Universidade De São Paulo

INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

Ana Carolina Migliorini Figueira

Oligomerização, estruturas à baixa resolução, ligação ao DNA e ao ligante dos Receptores de Hormônios Tireoidianos.

São Carlos, 2008.

Ana Carolina Migliorini Figueira

Oligomerização, estruturas à baixa resolução, ligação ao DNA e ao ligante dos Receptores de Hormônios Tireoidianos.

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

Area de concentração: Física Aplicada, opção Física Biomolecular.
Orientador: Prof. Dr. Igor Polikarpov

São Carlos, 2008.

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

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca e Informação IFSC/USP

Figueira, Ana Carolina Migliorini.
Oligomerização, estruturas à baixa resolução, ligação ao DNA e ao ligante dos receptores de hormônios tireoidianos./Ana Carolina Migliorini Figueira; orientador Igor Polikarpov.-São Carlos, 2008.
190 p.

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

1. Receptor de hormônios tireoidianos. 2. Oligomerização. 3. Afinidade ao DNA. 4. Analise estrutural. I. Título.

..

Dedicatória

Ao Fê e a meus pais.

Agradecimentos

A todos os que estiveram ao meu lado, dentro e fora do Instituto de Fisica Aos que ouviram meus desabafos sobre os sucessos e inssucessos obtidos durante esta etapa da minha vida.

Aos meus pais pelo eterno incentivo e apoio, à minha mãe pelos genes da curiosidade e ao meu pai pelos genes da determinação. Obrigada pela presença constante em minha vida (mesmo à distância). Ao Fe, pelo apoio, confiança e companheirismo. Obrigada por entender os momentos de ausência, pelo respeito e por estar ao meu lado sempre.

Ao Prof. Dr. Igor Polikarpov, pela orientação, por me inserir no mundo complexo e extraordinário dos receptores nucleares e por me colocar em contato com novas técnicas e excelentes pesquisadores, os quais foram de grande valia para meu desenvolvimento científico.

Ao Prof. Dr. Luis Maurício R. T. Lima pela orientação nos experimentos de fluorescência e pelas conersas demasiadamente proveitosas. Ao Prof. Dr. Mario S. Palma, pelo auxilio e atenção nos experimentos de espectrometria de massas.

Aos professores do Grupo de Cristalografia, Adriano, Otavio, Richard, Glaucius e Eduardo pelas discussões altamente proveitosas dentro e fora das disciplinas. À Fapesp pela manutenção e financiamento desse trabalho.

À Sandra Martha, exemplo de dedicação e competência, minha primeira orientadora, que me deixou como herança a continuação de seu trabalho.

À aluna de iniciação e amiga Amanda Bernardes, que me ensinou a orientar e muito me auxiliou nesse período. Muito Obrigada, pois sem você teria sido muito mais difícil!

À Maria (mainha) pela ajuda em todos os momentos, pela clareza e atenção nas explicações, pela orientação e pela ajuda na correção do manuscrito. Ao João Renato pela ajuda constante, pelas piadinhas, pelo "pente fino" no manuscrito e pelas críticas. Ao Mário (minimi) pelo companheirismo e pela grande ajuda nos experimentos de SAXS.

Às amigas Nádia H., Lívia S. e Dani Trivella, pela ajuda, os toques, os congressos, as cervejas, enfim, por serem amigas. Às Amigas-irmãs Mayra, Tati e Thaise, as quais, perto ou longe, estão sempre comigo, ouvindo e palpitando.

Ao povo das antigas, que foram desbravar outros mundos, Claudia Munte, Mário S., Adriana, Marcão, Monique, Marcos C., André, Ronaldo, Ney, Sandra K., Rodrigo, Fred, Bete e Wânius pelas discussões, pelas lições de senso crítico, pelos conselhos e ensinamentos. A todos os amigos e colegas do grupo de cristalografia: Ana Leticia, Fernanda B., Fernanda C., Patrícia, Leandra, Caqui, Alexandre, Carol G., Lívia M., Mamé, Lisandra, Jaque, Napo, Marta, Humberto, Suzana, Karime, Renata, Deise, Tati, Tavin, Nico, Sonoda, Leo, Tiago, Aline, Lucas, Nathalia, Nayara, Bianca, Marcos, Kelven e Mineiro (Huita) pelos "helps" no laboratório, ou pelos simples - bom dia, que ouvi. Ao pessoal da secretaria Fernando e Lu; ao Augusto e Ge, que sempre se dispuseram em me ajudar, no momento em que eu precisasse.

Por fim, a todos os que eu esqueci, por um problema de memória e falta de sono, que geralmente ocorre com quem está prestes a defender. E, como de praxe, mas não sem importância, a todos os que de maneira direta ou indireta contribuíram para que esse trabalho pudesse ser realizado: **Muito Obrigada!**

"Uma longa viagem começa sempre com o primeiro passo". (Lao Tsé)

Resumo

Os receptores tireoidianos (TRs) são proteínas envolvidas em várias funções fisiológicas importantes para os organismos, pois são potentes reguladores do desenvolvimento, divisão e diferenciação celular, metabolismo e homeostase. Eles são responsáveis pela regulação da transcrição de genes-alvo específicos, mediando efeitos pleiotrópicos de hormônios lipofílicos nas células. Na ausência de ligantes essas proteínas estão complexadas a correpressores, impedindo a transcrição de genes por elas regulados. Por outro lado, a presença do ligante induz à transcrição através da ligação a elementos responsivos do DNA e coativadores. Nesse trabalho alguns aspectos do TR foram evidenciados, permintindo-se um melhor conhecimento acerca do funcionamento e estrutura desse receptor. Os experimentos de oligomerização revelaram a presença dos tetrâmeros do TR, os quais estavam restritos ao Receptor X Retinóico, sugerindo mecanismos novos na regulação do receptor. Os ensaios de raios-X a baixos ângulos resultaram nos primeiros modelos estruturais de baixa resolução de construções maiores do TR, demonstrando o correto posicionamento de seus domínios em sua estrutura geral, o que forneceu informações importantes sobre sua estrutura geral. Os experimentos de fluorescência avaliaram a ligação desses receptores a diversos elementos responsivos, em termos de constantes de dissociação e seletividade para cada um deles. E, por fim, os experimentos de troca de hidrogênio por deutério revelaram a movimentação que ocorre no domínio de ligação do ligante do receptor antes e após a adição do ligante T3. Esses resultados ampliam um pouco mais os conhecimentos sobre os mecanismos de ação e sobre a estrutura quaternária dos TR, promovendo um melhor entendimento dos conceitos básicos envolvidos na atuação dessas macromoléculas, as quais estão inseridas em redes complexas de regulação e interação com outras proteínas.

Palavras-chave: Receptor de homônios Tireoidianos. Oligomerização. Afinidade ao DNA. Análise estrutural.

Abstract

The thyroid receptors (TRs) are proteins, which are involved in diverse and important physiological functions in the organisms, since they are regulators of development, cell divison and differentiation, metabolism and homeostasis. They are responsible by the regulation of specific gene transcription, through pleiotropic effects of lipophilic hormones in the cells. In the absence of the ligand these proteins are complexed to correpressors and block the transcription of genes that are regulated by them On the other hand, in the presence of the ligand transcription is induced through the binding of the receptors to DNA response elements and coactivators. New findings about TR described in this study helped to improve the understanding of the function and structure of the receptor. This was accomplished by: oligomerization experiments which showed the presence of TR tetramers, a quarternary structure described before only for the Retinoid Receptor X, and suggested new regulation mechanisms for the receptors; the small angle X-ray scattering assays which resulted in the first low resolution structural models of bigger constructions of TR, showing the correct position of TR domains and providing important information about the global TR structure; the anisotropy fluorescence experiments which evaluated the binding of these receptors to diverse response elements, in terms of dissociation constants and selectivity for each one of the HREs tested; and finally, the hydrogen/deuterium experiments which revealed the ligand binding domain mobility before and after the ligand addition. In summary, we can say that these results all together extended the knowledge about the TR action mechanisms and its quarternary strucuture, providing better understanding of the basic concepts involved in these macromolecules behavior, which are inserted into a complex network of regulation and interaction with other proteins.

Keywords: Thyroid hormone receptor. Oligomerization. DNA affinity. Structural analysis.

