µM	4.60 ± 0.05	0.65 ± 0.24	0	94.4	5.57
	73.6 µM	4.79 ± 0.09	0.43 ± 0.09	0	89.4	10.6
	145 µM	5.11 ± 0.13	0.52 ± 0.32	0	78.5	21.5
	209.3 µM	5.13 ± 0.30	0.63 ± 0.21	0	77.7	22.3
	276 µM	5.36 ± 0.16	0.70 ± 0.10	0	67.1	32.9

¹ Hydrodynamic radii (Rh) and polydispersity expressed as a mean ± standard deviation (SD) of 15 measurements.

^{2,3,4} The percentage of number of dimers and tetramers were calculated by Dynamics 5.26.60 software, using the values of RH medium, and on the basis of the measured Rh, the Rh and molecular weight expected for each oligomeric form.

Figure Captions

Figure 1. Bacterially expressed hTR β Δ AB binds specific TREs and alters its binding pattern in response to T3 hormone in gel shift assays. **A**, hTR β Δ AB was purified by cobalt affinity chromatography and the pooled eluate (Co-pool; lane 1) was applied to a phenyl column. A Coomassie-stained SDS-PAGE analysis after phenyl column showed fractions about 95% pure (Phenyl-pool; lane 2). This pool was applied onto a pre-equilibrated Superdex 200 10/30 at different initial concentrations. **B**, Sequence of oligonucleotides corresponding to TREs used in the assay. The *arrows* represent the orientation of the half-sites. **C**, The panel shows an autoradiogram of a gel shift assay. Binding reactions contained 2.0 pmol of 95% pure hTR β 1 Δ AB expressed in *E. coli*, incubated 20 min at 24°C with [P^{32}]DR-4 (2500 cpm) without T3 (line 1) and with T3 (ligand concentration 10^{-7} M) (line 2), [P^{32}]F2 (2500 cpm) without T3 (line 3) and with T3 (ligand concentration 10^{-7} M) (line 4). The TR-DNA complexes were resolved in a 5% nondenaturing polyacrylamide gel. The solid arrows indicate the monomeric (M) and dimeric (D) TR-DNA complexes.

Figure 2. hTR β 1 Δ AB gel electrophoresis under nondenaturing conditions. Analysis of TR species by nondenaturing gel electrophoresis was performed in 8-25% gradient gel (Phast System, Amersham Bioscience), pH 8.8 at 10°C, and stained with silver. The concentrations applied were 12 μ M TR with T3 (+ T3) and without T3 (-T3). TR and protein standards of known molecular Rh (thyroglobulin, 8.5 nm; ferritin, 6.1 nm; catalase, 5.22 nm; lactate dehydrogenase, 4.3 nm; bovine serum albumin, 3.55 nm) were electrophoresed, the retardation factors (Rf values) were measured and plotted as $100 \times \log(100 \times Rf)$ against the Rh.

Figure 3. Chemical cross-linking of (A) apo-hTR β 1 Δ AB and (B) hTR β 1 Δ AB-T3 complex. 14 μ M apo-TR and holo-TR preparations, were cross-linked by DSS and samples were resolved by SDS-PAGE in a 10% polyacrylamide gel (pH8.8). The final concentrations of DSS for lanes 1-7 were 0, 0.025, 0.05, 0.2, 0.5, 1 and 2.5 mM, respectively. The gel was stained with Coomassie Blue. The gel (B) was stained

longer than the gel (A) to reveal the tetramer. T, D and M identify tetramer, dimer and monomer band, respectively.

Figure 4: **A**, The apo protein eluted with a characteristic hydrodynamic value Rh of dimer (4.4 nm; initial concentration of TR 22 μ M), passing through 4.7 nm (initial concentration of TR 79 μ M), 5 nm (initial concentration of TR 144 μ M) and ending in a Rh value intermediate between dimer and tetramer (5.2 nm; initial concentration of TR 240 μ M). **B**, The holo protein eluted as specific peaks of monomer (3.2 nm – M; initial concentration of TR 24 μ M), dimer (4.2 nm, 4.1 nm and 4.1 nm – D; initial concentration of TR 67 μ M, 144 μ M and 240, respectively) and tetramer (5.7 nm – T; initial concentration of TR 240 μ M). The presence of the receptor at these peaks was confirmed by SDS-PAGE electrophoresis (data not showed). The elution volumes were used to calculate the K_{av} values ($K_{av} = \text{elution volume} - \text{column void volume} / \text{column total volume} - \text{column void volume}$). The value of $\sqrt{-\log K_{av}}$ was related with the Rh of several protein standards of known Stokes radii (ferritin – 6.1 nm, catalase – 5.22 nm, aldolase – 4.81 nm, bovine serum albumin – 3.55 nm, ovalbumin – 3.05 nm, chymotrypsinogen – 2.09 nm and ribonuclease A – 1.64 nm) by a linear equation. Black points at chromatographic elution profiles in (B) and (C) display elution volumes of the proteins used as standards.

Figure 5: Residual intensity (dotted circle), expressed as intensity measured of the protein solution minus the intensity of the solvent, and Rh (opened circles) plotted as a function of the concentration of apo (A) and TR-T3 complex (B). The SD of the three Rh measured for each concentration are presented.

Figure 1.

Figure 2.

Figure 3.

Figure 4.

A

B

Anexo 4

Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of isoform $\alpha 1$ of the human thyroid hormone receptor ligand-binding domain

F. M. Nunes,^a R. Aparicio,^{a,†}
M. A. M. Santos,^a R. V. Portugal,^a
S. M. G. Dias,^a F. A. R. Neves,^b
L. A. Simeoni,^b J. D. Baxter,^c
P. Webb^c and I. Polikarpov^{a,*}

^aInstituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, Av. Trabalhador SãoCarlense 400, São Carlos, SP, 13560-970, Brazil,

^bUniversidade de Brasília, Faculdade de Ciências da Saúde, Laboratório de Farmacologia Molecular, Brasília, DF, Brazil, and ^cUniversity of California, Metabolic Research Unit, San Francisco, USA

† Current address: Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, CP6154, Campinas, SP, 13084-862, Brazil

Correspondence e-mail:
ipolikarpov@ifsc.usp.br

Thyroid hormone receptors (TR) play critical roles in virtually all tissues. The TR ligand-binding domain (LBD) participates in important activities, such as transcriptional activation and repression, conformational changes induced by hormone binding. Two crystal forms of isoform $\alpha 1$ of the human thyroid hormone receptor LBD (hTR $\alpha 1$) in complex with the thyroid hormones T3 and Triac were obtained. The hTR $\alpha 1$ -T3 complex was crystallized in a previously unobserved crystal form (space group $P2_12_12_1$, $a = 59.98$, $b = 80.80$, $c = 102.21$ Å), with diffraction patterns extending to 1.90 Å resolution on a rotating-anode X-ray source, and in space group $C2$ ($a = 117.54$, $b = 80.66$, $c = 62.55$ Å, $\beta = 121.04^\circ$), with data extending to 2.32 Å resolution. The hTR $\alpha 1$ -Triac complex was also crystallized in the new space group $P2_12_12_1$, with unit-cell parameters $a = 60.01$, $b = 80.82$, $c = 102.39$ Å; its resolution limit extended to 2.20 Å on a home source. Phasing was carried out by the molecular-replacement method and structural refinement is currently in progress. The refined structures may provide insight into the design of new thyromimetics.