Lista de Figuras

Figura 1 – Mecanismos gerais da regulação gênica através dos hormônios esteroidianos, tireoidianos, ácido retinóico e vitamina D (figura adaptada de Nelson e Cox, 2005). 22
Figura 2 – Os domínios comuns dos RNs com suas principais funções evidenciadas (Figura modificada de Moore *et al.,* 2006).....25
Figura 3 – Mecanismo de ação dos RNs. **a.** Os receptores nucleares são sintetizados no citoplasma e podem ficar associados a proteínas ou serem transportados para o núcleo celular, na presença ou ausência de ligantes. **b.** Na ausência de ligantes os receptores ligados às HREs interagem com complexos de correpressores, com proteínas que possuem atividade de histonas deacetilases (HADC). **c.** Após a ligação do ligante, os correpressores se dissociam e ocorre o recrutamento de moléculas coativadoras. **d.** Essas contém atividade de histonas acetilases (HAT), desenovelando a cromatina e estabilizando a ligação dos receptores (CRM), permitindo a desrepressão do mecanismo de transcrição. **e.** Outras moléculas coativadoras são recrutadas (mediador TAF), que estabilizam a ligação do complexo formado pela holoenzima RNA polimerase II, ativando a transcrição..... 29
Figura 4 – Comparação das homologias de aminoácidos e das propriedades funcionais entre as diversas isoformas do receptor TR. O tamanho da isoforma (em número de aminoácidos) é dado nas extremidades dos diagramas, e a porcentagem de similaridade entre os aminoácidos para cada domínio e em relação à isoforma TRβ2, está incluída dentro dos diagramas. A presença ou ausência das propriedades descritas na tabela ao lado do diagrama, para cada isoforma, é representada por + e –. 32
Figura 5 – A. Estrutura cristalográfica do heterodímero RXR-TR DBDs, complexados ao HRE DR-4. O RXR está representado em azul e o TR em rosa, os íons zinco estão representados pelas esferas em cinza. (2NLL) **B.** TR β 1 DBD, em que se observa a formação da hélice c, a qual nem sempre aparece estruturadapara os RNs. **C.** Estruturação do DBD, com as regiões do P-*box*, que coincide com a hélice a; o D-*box* ; a hélice b; a hélice c, que coincide com o T-*box*; e o A-*box*. As hélices estão representadas pelos retângulos pontilhados em rosa e os *boxes*, pelos quadros em azul ou magenta. NH_2 e CTE são siglas para N-terminal e C-terminal. 34
Figura 6 – Estrutura tridimensional do TR β1 LBD complexado com o ligante T3, ilustrando o posicionamento do ligante, que se encontra totalmente enterrado na estrutura da proteína e a composição básica deste domínio (estrutura retirada do PDB 2H6W). 35
Figura 7 – Mecanismo de ratoeira dos RNs. Estrutura tridimensional do RXR sem ligante (azul) evidenciando a conformação apo ou inativa da hélice 12 (em amarelo, circulada em vermelho) e estrutura tridimensional do TR com o ligante T3 (rosa) demonstrando o posicionamento holo ou ativo da hélice 12 (amarelo), o ligante está evidenciado em ciano. 36
Figura 8 – A. Sobreposição das estruturas de TR α1 e β1 (Azul e rosa, respectivamente) complexadas com T3 (creme), demonstrando que poucas diferenças são encontradas no enovelamento protéico, a única diferença se dá pela substituição de Ser227 (TR α1) por Asp331(TR β1), em ciano. Ao lado está a representação dos contatos que ocorrem com o ligante no interior do bolsão de ligação do hormônio, para TR α1 (**B**) e TR β1 (**C**). As esferas em rosa demonstram os contatos entre a parte polar do ligante e o sitio de ligação. È possível observar que o TRβ estabiliza melhor o ligante por conter uma ligação de hidrogênio a mais em seu sítio. 38
Figura 9 - Mecanismo de ação dos TRs. O TR dimeriza (homo ou heterodimero) através da interface de dimerização presente no LBD. O dímero formado se liga ao DNA através do DBD. Para que o DBD possa reconhecer diferentes arranjos de elementos do DNA é necessário que o *hinge* seja bastante flexível, promovendo torções de até 180° entre os DBDs, estabilizando a interface de dimerização presente nos LBDs.....40
Figura 10 – Estruturas dos principais hormônios tireoidianos T3 e T4. 42
Figura 11 - Mecanismos de produção dos hormônios tireoidianos. A parte superior da figura representa a regulação hormonal que controla a produção de T3 e T4, abaixo tem-se o detalhe de uma célula tireoidiana, explicando como ocorre a síntese hormonal. 43
Figura 12 – Estrutura do ligante Triac. 44
Figura 13 – Esquema contendo as principais construções de TR α1 e β1 utilizadas nesse trabalho nos próximos capítulos, com a numeração do aminoácido (aa) inicial e final de cada construção. A, B, C, D e E são os domínios pertencentes à cada construção. 52
Figura 14 - (A) Estrutura cristalográfica representada como superfície de *van der Walls* dos átomos do LBD do RXR α1 humano associado como tetrâmero; A1 e A2 são os monômeros que compõem um dos dímeros, B1 e B2 são os monômeros do outro dímero. (B) Mesma estrutura representada em *cartoon*, indicando a interface de dimerização de cada dímero (quadro pontilhado em rosa, H9/H9, em marrom), e os contatos da interface de tetramerização (quadro pontilhado em verde)

H3/H3, em laranja; H11/H11 em azul; e H12/ sitio de coativador, em vermelho (PDB ID 1G1U , Gamp Jr 2000). 81
Figura 15. SDS-PAGE de *pools* de frações coletadas contendo as proteínas TR β1 DBD-LBD (**A**), LBD E202 (**B**) e LBD E209 (**C**), após cromatografia de afinidade, fenil e gel filtração, corados com *Coomassie Blue*. Os marcadores de massa molecular estão evidenciados nas figuras. M = marcador de massa molecular , **1**. Extrato após incubação com resina de afinidade, **2**.Lavagens da coluna de afinidade, **3**.Frações coletadas da coluna de afinidade e **4**. Frações coletadas da coluna de gel filtração. 83
Figura 16 – Gel SDS PAGE da purificação do TR α1 completo (**A**) e TR α LBD-DBD (**B**). Após cromatografia de afinidade e gel filtração, corados com *Coomassie Blue*. Os marcadores de massa molecular estão evidenciados nas figuras. M = marcador de massa molecular , **1**.Extrato após incubação com resina de afinidade, **2**.Frações coletadas da coluna de afinidade e **3**. Frações coletadas da coluna de gel filtração. 84
Figura 17 - Gel de tricina do ensaio de clivagem do TR β1 DBD-LBD com trombina protease. Na Primeira coluna está o conjunto de proteínas marcadoras de marcadores de massa molecular (**M**). Nas colunas seguintes estão representados os tempos de incubação para a clivagem de 0, 2, 4, 6, 16, 20 h. 85
Figura 18 - A. Gel nativo do ensaio de clivagem da cauda de histidina do TR β1 DBD-LBD apresentando diferenças nos tamanhos das bandas entre 0 e 2 horas de incubação com trombina. **B.** Membrana do *blotting* corada com os anticorpos anti-cauda de histidina. Os anticorpos reconheceram apenas a cauda de histidina nos tempos 0 e 1 hora, comprovando que a partir de duas horas, a cauda de histidina foi removida da proteína. **M.** Marcador de massa molecular, 0, 1, 2, 4 e 6 são os tempos de incubação, em horas, utilizados nos ensaios. 85
Figura 19 – Gel SDS PAGE de 10% acrilamida ilustrando a clivagem da fusão TR α completo – cauda de histidina. Em primeiro lugar tem-se os marcadores de massa molecular. Nas canaletas seguintes do gel está a reação de clivagem da proteína nos tempos 0, 2, 3, 4, 5, 6, 8 e 20 horas. É possível observar que após 5 horas de clivagem a abanda superior desaparece (seta), constatando a clivagem completa do receptor, após 20 horas a quantidade do receptor no gel é bem menor, o que pode indicar degradação. 86
Figura 20 – Gel SDS PAGE de 10% acrilamida ilustrando a clivagem da fusão entre o TR α DBD-LBD e a proteína SUMO. Em primeiro lugar tem-se os marcadores de massa molecular (**M**). Em **0** tem-se a proteína purificada antes da clivagem (representada em azul), em **1.** está representada a mistura das três proteínas (TR em rosa, ULP1 em verde e SUMO, em amarelo) após a clivagem com a protease ULP1, **2** e **3.** representam a proteína após a separação através de um coluna de afinidade à cauda de histidina. 86
Figura 21 – Eletroforese não desnaturante. As analises das espécies do apo-TR β1 DBD-LBD e holo-TR β1 DBD-LBD foram feitas em gel com um gradiente de 8-25% de acrilamida em pH 8,8 a 10 °C e coradas com *Coomassie blue* A concentração de proteína aplicada foi de 1, 3, 5, 7 e 10 mg/mL para o complexo TR-T3 (**A**) e 1, 3, 5 e 7 mg/mL para o apo-TR (**B**). Para o cálculo dos raios do TR, proteínas de raio e massa molecular conhecidas (**M.** proteínas do padrão →Tiroglobulina, ferritina, catalase, aldolase e Albumina) foram submetidas a eletroforese e seus fatores de retardação em gel foram plotados como*100xLog(100xRf) versus* Rh (nm) (**C**)..... 87
Figura 22 - Crosslinking químico do holo- e apo TR β1 DBD-LBD (+T3 e –T3, respectivamente). A proteína a 0,6 mg/ml foi submetida ao *crosslinking* com 0,05 μM DSS, e aplicada em um gel SDS-PAGE, com 10% de acrilamida, e coradas com *Coomassie blue*. T-tetramero, D-dimero, M-Monomero, os marcadores de massa molecular estão representados na figura. 88
Figura 23 – Perfil cromatográfico do Apo-TR β1 DBD-LBD aplicado na superdex 200 10/30 em diversas concentrações. O raio hidrodinâmico do principal pico de eluição foi 4,2 nm (D) e o ombro correspondente aos tetrâmeros apresentou um raio de aproximadamente 5,5 nm (T)..... 89
Figura 24 – perfil cromatográfico do Holo-TR β1 DBD-LBD aplicado na superdex 200 10/30 em diversas concentrações. O raio hidrodinâmico do principal pico de eluição foi 3,6 nm (M) e o ombro correspondente aos dímeros apresentou um raio de aproximadamente 4,2 nm (D).....90
Figura 25 – Raios hidrodinâmicos do TR β1 DBD-LBD com e sem ligante, em função da concentração proteica. Os raios do Holo TR (triângulos em rosa) se apresentam como dímeros; o Apo-TR (pontos em laranja) se apresenta como tetrâmeros, sendo que apenas nas maiores concentrações apresentam raios maiores (possíveis agregados). **T.** Tetrâmeros **D.** Dímeros..... 91
Figura 26 - Gel nativo da proteína TR E202 sem ligante (-T3) e com ligante (+T3). Os marcadores de massa molecular representam a migração equivalentes a 669 kDa, 440 kDa, 232 kDa, 140 kDa e 67 kDa. As setas indicam a migração das bandas nas posições calculadas para tetrâmeros (T), dímeros (D) e monômeros (M). As concentrações de proteína usadas são 1, 3, 5, 7,e 10 mg/mL..... 93
Figura 27 - Gel nativo da proteína TR E209 em pETDuet sem ligante (-T3) e com ligante (+T3). Os marcadores de massa molecular representam a migração equivalentes a 669 kDa, 440 kDa, 232 kDa, 140 kDa