Received 5 May 2004

Accepted 20 July 2004

1. Introduction

Thyroid hormone receptors (TRs), members of a superfamily of eukaryotic transcription factors, are ligand-activated transcription factors that bind to thyroid hormone-response elements (TREs) in the regulatory region of target genes and mediate the biological effects of thyroid hormones. The receptors exhibit a modular structure with functionally separable domains. The most highly conserved domains are the DNA-binding domain (DBD) and the ligand-binding domain (LBD) (Evans, 1988; Laudet *et al.*, 1992). The LBD participates in several types of activity, including hormone binding, homo- and/or heterodimerization, molecular interactions with heat-shock proteins and transcriptional activation and repression (Tsai & O'Malley, 1994; Ribeiro *et al.*, 1995). Hormone binding induces conformational changes which control these properties and influence gene expression (Tsai & O'Malley, 1994; Ribeiro *et al.*, 1995). Therefore, the three-dimensional structure of a liganded LBD is critical for understanding the structural mechanisms of hormone action.

Thyroid hormones, namely 3,5,3'-triiodo-L-thyronine (T3), 3,5,3',5'-tetraiodo-L-thyronine (T4) and 3,5,3'-triiodothyroacetic acid (Triac), play critical roles in the differentiation, growth, metabolism and physiological function of virtually all tissues. Two major subtypes of thyroid hormone receptors (TR $\alpha 1$ and TR $\alpha 2$, and TR $\beta 1$ and TR $\beta 2$) are encoded by two

different genes (Ribeiro *et al.*, 1995). TR $\alpha 1$, TR $\beta 1$ and TR $\beta 2$ are ligand-binding isoforms of TR, whereas TR $\alpha 2$ does not bind thyroid hormones. Differences in affinity towards thyroid hormones are observed amongst the different ligand-binding isoforms. TRs mediate distinct physiological effects owing to differences in tissue abundance and receptor-specific activity (Forrest & Vennström, 2000). Studies in patients with the syndrome of resistance to thyroid hormones, in which abnormal TR β is present, and with TR $\alpha 1^{-/-}$ mice suggest that TR α is the major TR regulating heart rate (Johansson *et al.*, 1998; Forrest & Vennström, 2000; Yen, 2001; Gloss *et al.*, 2001). TR β is critical in controlling hepatic cholesterol metabolism and thyroid-stimulating hormone (TSH) suppression, which may be because of the high expression of TR β in liver (70–80% of total TR) and pituitary (Schwartz *et al.*, 1992; Wikström *et al.*, 1998; Gloss *et al.*, 2001). In particular, TR $\beta 1$ is widely distributed in the tissues and regulates metabolic rate. Identifying thyromimetics that interact selectively with the isoforms TR $\alpha 1$ and TR $\beta 1$ may be crucial in treating important diseases such as obesity and lipid disorders.

The available TR structural data include rat TR $\alpha 1$ LBD in complex with T3 (Wagner *et al.*, 1995) and Triac (Wagner *et al.*, 2001) and human TR $\alpha 1$ LBD (hTR $\alpha 1$) in complex with a synthetic thyromimetic (Ye *et al.*, 2003). However, despite this previous work, the structural basis for the selectivity of the TR

isoforms in thyroid ligand binding is not yet well established. To further investigate the molecular mechanism of hTR α 1 specificity, X-ray crystallographic studies were recently initiated. In this work, we report the purification, crystallization, data collection and molecular-replacement solutions obtained for hTR α 1 in complex with T3 and Triac. Data to higher resolution than previously published (Ye *et al.*, 2003; Dow *et al.*, 2003) have been obtained, which is likely to be a consequence of a different molecular packing. These new studies may be important for better understanding of the structural basis of TR isoform selectivity and for the design of more potent isoform-specific thyromimetics.

2. Materials and methods

2.1. Expression and purification

The human TR α 1 LBD construct including amino-acid residues Glu148–Val410 (NCBI protein accession No. A40917) fused in frame to the C-terminus of a polyhistidine (His) tag was expressed in *Escherichia coli* strain B834 harbouring a pET28a(+) plasmid (Novagen), as illustrated in Fig. 1. A Luria Broth [LB; 1.6% (w/v) tryptose, 1% (w/v) yeast extract, 0.5% (w/v) NaCl] starter culture was inoculated with a single colony of a LB-agar culture and grown overnight at 310 K. The initial culture was inoculated at 1% in a major LB culture and grown at 293 K in kanamycin medium until the $A_{600\text{ nm}}$ reached 1.7. After this, isopropyl thio- β -D-galactoside (IPTG) was added to a concentration of 0.5 mM and culture growth was continued for 6 h at 293 K.