e 67 kDa. As setas indicam a migração das bandas nas posições calculadas para dímeros (D) e monômeros (M). As concentrações de proteína usadas são 1, 3, 5, 7 e 10 mg/mL..... 94
Figura 28- Crosslinking químico do holo- e apo TR β1 LBD (+T3 e –T3, respectivamente). A proteína a 1mg/ml foi *crosslinkada* com 0,05μM DSS, e aplicada em um gel SDS-PAGE, com 10% de acrilamida e coradas com Coomassie blue. D-dimero, M-Monomero, os marcadores de peso molecular estão representados na figura... 94
Figura 29 – Perfil cromatográfico do Apo-TR β1 LBD aplicado na superdex 75 10/30 em diversas concentrações. Os raios hidrodinâmicos dos picos de eluição variaram entre 2,9 nm (1 mg/mL) a 3,3 nm (7 mg/mL) o que corresponde a uma mistura de dímeros e monômeros, com predominância de dímeros. 95
Figura 30 – Perfil cromatográfico do Holo-TR β1 LBD aplicado na superdex 75 10/30 em diversas concentrações. Os raios hidrodinâmicos dos picos de eluição variaram entre 2,6 nm (1mg/mL) a 3,05 nm (7 mg/mL) o que corresponde a uma mistura de dímeros e monômeros, com predominância de monômeros. 96
Figura 31 - Gel nativo da proteína TR α1 completo sem ligante (-) e com ligante (+). Os marcadores de massa molecular (**M**) representam a migração equivalentes a 669 kDa, 440 kDa, 232 kDa, 140 kDa e 67 kDa. As setas indicam a migração das bandas nas posições calculadas para dímeros (D) e monômeros (M). As concentrações de proteína usadas são 1, 5, e 8 mg/mL..... 97
Figura 32 - Gel nativo da proteína TR α1 DBD-LBD sem ligante (-) e com ligante (+). Os marcadores de massa molecular (**M**) representam a migração equivalentes a 669 kDa, 440 kDa, 232 kDa, 140 kDa e 67 kDa. As setas indicam a migração das bandas nas posições calculadas para dímeros (D) e monômeros (M). As concentrações de proteína usadas são 3, 8 e11 mg/mL..... 98
Figura 33 - Gel nativo com 10% de acrilamida, da proteína TR α1 completo e TR α1 DBD-LBD sem (-) e com (+) ligante (**T3**) ou DNA (**F2**). As setas indicam a diferença na migração entre as isoformas, o dímero do TR α1 completo é maior que o do DBD-LBD. As concentrações de proteína usadas são 2,5 e 5 mg/mL. 98
Figura 34 - Modelos de baixa resolução de dímeros e tetrâmeros do RXR DBD-LBD, obtidos por SAXS. (a), (b) e (c) São as representações das visões ortoscópicas dos modelos. (Fischer *et al*., 2003).....104
Figura 35- Curvas experimentais de espalhamento**.** ***A*****,** dímero. ***B***, tetrâmero. log I *versus q* focando-se no ajuste dos dados experimentais em altos valores de *q* com um inserto contendo os gráficos de Guinier (log I *versus* q^2). (*1*), curva experimental; (*2*) intensidade de espalhamento calculado DAMs (DAMMIN); (*3*) intensidade do espalhamento dos modelos de alta resolução.....105
Figura 36 – Função de distribuição de distâncias dos dímeros (rosa) e tetrâmeros (violeta) do hTR β1 DBD-LBD. 106
Figura 37- Três vistas ortogonais do envelope de SAXS dos dímeros do holo-TR β1 DBD-LBD derivado de cálculos *ab initio*. Os envelopes moleculares foram obtidos por expansões de harmônios esféricos (SASHA) e estão representados pela superfície sólida em cinza, os modelos de átomos Dummy, obtidos pelo programa DAMMIN, estão representados pelas esferas em ciano..... 107
Figura 38- Três vistas ortogonais do envelope de SAXS dos tetrâmeros do apo-TR β1 DBD-LBD derivado de cálculos *ab initio*. Os envelopes moleculares foram obtidos por expansões de harmônios esféricos (SASHA) e estão representados pela superfície sólida em cinza, os modelos de átomos Dummy, obtidos pelo programa DAMMIN, estão representados pelas esferas em ciano..... 107
Figura 39- Envelopes dos dímeros de hTR β1 DBD-LBD derivados de calculus *ab initio***.** Superposição da média de 20 modelos DAMs obtidos pelo DAMMIN e das estruturas obtidas por raios-x de dois hTR β1 DBDs e dois hTR β1 LBDs. Os modelos foram rotacionados a 90° em torno do eixo y e x. 109
Figura 40- Envelopes dos tetrâmeros de hTR β1 DBD-LBD derivados de calculus *ab initio***.** Superposição da media de 10 DAMs obtidos pelo DAMMIN e das estruturas obtidas por raios-x de quatro hTR β DBDs e quatro hTR β1 LBDs. Os modelos foram rotacionados a 90° em torno do eixo y e x. ..110
Figura 41- Curva experimental de espalhamento. log I *versus q* focando-se no ajuste dos dados experimentais em altos valores de *q* com um inserto contendo os gráficos de Guinier (log I *versus* q^2). (*1*), curva experimental; (*2*) intensidade de espalhamento calculado DAMs (DAMMIN); (*3*) intensidade do espalhamento dos modelos de alta resolução. 110
Figura 42 – Curvas de distribuição de distancias do o TR β1 DBD-LBD complexado ao elemento responsivo F2 e dos dímeros do TR β1 DBD-LBD complexado com ligante. Pode-se observar que o perfil da curva é típico de moléculas alongadas e que o holo-TR é menor que o TR com DNA..... 111
Figura 43 - Envelopes dos dímeros de hTR β1 DBD-LBD com F2 derivados de calculo *ab initio***.** Superposição da media de 10 DAMs obtidos pelo DAMMIN e das estruturas obtidas por raios-x de dois hTR β DBDs e dois hTR β1 LBDs. Os modelos foram rotacionados a 90° em torno do eixo y e x..... 113

Figura 45 – Curvas de espalhamento do TR α1 DBD-LBD na presença e ausência de T3, demonstrando as semelhanças entre o espalhamento da proteínas em duas preparações diferentes..... 113
Figura 46- Curva experimental de espalhamento. log I *versus q* focando-se no ajuste dos dados experimentais em altos valores de *q* com um inserto contendo os gráficos de Guinier (log I *versus* q^2). (*1*), curva experimental; (*2*) intensidade de espalhamento calculado DAMs (DAMMIN); (*3*) intensidade do espalhamento dos modelos de alta resolução..... 114
Figura 47 - Curva de distribuição de distâncias de hTR α1 DBD-LBD, a 8 mg/ml, na presença de ligante..... 114
Figura 48- Envelopes dos dímeros de hTR α1 DBD-LBD derivados de calculo *ab initio***.** Superposição da média de 10 DAMs obtidos pelo DAMMIN e das estruturas obtidas por raios-x de dois hTR β DBDs e dois hTR β1 LBDs. Os modelos foram rotacionados a 90° em torno do eixo y e x..... 116
Figura 49- Curva experimental de espalhamento. log I *versus q* focando-se no ajuste dos dados experimentais em altos valores de *q* com um inserto contendo os gráficos de Guinier (log I *versus* q^2). (*1*), curva experimental; (*2*) intensidade de espalhamento calculado DAMs (DAMMIN). 116
Figura 50 - Gráfico das distribuições de distâncias calculadas a partir dos dados de SAXS do TR α completo sem T3 a 5 e 2,5 mg/mL (1 e 2, respectivamente) e com ligante T3 a 5 e 2.5 mg/mL (3 e 4, respectivamente). O gráfico demonstra que não ocorrem modificações estruturais muito significativas entre as duas preparações da proteína (apo- e holo). 117
Figura 51 - Sobreposição das curvas de distribuição de distancias –p(r) (acima) e das intensidades de espalhamento (abaixo) do TR α1 completo com e sem T3, TR α1 DBD-LBD e TR β1 DBD-LBD, evidenciando as diferenças estruturais encontradas para cada modelo gerado por SAXS..... 118
Figura 52- Modelo de baixa resolução no TR α1 completo, com a estrutura cristalográfica do domínio LBD ajustada ao modelo. O envelope se apresenta prolato, com uma ligeira torção entre a região onde se acomoda o LBD e a região do DBD. Os modelos foram rotacionados a 90° em torno do eixo y e x. 119
Figura 53 - Modelos gerados por SAXS para TR α DBD-LBD (azul), TR β DBD-LBD (rosa) e TRα completo (roxo), evidenciando as diferenças estruturais encontradas, é possível observar que no primeiro modelo os DBDs se encontram em uma conformação mais aberta; no segundo modelo, a conformação dos DBDs é intermediária e, no terceiro, fechada e mantida pelos N-terminais, que estão interagindo (linha pontilhada). Também se observa que a isoforma α apresenta uma torção dos LBDs em relação aos DBDs, o que não ocorre na isoforma β. 120
Figura 54 – Sobreposição dos modelos gerados por SAXS para TR α DBD-LBD (azul), TR β DBD-LBD (rosa) e TRα completo (roxo), evidenciando as diferenças estruturais encontradas e o formato mais alongado do TR completo..... 120
Figura 55 – Curvas de anisotropia de fluorescência da ligação TR DBD com diferentes HREs, F2, PAL, DR-4 e DR-1, na ausência (**A**) e presença (**B**) de $MgCl_2$ 130
Figura 56 – Curvas de anisotropia de fluorescência da ligação TR DBD-LBD com diferentes HREs, F2, PAL, DR-4 e DR-1, na ausência (**A**) e presença (**B**) de $MgCl_2$ 131
Figura 57 – Curvas de anisotropia de fluorescência da ligação TR DBD-LBD com F2 em 100, 200 e 300mM NaCl, demonstrando o deslocamento da afinidade à medida que a concentração salina é aumentada..... 133
Figura 58 – Gráfico logarítimico das constantes de dissociação do TR-DBD-LBD ligado ao F2 em diferentes concentrações de NaCl..... 134
Figura 59 - Gel nativo do TR DBD-LBD na ausência e presença de 4 diferentes elementos responsivos, F2, TRE PAL, DR-4 e DR-1. O gel foi corado com brometo de etidio (**A**) e, posteriormente com Coomassie (**B**), para que se pudesse visualizar o DNA e a proteína. As canaletas do gel correspondem a 1 e 1', TR DBD-LBD sem DNA, tetrâmero; 2 e 2', TR DBD-LBD com F2; 3 e 3', com TRE PAL; 4 e 4', com DR-4; 5 e 5', com DR-1. Pode-se notar que a ligação dos 3 primeiros DNAs são melhores que o último, DR-1. **D**. Dímeros, **T**. Tetrâmeros..... 135
Figura 60- Curvas estequiométricas de associação TR DBD-LBD e TR DBD ao elemento responsivo TREpal, as retas pontilhadas foram adicionadas para demonstrar onde se localizam os pontos de inflexão das curvas, os quais estão em torno de 4μM, o que representa duas vezes a concentração de DNA utilizado no experimento..... 135
Figura 61 – Curva de associação TR-TR por anisotropia de fluorescência. Pode-se notar um platô bem definido, o qual pelos experimentos realizados em solução acredita-se que seja um equilíbrio entre M-D. 136
Figura 62- Perfil de associação dos complexos formados entre o TR DBD-LBD e TR DBD e a seqüência aleatória de DNA, a qual não contém o motivo AGGTCA, na ausência (**A**) e presença (**B**) de $MgCl_2$. 137

Figura 63 - Perfil de dissociação dos complexos formados entre o TR DBD-LBD e os diferentes elementos responsivos utilizados nos experimentos – F2, TREpal, DR-4 e DR-1, na ausência (**A**) e ausência (**B**) de $MgCl_2$. 137
Figura 64 - Perfil de dissociação dos complexos formados entre o TR DBD e os diferentes elementos responsivos utilizados nos experimentos – F2, TREpal, DR-4 e DR-1, na ausência (**A**) e ausência (**B**) de $MgCl_2$. 138
Figura 65 - Curvas de afinidade do TR α1 completo aos diferentes HREs- F2, TREpal, DR-4 e D-1, na presença e ausência de T3. 140
Figura 66 – Gráfico de correlação entre as constantes de afinidade obtidas para o TR β1 DBD e LBD, correlacionando as diferenças de afinidade para cada construção. 143
Figura 67 – Gráfico das constantes de dissociação do TR α1 completo sem e com o ligante, T3, para os diferentes elementos responsivos utilizados nos experimentos de anisotropia de fluorescência. 145
Figura 68 – Gráfico das constantes de dissociação do TR β1 DBD sem e com o cloreto de magnésio, para os diferentes elementos responsivos utilizados nos experimentos de anisotropia de fluorescência. 146
Figura 69 – Gráfico das constantes de dissociação do TR β1 DBD-LBD sem e com o cloreto de magnésio, para os diferentes elementos responsivos utilizados nos experimentos de anisotropia de fluorescência. 147
Figura 70 – Gráfico das constantes de dissociação do TR α1 completo sem e com o cloreto de magnésio, para os diferentes elementos responsivos utilizados nos experimentos de anisotropia de fluorescência. 147
Figura 71 - Espectro de massa do TRβ1 LBD, com dois picos, o menor é referente aos monômeros (28.045Da) e o maior, referente aos dímeros (59.990Da)..... 152
Figura 72 – Número de deutérios incorporados pelo TR LBD, em cada tempo de deuteração da proteína inteira, na ausência (azul escuro) e presença de ligante (azul claro). A troca de deutério da holo proteína foi menor que os níveis de incorporação do apo-TR, o que sugere proteção do ligante nas trocas H/D 153
Figura 73- Seqüência da proteína analisada por massa e os peptídeos gerados por sua digestão (linhas pretas e vermelhas). As linhas vermelhas representam os peptídeos que foram utilizados na análise de deuteração da proteína. 153
Figure 74. Número de deutérios incorporados para cada peptídeo na presença (barras azuis) e ausência (barras rosa) do ligante..... 154
Figura 75 – Alinhamento da seqüência do TR LBD em cada tempo do experimento (t1 a t8 - 1, 3, 8, 15, 60, 180, 300 e 480 minutos). As trocas H/D para apo- e holo- TR estão representadas por **A** e **B,** respectivamente. As taxas de deutério incorporado estão representadas na figura pelas cores: vermelho demonstra incorporação maior que 85%; laranja, de 85 a 70%; amarelo, entre 70 e 50%; verde escuro, entre 50 e 35%; verde claro, entre 35 e 25%; e azul, abaixo de 15%. A estrutura secundaria foi determinada pelo programa DSSP e está representada por α1 - α12 para α-hélices e α1 - α4, para fitas. A última linha representa a hidrofobicidade de cada resíduo..... 157
Figura 76 - Gráfico da diferença de incorporação de deutério entre apo- e holo-TR. Este gráfico demonstra as diferenças de incorporação para cada peptídeo, em cada tempo de exposição. α 1-12 representam as posições das α-hélices..... 159
Figura 77 – Estrutura do TR β LBD colorida de acordo com as diferenças na tomada de deutério entre apo- e holo-TR. O gradiente de cores indica como as duas formas das proteínas se comportam de maneira diferente. A parte em rosa indica que TR+T3 apresentou uma mobilidade que variou de 0 a 30% a mais que o apo-TR. As demais cores indicam as regiões do apo-TR que apresentam maior mobilidade, com variação de 0 a 50%. 161
Figura 78 – Holo- e apo-TR coloridos de acordo com a incorporação de deutério de cada peptídeo, nos 8 tempos do experimento (1min, 3min, 8min, 15 min, 60min, 180min, 300min, 480min.). O degradê de cores, do azul ao vermelho, representado nas figuras, indicam baixas a altas taxas de incorporação de deutério. 163
Figura 79 – Comparação entre os fatores de temperatura obtidos do cristal do TR β1 LBD (2H6W), em cinza claro, com a taxa de incorporação de deutério, cinza escuro, para cada peptídeo estudado. No quadro em rosa temos a região onde o padrão de mobilidade é diferenciado para as duas medidas. 164
Figura 80 - Cinética de incorporação de deutério, nos diferentes tempos do experimento para cada peptídeo correspondente às hélices H1, H2, H3 (a, b e c, são o N-terminal, o meio e o C-terminal da H3), H4, H5 (a e b são o N-terminal e o c-terminal), H6, H7, H8, H9, H10, H11 e H12 e as fitas-β S3 e S4. com esse gráficos é possível observar as diferenças na tomada de D_20 para apo- e holo-TR. 166