The cells were harvested by centrifugation and the pellet resuspended in 50 mM Tris–HCl buffer pH 7.5 containing 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20, 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF) and 20 mM 2-mercaptoethanol. The culture was incubated on ice with 0.5 mg ml^{−1} lysozyme and disrupted by sonication. The lysate was centrifuged for 20 min at 14 000 rev min^{−1} in a Sorvall SS34 rotor at 277 K and the obtained supernatant was incubated for 30 min with a 20-fold molar excess of T3 (Sigma) or Triac (Sigma).

To purify the holo hTR α 1, the supernatant was mixed with Talon Superflow Metal Affinity Resin (Clontech) and shaken at 277 K for 1 h. The resin was washed twice with 50 mM sodium phosphate buffer pH 8.0 containing 300 mM NaCl, 10% glycerol, 10 mM 2-mercaptoethanol, 25 mM imidazole, 1 mM PMSF and 0.05% Tween-20 and

Table 1

Crystal parameters and data-collection statistics.

Values in parentheses refer to the last resolution shell

	T3 complex		Triac complex
Space group	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	<i>C</i> 2	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Unit-cell parameters			
<i>a</i> (Å)	59.98	117.54	60.01
<i>b</i> (Å)	80.80	80.66	80.82
<i>c</i> (Å)	102.21	62.55	102.39
β (°)		121.04	
Solvent content (%)	68.3	69.1	68.4
AU content (molecules)	1	1	1
Resolution range (Å)	31.47–1.90 (2.00–1.90)	19.92–2.32 (2.45–2.32)	48.22–2.20 (2.32–2.20)
No. images	260	77	291
No. observed reflections	323718	32461	267634
No. unique reflections	39272	18188	26000
Multiplicity	8.2 (7.8)	1.8 (1.7)	10.3 (11.0)
Completeness (%)	98.7 (98.9)	83.7 (87.3)	100 (100)
R_{sym} (%)	5.9 (38.3)	7.9 (37.5)	5.9 (37.5)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	7.8 (2.0)	7.7 (2.0)	11.2 (2.1)

twice with the same solution without Tween-20. The protein was eluted in a single step with 50 mM sodium phosphate buffer pH 8.0 containing 300 mM NaCl, 10% glycerol, 10 mM 2-mercaptoethanol, 1 mM PMSF, 0.05% Tween-20 and 500 mM imidazole.

After the affinity column, the fractions were pooled and corrected for the conductivity of the initial phenyl solution. The protein was applied onto a Phenyl 5PW 8/75 (TosoHaas) column pre-equilibrated with 20 mM Na HEPES buffer pH 8.0 containing 0.5 mM EDTA, 700 mM (NH₄)₂SO₄, 3 mM dithiothreitol (DTT). The column was washed with the previous solution and eluted with a 90 min 0–100% gradient of 20 mM Na HEPES buffer pH 8.0 containing 0.5 mM EDTA, 20% glycerol, 10% acetonitrile, 3 mM DTT at 0.75 ml min^{−1}. After this step, the protein was loaded onto a HL Superdex 200 or 75 26/60 gel-filtration column (Amersham Bioscience) equilibrated with 20 mM Na HEPES buffer pH 8.0 containing 1 mM EDTA, 3 mM DTT, 0.01% Tween-20 and 200 mM NaCl. The protein recovered was concentrated by ultrafiltration (Amicon Ultra 10 kDa MWCO, Millipore), resuspended in a solution of 600 mM NaCl and 3 mM DTT and further concentrated to 10 mg ml^{−1}.