Lista de tabelas

Tabela 1- *Detalhes da expressão de todas as isoformas e construções utilizadas* 54
Tabela 2- *Parâmetros experimentais e calculados para os dados de SAXS* 108
Tabela 3 - *Parâmetros experimentais e calculados para os dados de SAXS* 112
Tabela 5 - *Parâmetros experimentais e calculados para os dados de SAXS* 117
Tabela 6 – *Afinidade de ligação TR DBD aos HREs* 127
Tabela 7 – *Afiinidade de ligação TR DBD-LBD aos HREs* 129
Tabela 8 – *Afinidade de ligação TR completo aos HREs* 139
Tabela 9 – *Constantes de dissociação para TR α1 completo, na presença de* $MgCl_2$ 141
Tabela 10 - *Diferenças no padrão de incorporação de deutério* 158

Lista de Abreviações

TR- Receptor de Hormônio Tireoidiano,

RN – Receptor Nuclear

TH – Hormônio Tireoidiano

HRE- Elemento responsive ao hormonio

TRE – elemento responsive ao hormonio tireoidiano,

DBD – Dominio de Ligação ao DNA,

LBD – Dominio de Ligação ao Ligante,

T3 – Triiodotironina

T4 - Tiroxina

bp - par de base,

RXR – Receptor X retinoico

F2 – Palindromo Invertido espaçado por 6 pares de base,

TRE Pal – palindrome invertido sem espaçamento,

DR-1 – Repetição direta com espaçamento de 1 par de base,

DR-4 – Repetição direta com espaçamento de 4 pares de base

H/D – Hidrogenio/Deutério,

apo-TR – TR sem Ligante,

holo-TR – TR com ligante,

H – α-Hélice,

S – fita-β,

AF-1 - função de ativação 1,

AF-2 - função de ativação 2,

LB – Meio de cultura Luria Broth;

IPTG – Isopropylthio-β-D-galactopiranoside,

PMSF – Phenylmethylsulfonylfluoride,

DTT – Ditiotreitol,

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida com sulfato de dodecil-sódio,

PDB – Banco de dados de proteínas,

DLS – Espalhamento Dinâmico de Luz,

SAXS – Espalhamento de Raios-X a baixos ângulos,

GN – Gel Nativo,

OMS- Organização Mundial de Saúde.

Sumário

PRÓLOGO i
Capitulo 1 - Introdução Geral: Os Receptores Nucleares 20
1.1. Introdução geral 21
1.1.1. A transdução de sinais e os receptores nucleares 21
1.1.2. A superfamília dos receptores nucleares 23
1.1.3. A estrutura modular dos RNs 25
1.1.4. Mecanismo de ação dos RNs – interação com coativadores e correpressores 27
1.2. O receptor de hormônios tireoidianos 31
1.2.1. Detalhes estruturais do DBD 33
1.2.3. Funcionamento dos TRs 38
2.4. Os Hormônios metabólicos do TR 42
2.5. Fisiologia e importância médica do T3 45
Capitulo 2 - Objetivos e Justificativa do Trabalho 48
Capitulo 3 - Metodologias Utilizadas 51
3.1. Informações sobre os clones, proteínas utilizadas e construções. 52
3.2. Transformação em *Escherichia coli* BL21(DE_3) e DH5α 53
3.3. Expressão de proteínas. 53
3.4. Preparo do extrato protéico. 54
3.6. Purificação por interação hidrofóbica 56
3.7. Purificação por Gel Filtração 57
3.8. Clivagem da cauda de histidina 57
3.10. Clivagem da SUMO 59
3.11. Estudos de oligomerização 59
3.11.1. Gel filtração analítica 59
3.11.2. Eletroforese por gel não desnaturante (gel nativo) 61
3.11.4. Crosslinking químico 64
3.12. Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS) 65
3.12.1. Construção dos modelos 68
3.13. Anisotropia de fluorescência da ligação TR-DNA 69
3.13.1. Preparo dos oligonucleotídeos sintéticos 70
3.13.2. Gel nativo TR DBD-LDB com seus elementos responsivos 71
3.13.3. Medidas de Anisotropia de fluorescência 71
3.13.5. Ensaio de titulação de interação TR-DNA 73
3.14. Estudos de dinâmica da ligação do ligante por espectrometria de massas 74
Capitulo 4 - Oligomerização do TR em Solução 78
4.1. Introdução 78
4.1.1. Oligomerização dos receptores nucleares 79
4.2. Resultados 81
4.2.1. Purificação do TR β1 DBD-LBD, TR β1 LBD E202 e TR β1 LBD E209 81
4.2.1.2. Purificação do TR α1 completo e TR α1 DBD-LBD 83
4.2.2. Remoção das fusões 84
4.2.2.1. Remoção da cauda de histidina do TRβ1 ΔAB ou TRβ1 DBD-LBD. 84
4.2.2.2. Clivagem da fusão com a SUMO. 86
4.3. Estudos de oligomerização do TR β1 DBD-LBD 87
4.3.1. Eletroforese por gel não desnaturante. 87
4.3.2. *Crosslinking* químico 88
4.3.4. A dependência da concentração do TRβ1 DBD-LBD na formação de tetrâmeros 88

4.4. Estudos de oligomerização do TR β1 LBD 92
4.4.1. Eletroforese por gel não desnaturante 92
4.2. Crosslinking químico. 94
4.4.3. Gel filtração analítica 95
4.5. Estudos de oligomerização do TR α1 completo e DBD-LBD. 96
4.6. Discussão dos Resultados. 98
Capítulo 5 - Estudos Estruturais em Baixa Resolução do TR Através de SAXS 102
5.1. Introdução. 102
5.2. Resultados 105
5.2.1. Espalhamento de raios-X a baixos ângulos do TR β1 105
5.2.1.1. O TR β1 DBD-LBD com e sem ligante 105
5.2.1.2. O TR β1 DBD-LBD com o elemento responsivo F2. 110
5.2.2. Espalhamento de raios-x a baixos ângulos do TR α1 113
5.2.2.1. O TR α1 DBD-LBD com e sem ligante. 113
5.2.2.2. O TR α1 completo com e sem ligante. 116
5.3. Discussão dos resultados. 120
Capítulo 6 - Estudos da Afinidade do TR aos Elementos Responsivos ao Hormônio 125
6.1. Introdução. 125
6.2. Resultados 127
6.2.1. Estudos de ligação do TR β1 DBD-LBD e TR β1 DBD a diferentes HREs 127
6.2.1.1. A influência da força iônica na ligação TR-DNA 132
6.2.1.2. A estequiometria de ligação TR-DNA 134
6.2.1.3. Ensaios de interação TR-TR 135
6.2.1.5. A dissociação dos complexos TR-DNA 137
6.2.2. TR alfa completo com e sem T3 139
6.3. Discussão dos Resultados. 142
Capítulo 7 - Estudos da Dinâmica da Ligação do Hormônio por Espectrometria de Massas.. 149
7.1. Introdução. 149
7.2. Resultados. 152
7.3. Discussão dos Resultados 165
Capítulo 8 - Conclusões e Perspectivas do Trabalho 169
8.1. Conclusões dos Resultados. 169
8.2. Perspectivas 173
Capítulo 9 - Referências 175
Anexo 1 – Artigos Publicados 190

PRÓLOGO

Essa tese irá abordar assuntos relevantes sobre os receptores nucleares, em particular, sobre os receptores dos hormônios tireoidianos, principal assunto dos estudos realizados nesse trabalho.