The protein content and purity of all chromatographic fractions were checked by Coomassie Blue-stained sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE). The average yield of the protein was about 6 mg per litre of culture, with purity higher than 99%. Protein concentrations were determined using the Bradford dye assay (Bio-Rad) using bovine serum albumin as standard.

2.2. Crystallization

Initial crystallization conditions were screened at temperatures of 277 and 291 K by the sparse-matrix method (Jancarik & Kim, 1991) using the macromolecular crystallization reagent kits Crystal Screens I and II (Hampton Research). In each trial, a hanging drop of 1 μ l of protein solution containing either T3 or Triac (see §2.1) was mixed with 1 μ l precipitant solution and equilibrated against a reservoir containing 500 μ l precipitant solution. At both temperatures, evidence for crystals was found in Hampton Crystal Screen I solution No. 07, formulated with 1.4 M sodium acetate trihydrate (NaH₃OAc) and 0.1 M sodium cacodylate (NaCac) pH 6.5. For both

Figure 1

Schematic diagrams of human TR α 1 (hTR α 1) and the construct used in the crystallographic experiments (hTR α 1 construct), showing the N-terminal, DBD (DNA-binding), hinge (connecting region) and LBD (ligand-binding) domains. Numbers indicate the amino-acid positions in the receptors. The amino acids of the plasmid pET28a(+) that is coexpressed with hTR α 1 construct are shown.

the T3 and Triac complexes, further optimization at 291 K led to crystallization conditions similar to those reported for human TR β LBD complexes (Wagner *et al.*, 2001). A reservoir solution containing 1.0 M NaCac and 0.1 M NaH₃OAc pH 7.2 was mixed with protein solution in equal amounts and equilibrated against reservoir solution at 291 K. Well formed crystals grew within 12–24 h.

Two different crystal forms of hTR α 1 in complex with T3 have been obtained (Table 1). Crystals were grown under the same crystallization conditions and exhibited similar morphology (Fig. 2). In the case of the hTR α 1–Triac complex, only crystals belonging to the previously unobserved space group $P2_12_12_1$ were obtained, with unit-cell parameters similar to those of the corresponding crystal form of the hTR α 1–T3 complex; however, they had a somewhat different morphology (Table 1 and Fig. 3).

2.3. Data collection

X-ray diffraction experiments were performed with a MAR Research MAR345dtb image-plate detector mounted on a Rigaku UltraX 18 rotating-anode X-ray generator providing Cu K α radiation (1.5418 Å), operated at 50 kV and 100 mA and equipped with Osmic confocal Max-Flux optics.

Figure 2
Single crystals of hTR α 1 in complex with T3. Typical dimensions are $0.5 \times 0.4 \times 0.3$ mm.

Figure 3
hTR α 1–Triac crystals measuring approximately ~ 0.5 mm in the longest dimension.

To prevent radiation damage, cryocrystallographic techniques (Garman & Schneider, 1997) were employed. Crystals were briefly soaked in a cryoprotectant solution containing 1.0 M NaCac, 0.1 M NaH₃OAc pH 7.2 and 20% (v/v) ethylene glycol and rapidly cooled in a gaseous nitrogen stream (Oxford Cryosystems). Data were collected by the oscillation method from single crystals maintained at 100 K during data collection. In all cases, the oscillation range was 1° , with exposure times of 6 min (T3 complex, space group $P2_12_12_1$), 15 min (T3 complex, space group $C2$) and 20 min (Triac complex) per image (Fig. 4).

A single data set was collected for each crystal form of hTR α 1–T3. X-ray data for the orthorhombic crystal were collected with a crystal-to-detector distance of 150 mm, giving an outer edge resolution of 1.86 Å. For the monoclinic form, the crystal-to-detector distance was set to 200 mm, with a maximum resolution of 2.21 Å at the detector edge. The hTR α 1–Triac data set was collected using a crystal-to-detector distance of 170 mm, with an outer edge resolution of 2.00 Å.