Para facilitar a leitura, optou-se pela divisão desta tese em capítulos. O primeiro capítulo irá abordar aspectos gerais sobre os receptores nucleares e sobre os receptores dos hormônios tireoidianos. O segundo capítulo irá expor os principais objetivos e justificativas do trabalho. Toda a metodologia utilizada nos estudos que serão expostos será sintetizada no capítulo 3. Por fim, os capítulos seguintes irão abordar os principais resultados obtidos nesse estudo, iniciando-se pelos estudos de oligomerização do receptor (capítulo 4), seguido pelos estudos estruturais em solução (capitulo 5), estudos de ligação do receptor aos principais elementos responsivos (capitulo 6) e estudos de dinâmica da ligação ao ligante (capitulo 7), terminando com uma breve conclusão geral (capitulo 8).

Todos os resultados expostos estão escritos na forma de artigos científicos, os quais foram publicados ou estão em fase de correção para serem submetidos para publicação em revistas internacionais indexadas (anexo1).

Capítulo 1 – Introdução Geral: Os Receptores Nucleares

Neste capítulo introdutório serão expostos os principais assuntos sobre os receptores nucleares em geral e sobre o receptor dos hormônios tireoidianos, alvo principal dos estudos que compõem essa tese. A proposta desse capítulo é contextualizar, com base na literatura, sobre aspectos importantes como a identificação dos receptores nucleares, sua divisão em uma superfamília, seus principais papéis e formas de atuação. Além disso, serão abordados temas mais específicos sobre os receptores dos hormônios tireoidianos.

1.1. Introdução geral

1.1.1. A transdução de sinais e os receptores nucleares

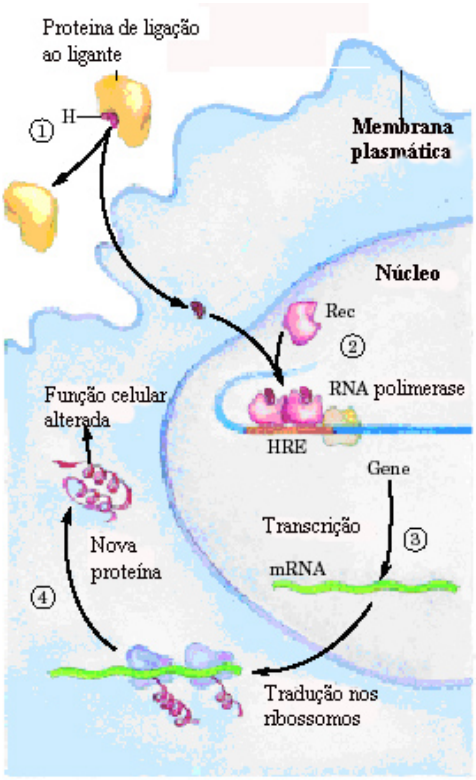
Os organismos multicelulares são compostos de células diferenciadas que executam diversas funções e requerem comunicações intra- e inter-celulares específicas para a organização de diversos eventos, como a embriogênese e a manutenção de propriedades e funções fisiológicas, durante toda a vida. A comunicação através de moléculas tornou-se um dos maiores paradigmas desenvolvidos pelos metazoários para prover uma rede complexa de sinalização celular. Esse intercâmbio de informações ocorre através da detecção de sinais, os quais são enviados a moléculas receptoras e resulta na conversão de uma resposta molecular, uma propriedade universal das células vivas, a qual é chamada de transdução de sinais[1].

Para que haja comunicação celular é necessária a secreção de centenas de tipos de moléculas, incluindo proteínas, pequenos peptídeos, aminoácidos, nucleotídeos, esteróides, retinóides, derivados de ácidos graxos e gases como óxido nítrico e monóxido de carbono[2]. A resposta a esses sinais é efetuada após a complexação dessas moléculas a proteínas específicas, denominadas receptores, desencadeando diversos processos de respostas nas células-alvo. Dentre o vasto grupo dos receptores estão os de resposta rápida (composto por proteínas transmembranares que atuam como canais iônicos), receptores enzimáticos, serpenteantes e de adesão[1]. Alguns desses receptores estão localizados na membrana plasmática e exercem seus papéis induzindo a ativação de cascatas de sinalização formadas por proteínas quinases.

O outro grupo de receptores, os **receptores nucleares** ou de resposta lenta, funcionam em resposta a moléculas pequenas e hidrofóbicas, como hormônios esteroidais, vitaminas e intermediários metabólicos, as quais penetram nas células-alvo, atingindo seu alvo no núcleo celular[2].

Os receptores nucleares (RNs) constituem uma superfamília de fatores de transcrição induzidos por ligantes, que atuam diretamente na iniciação e regulação de programas de

expressão gênica (**Fig. 1**). Esta superfamília é formada pelos receptores de hormônios lipofílicos - esteróides, retinóides, vitamina D e tireoidianos; de metabólitos endógenos - como ácidos biliares e oxiesterol; e também, de alguns receptores de xenobióticos - que induzem a produção de citocromo P450, facilitando os processos de desintoxicação[3].



1) O hormônio (H), carregado por proteínas transportadoras, se difunde para o interior das células e liga-se ao receptor nuclear (Rec).
2) A ligação do ligante muda a conformação do Rec, o qual forma homo- ou heterodímeros e liga-se às seqüências de DNA (HREs).
3) A ligação regula a transcrição de genes adjacentes, aumentando ou diminuindo a taxa de formação de mRNA.
4) Níveis alterados de produtos gênicos produzem a resposta celular ao hormônio.

Figura 1 – Mecanismos gerais da regulação gênica através dos hormônios esteroidianos, tireoidianos, ácido retinóico e vitamina D (figura adaptada de 1).

A superfamília dos receptores nucleares é composta, geralmente, de proteínas de 50 a 100kDa que estão envolvidas em praticamente todas as funções fisiológicas do organismo, atuando como potentes reguladores do desenvolvimento, metabolismo, homeostase, divisão e diferenciação celular[4]. Essas proteínas são responsáveis pela regulação da transcrição de genes-alvo, mediando os efeitos pleiotrópicos dos hormônios lipofílicos nas células de três maneiras distintas: atuam na ativação dependente do ligante, na repressão independente do ligante e na transrepressão da mesma[3].

Essas macromoléculas estão intimamente relacionadas a diversas doenças, principalmente a vários tipos de patologias como cânceres, osteoporose, diabetes,

inflamações, entre outras, e, por isso, têm sido consideradas "alvos" para o desenvolvimento de fármacos. Atualmente, a classe de fármacos mais procurada para a prática médica são os agonistas e antagonistas que atuam sobre os receptores nucleares. Os RNs podem atuar de diferentes maneiras, através da resposta direta, com a ativação após a ligação de uma grande variedade de sinais metabólicos e hormonais; ou pela integração de diversas vias de sinalização, através de modificações pós-traducionais e da regulação da atividade de grandes cascatas de sinalização[2].

1.1.2. A superfamília dos receptores nucleares

O ano de 1988 marcou o início dos estudos dos receptores nucleares através da identificação dos primeiros clones de cDNA que codificavam polipeptídeos com características estruturais sugestivas de receptores de moléculas hidrofóbicas pequenas[5]. Uma década depois, estudos de clonagem resultaram na identificação de mais de 50 novos RNs[6].

A superfamília dos receptores nucleares foi originalmente definida como um grupo de fatores de transcrição estruturalmente relacionados. Entre eles estão proteínas que controlam a expressão gênica em resposta a ligação de ligantes pequenos e hidrofóbicos, representados pelos hormônios esteroidianos e tireoidianos, assim como a vitamina D e derivados da vitamina A[7]. Entretanto, foi constatado que o número de receptores nucleares identificados excedia o número de hormônios lipofilicos já conhecidos. Com esse fato, os receptores que não possuíam ligantes naturais foram denominados receptores órfãos[5, 6, 8].

Sabe-se hoje, que existem no genoma humano 48 genes pertencentes a esta família[9], os quais atuam na regulação da transcrição de genes alvo, mediando a ação de hormônios esteróides, tireoidianos, retinóides e da vitamina *D,* ao se ligar ao promotor de genes-alvo da ação hormonal[10]. Os receptores nucleares são encontrados em todo o reino animal, de nemátodas a mamíferos[2], e são, portanto, proteínas cujo surgimento na escala evolutiva precede a diferenciação entre animais diploblásticos e triblásticos[11].