3. Results and discussion

Data reduction was performed using *MOSFLM* and *SCALA* (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994; Winn *et al.*, 1997). Crystal parameters and data-collection statistics are summarized in Table 1. The solvent content was calculated using the total molecular weight of the hTR α 1 amino-acid sequence in addition to 21 amino acids from the initiation codon, yielding a polypeptide of 284 amino acids (MW = 32 205 Da; Table 1). The correct

number of molecules present in the asymmetric unit (AU) was determined during the molecular-replacement procedure.

Primary sequence search and sequence alignments were performed using *ENTREZ* and *BLAST* (Altschul *et al.*, 1997). A sequence identity of 83%, with 92% similarity, resulted from the alignment of hTR α 1 (Nakai *et al.*, 1988) and human TR β (Weinberger *et al.*, 1986; Sakurai *et al.*, 1990). Thus, chain A of the corresponding dimeric X-ray structure (PDB code 1bsx; Darimont *et al.*, 1998) was used as a search model (waters, the T3 molecule and a peptide fragment of GRIP1, a coactivator, were excluded from the search model). It is worth noting that the recently reported thyroid receptor structures (PDB codes 1nav and 1nax; Ye *et al.*, 2003) could equally well be used in this case.

Molecular-replacement calculations were carried out using a resolution range of 10.0–4.0 Å and default parameters in the program *AMoRe* (Navaza, 1994; Collaborative Computational Project, Number 4, 1994; Winn *et al.*, 1997). In all cases, clear solutions were obtained for one molecule in the AU. A search for a second molecule was not successful. After fitting, correlation coefficients of 60.2, 62.9 and 62.4% resulted for hTR α 1–T3 in the orthorhombic crystal form, hTR α 1–T3 in the monoclinic form and hTR α 1–Triac, respectively. The corresponding *R* factors were 41.7, 39.5 and 41.9%, respectively.

The I atoms present in the T3 and Triac molecules provided significant anomalous signal, except in the case of the monoclinic form of hTR α 1–T3 complex, the data set of which contains a smaller number of images. Thus, to certify whether the ligands were

Figure 4
A 1° oscillation frame from a cryocooled hTR α 1–T3 crystal. Diffraction spots with *hkl* indices $(-21, -28, 1)$, $(-21, -29, 1)$ and $(-22, -31, 0)$ were marked at resolutions of 2.03, 2.00 and 1.88 Å, respectively. The resolution at the edge of the image is 1.87 Å.

Figure 5
Stereoview of the hTR α 1-T3 complex ligand-binding region. Initial $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ (blue) and $F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ (red) electron-density maps were contoured at the 1.0σ and 3.0σ levels, respectively, around the model (C^α trace, coloured yellow). The figure unequivocally indicates the presence of the ligand. The drawing was prepared using PyMOL (DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA; <http://www.pymol.org>).

bound to the active sites in the three structures, the following procedure was employed. For each complex, an initial model was built by application of the suitable molecular-replacement solution (PDBSET; Collaborative Computational Project, Number 4, 1994; Winn *et al.*, 1997), from which structure factors were derived using the program SFALL (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994; Winn *et al.*, 1997). Electron-density maps ($2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ and $F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$) were calculated and extended around the initial model. The known ligand-binding region was assessed by visual inspection using the program O (Kleywegt *et al.*, 2001), contouring the $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ and $F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ maps at the 1.0σ and 3.0σ levels, respectively. This approach was successful in clearly identifying the presence of the ligand in all three initial structures, as expected.

Fig. 5 illustrates this result for the hTR α 1-T3 complex in the orthorhombic crystal form. Structural refinement is in progress.

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) via grants 02/13577-0 and 99/03387-4, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and National Institutes of Health Grant DK41842 (to JDB). JDB has proprietary interests in and serves as a consultant and Deputy Director to Karo Bio AB, which has commercial interests in this area of research.