Análises evolutivas desses receptores demonstram uma subdivisão da superfamília dos receptores nucleares em seis diferentes subfamílias[2]. Uma das maiores subfamílias é formada pelos receptores de hormônios tireoidianos (TRs), receptores de acido retinóico (RARs), receptores de vitamina D (VDRs) e receptores ativados pela proliferação de peroxissomos (PPARs), assim como alguns receptores órfãos como o ErbA reverso. A segunda subfamília contém o receptor x retinóico (RXR) e os receptores órfãos: estimulador de ovoalbumina de galinha (COUPs), fator nuclear de hepatócito 4 (HNF4), receptores testiculares (TR2) e receptores envolvidos no desenvolvimento dos olhos (TLX e PNR). A terceira subfamília é formada pelos receptores de esteróides (receptores de estrógeno-ER, aldosterona-AR, progesterona-PR e de mineralocorticoides-MR) e receptores relacionados a esteróides (EERs), também sem ligantes definidos. A quarta, quinta e sexta famílias são formadas principalmente pelos receptores órfãos NGFI-B, FTZ-1/SF-1 e GCNF, respectivamente[8, 12, 13].

A classificação dos RNs é feita através da homologia entre os domínios de ligação ao DNA (DBD) e os domínios de ligação ao ligante (LBD) de todos os membros da família. Estudos têm demonstrado que os receptores nucleares evoluíram a partir de um ancestral que não possuía a capacidade de se ligar a ligantes, ou seja, um receptor órfão[14]. O RXR foi considerado um receptor órfão até que seu ligante, o ácido 9-cis retinóico, fosse identificado[15]. Posteriormente, um grande número de ligantes foram identificados para receptores órfãos, como os eicosanóides e tiazolidinedionas que se ligam ao PPAR[16]; os oxiesteróis, ligantes do receptor hepático x – LXR[17]; a pregnenolona e progesterona, do receptor de pregnanos x – PXR[18]; o androsterol, ligante do receptor contitutivo de androsterona – CAR[19]; e ácidos biliares, ligantes do receptor de farnesóides – FXR[20]. A identificação desses novos ligantes sugere que novas moléculas ainda devem ser encontradas para outros receptores órfãos os quais poderão ter seus papéis no controle do metabolismo, crescimento e diferenciação mais evidenciados[6, 8].

1.1.3. A estrutura modular dos RNs

Os programas genéticos regulados pelos RNs afetam virtualmente todos os aspectos da vida de organismos multicelulares, abrangendo diversas funções como a embriogênese, reprodução, crescimento e a morte celular. O poder regulatório e seletividade desses receptores têm fomentado pesquisas intensas em fatores-chave para decifrar a rede de eventos moleculares em que estão envolvidos[2]. A maior distinção entre essas proteínas e fatores de transcrição ocorre pela capacidade dos RNs de se ligarem a moléculas lipofílicas pequenas. Esses ligantes comandam sinais regulatórios, os quais modificam a atividade transcricional de seus RNs correspondentes, após sua ligação a esses ligantes[3].

Até o presente momento foram identificados, no reino animal, 65 receptores nucleares diferentes, os quais estão presentes em várias classes de eucariotos[2]. Essas proteínas constituem uma grande família de fatores de transcrição que dividem uma estrutura modular com cinco a seis domínios conservados, os quais correspondem a domínios funcionais autônomos que podem interagir entre os receptores sem perder a função[21, 22] **(Fig. 2)**.

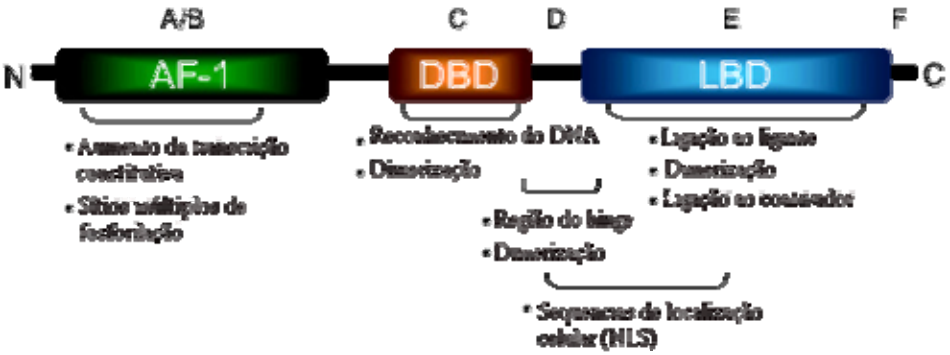


Figura 2 – Os domínios comuns dos RNs com suas principais funções evidenciadas (figura modificada de 22).

Dentre esses domínios, está a região amino-terminal, que compreende os domínios A/B. Essa região contém uma (ou mais) função de ativação autônoma (AF-1), a qual, ao interagir com os domínios de ligação ao DNA, pode ativar a transcrição de maneira constitutiva[13]. Em construções completas de receptores nucleares, AF-1 é silenciosa na ausência de agonistas e antagonistas. O domínio A/B é considerado pouco conservado entre

os RNs e a distinção entre A e B não é evidente. A alta variabilidade desta região pode ser demonstrada também através da variação de tamanho que ocorre de receptor para receptor, a qual pode conter 23 (Receptor de vitamina D) a 550 (receptor de glicocorticóides) aminoácidos[2].

Até o momento, nenhuma estrutura tridimensional deste domínio foi resolvida e faltam detalhes moleculares para o entendimento do funcionamento desta região. Alguns trabalhos reportam que esta região está sujeita a modificações pós-traducionais, como a fosforilação[23, 24]. Acredita-se que a fosforilação dos domínios A/B atua na transativação da função de ativação AF-1 e na cooperatividade com a segunda função de ativação (AF-2), localizada no domínio E. A principal função de AF-1 é conferir especificidade à célula, ao DNA e aos promotores[24, 25], a origem desse domínio ainda é elusiva, mas pode ser relacionada à ação de especificidade celular e à expressão de coativadores de AF-1.

O domínio de ligação ao DNA (DBD), também chamado região C, é altamente conservado e confere especificidade para o reconhecimento de seqüências-alvos de elementos responsivos a hormônios (HREs). Os HREs são formados por repetições hexaméricas das seqüências AGGTCA, que podem estar arranjadas em repetições diretas (DRs), palindrômicas (Pal) e em palíndromos invertidos (IPs)[2]. Este domínio tem sido exaustivamente estudado, especialmente quanto à seletividade de reconhecimento a elementos responsivos, suas propriedades de dimerização e suas estruturas tridimensionais. Até o momento, existe um número razoável de estruturas tridimensionais depositadas no PBD[26], que foram resolvidas para este domínio complexado ou não, ao DNA.

A região D constitui um domínio pouco conservado, o qual liga as regiões C e E. Esse domínio funciona como uma ponte que confere mobilidade entre os domínios bem estruturados C e E, propiciando diversas mudanças estruturais sem a criação de impedimentos estéricos, para a ligação aos diferentes arranjos de DNAs. Esta região contém o sinal de

localização nuclear (NLS), que é responsável pelo direcionamento e translocação dos receptores nucleares presentes no citoplasma, até o núcleo celular[27].

Outro domínio importante é representado como região E ou domínio de ligação ao ligante (LBD), considerado altamente estruturado e caracterizado, principalmente, pela sua capacidade de reconhecimento e ligação a ligantes. Este domínio está envolvido em várias funções reguladas pela ligação de moléculas lipofílicas, como a liberação do receptor do complexo de proteínas de choque térmico, translocação para o núcleo, homodimerização, heterodimerização, ativação da transcrição de genes-alvo[2, 13] e sua associação com proteínas co-reguladoras, como os correpressores[28, 29] e os coativadores[30, 31, 32, 33], respectivamente essenciais para repressão ou ativação de genes pelos receptores. É neste domínio que agem os agonistas e antagonistas promovendo ou bloqueando a transcrição[2]. O LBD também contém a função de ativação 2 (AF-2), uma grande interface de dimerização e, frequentemente, uma função de repressão[34, 35, 36].

A região F ou C-terminal está presente em apenas alguns receptores, como o receptor de progesterona (PR), estrógeno (ER) e de acido retinóico (RXR). Esta região é pouco conservada e ainda não se têm regras sobre sua função. Alguns trabalhos presentes na literatura apontam que esta região pode ser importante para o recrutamento de determinados coativadores, outros estudos sugerem que esta região também atua como um alvo para modificações pós-traducionais[13].