References

- Altschul, S. F., Madden, T., Schffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997). *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389–3402.
Collaborative Computational Project, Number 4 (1994). *Acta Cryst.* **D50**, 760–763.

- Darimont, B. D., Wagner, R. L., Apriletti, J. W., Stallcup, M. R., Kushner, P. J., Baxter, J. D., Fletterick, R. J. & Yamamoto, K. R. (1998). *Genes Dev.* **12**, 3343–3356.
Dow, R. L. *et al.* (2003). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **13**, 379–382.
Evans, R. M. (1988). *Science*, **240**, 889–895.
Forrest, D. & Vennström, B. (2000). *Thyroid*, **10**, 41–52.
Garman, E. F. & Schneider, T. R. (1997). *J. Appl. Cryst.* **30**, 211–237.
Gloss, B., Trost, S., Bluhm, W., Swanson, E., Clark, R., Winkfein, R., Janzen, K., Giles, W., Chasande, O., Samarut, J. & Dillmann, W. (2001). *Endocrinology*, **142**, 544–550.
Jancarik, J. & Kim, S.-H. (1991). *J. Appl. Cryst.* **24**, 409–411.
Johansson, C., Vennström, B. & Thoren, P. (1998). *Am. J. Physiol.* **275**, R640–R646.
Kleywegt, G., Zou, J., Kjeldgaard, M. & Jones, T. (2001). *International Tables for Crystallography*, Vol. F, edited by M. G. Rossmann & E. Arnold, ch. 17.1, pp. 353–356, 366–367. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
Laudet, V., Hanni, C., Coll, J., Catzeflis, F. & Stehelin, D. (1992). *EMBO J.* **11**, 1003–1013.
Nakai, A., Sakurai, A., Bell, G. I. & DeGroot, L. J. (1988). *Mol. Endocrinol.* **2**, 1087–1092.
Navaza, J. (1994). *Acta Cryst.* **A50**, 157–163.
Ribeiro, R. C., Kushner, P. & Baxter, J. D. (1995). *Annu. Rev. Med.* **46**, 443–453.
Sakurai, A., Nakai, A. & DeGroot, L. J. (1990). *Mol. Cell. Endocrinol.* **71**, 83–91.
Schwartz, H. L., Strait, K. A., Ling, N. C. & Oppenheimer, J. H. (1992). *J. Biol. Chem.* **267**, 11794–11799.
Tsai, M. & O'Malley, B. W. (1994). *Annu. Rev. Biochem.*, **63**, 451–486.
Wagner, R. L., Apriletti, J. W., McGrath, M. E., West, B. L., Baxter, J. D. & Fletterick, R. J. (1995). *Nature (London)*, **378**, 690–697.
Wagner, R. L., Huber, B. R., Shiau, A. K., Kelly, A., Cunha Lima, S. T., Scanlan, T. S., Apriletti, J. W., Baxter, J. D., West, B. L. & Fletterick, R. J. (2001). *Mol. Endocrinol.* **15**, 398–410.
Weinberger, C., Thompson, C. C., Ong, E. S., Lebo, R., Gruol, D. J. & Evans, R. M. (1986). *Nature (London)*, **324**, 641–646.
Wikström, L., Johansson, C., Salto, C., Barlow, C., Campos Barros, A., Bass, F., Forrest, D., Thoren, P. & Vennström, B. (1998). *EMBO J.* **17**, 455–461.
Winn, M., Dodson, E. J. & Ralph, A. (1997). *Methods Enzymol.* **277**, 620–633.
Ye, L., Li, Y., Mellstrom, K., Mellin, C., Bladh, L. G., Koehler, K., Garg, N., Garcia Collazo, A. M., Litten, C., Husman, B., Persson, K., Ljunggren, J., Grover, G., Sleph, P. G., George, R. & Malm, J. (2003). *J. Med. Chem.* **46**, 1580–1588.
Yen, P. M. (2001). *Physiol. Rev.* **81**, 1097–1142.