1.1.4. Mecanismo de ação dos RNs – interação com coativadores e correpressores

Os receptores nucleares, assim como todas as outras proteínas celulares, são sintetizados nos ribossomos, localizados fora do núcleo celular. A passagem dos RNs até o núcleo requer o sinal de localização celular (NLS), localizado entre as bordas dos domínios C (DBD) e D (hinge)[3]. O resultado deste transporte é que a maioria dos RNs reside no núcleo, tanto na ausência, quanto na presença de seus ligantes cognatos (**Fig 3a**). A maior exceção é o

receptor de glucocorticóides (GR), o qual na ausência do hormônio é mantido no citoplasma em complexo com chaperonas e proteínas de choque térmico (hsps). Nesse caso, a ligação do ligante induz à dissociação desse complexo, permitindo que o GR ativado pelo hormônio seja translocado até o núcleo[37].

Na ausência de ligantes, os RNs geralmente inibem a transcrição através do recrutamento de moléculas auxiliares, como correpressores, desacetilases de histonas entre outras proteínas (**Fig 3a**). Os LBDs de muitos, mas não todos, os RNs são ligados a uma gama de correpressores transcricionais, como o correpressor de receptor nuclear-1 (Ncor1), ou o mediador silencioso para receptores de retinóides e hormônios tireoidianos (NCor-2, também chamado de SMRT). Essa ligação ocorre via interações com seqüências hidrofóbicas conservadas (IDs, motivo L/IXXIIXXL), que podem ser repetidas duas a três vezes em cada correpressor. A região do correpressor que contém esse motivo conservado é chamado de *corepressor nuclear-receptor box* (CoRNR box), a qual aporta em um sulco hidrofóbico na superfície do LBD, formado pelas hélices 3 e 4. A ligação de um receptor a uma molécula correpressora induz ao recrutamento de complexos transcricionais que contém histonas deacetilases específicas (HDACs). Estas deacetilases mantêm a estrutura condensada da cromatina na região do promotor-alvo, resultando na repressão gênica (**Fig. 3b**) [37, 38, 39, 40].

Em muitos casos, o ligante agonista promove mudanças conformacionais que levam a H12 a um posicionamento alternativo junto ao cerne do LBD. Este novo posicionamento causa a destruição do sulco hidrofóbico, resultando na dissociação do complexo formado com o correpressor. Este holo-posicionamento da H12 permite que moléculas coativadoras interajam com um motivo curto formado por LXXLL (onde L é o aminoácido leucina e X é qualquer aminoácido), chamado *nuclear-receptor box,* o qual está presente em muitos coativadores e é considerado um motivo comum para a interação com LBDs de receptores nucleares (**Fig. 3c**). O motivo LXXLL reconhece uma região formada pelas hélices 3, 4 e 12 do LBD similar, mas não idêntica à região envolvida na ligação com o correpressor, e

determina uma regra decisiva no processo de interação RN-coativador[37, 38, 39].

O complexo de moléculas coativadoras contém histonas acetil-transferases (HATs) e outras proteínas que aceleram a transcrição gênica através da modificação e relaxamento da cromatina, próxima à região promotora. É através dessas proteínas que ocorre a desrepressão da transcrição (**Fig. 3d**)[37, 39, 40]. Após esta etapa, outras moléculas coativadoras participam desse complexo, recrutando e estabilizando a holoenzima RNA polimerase II (**Fig. 3e**).

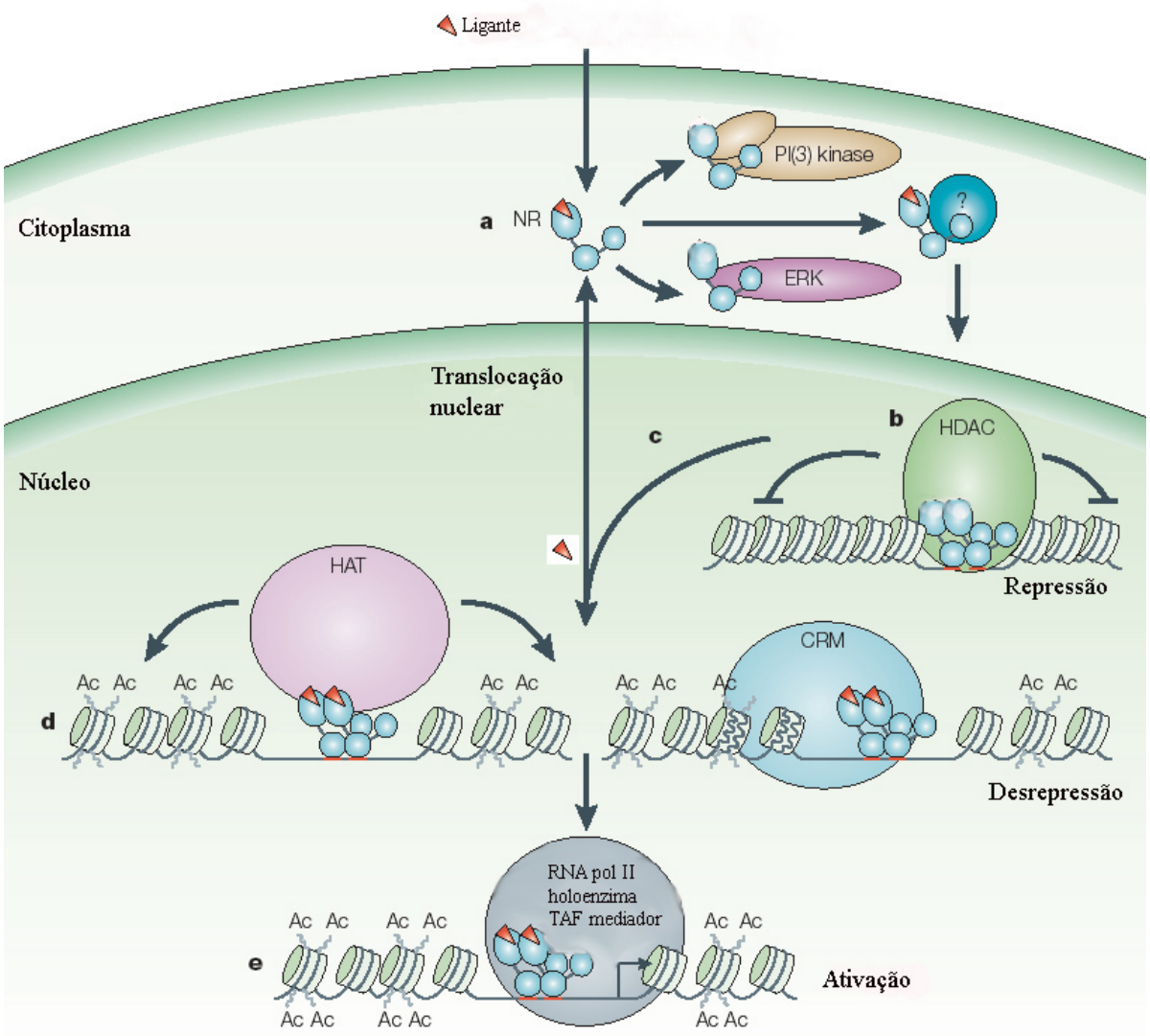


Figura 3 – Mecanismo de ação dos RNs. **a.** Os receptores nucleares são sintetizados no citoplasma e podem ficar associados a proteínas ou serem transportados para o núcleo celular, na presença ou ausência de ligantes. **b.** Na ausência de ligantes os receptores ligados às HREs interagem com complexos de correpressores, com proteínas que possuem atividade de histonas deacetilases (HADC). **c.** Após a ligação do ligante, os correpressores se dissociam e ocorre o recrutamento de moléculas coativadoras. **d.** Essas contém atividade de histonas acetilases (HAT), desenovelando a cromatina e estabilizando a ligação de coativadores (CRM), permitindo a desrepressão do mecanismo de transcrição. **e.** Outras moléculas coativadoras são recrutadas (mediador TAF, por exemplo), as quais estabilizam a ligação do complexo formado pela holoenzima RNA polimerase II, ativando a transcrição (figura modificada de 37).

Nos promotores de genes-alvo regulados pelos RNs encontram-se seqüências de bases que são responsáveis pelo reconhecimento específico do receptor, as quais compõem os chamados elementos responsivos ao hormônio (HREs). Os RNs podem atuar sobre essas seqüências na forma monomérica – como o fator esteroidogênico-1 (SF1); homodimérica - como os receptores de esteróides; ou heterodimérica com o parceiro promíscuo RXR - como os receptores de vitamina D (VDR), de hormônios tireoidianos (TR), de acido retinóico (RAR) e muitos receptores órfãos[41]. Modificações como mutações, extensões, duplicações, repetições e inversões na orientação relativa desses elementos geraram diversos tipos de HREs seletivos para cada tipo de receptor ou para uma dada classe de receptores, sendo as principais orientações dos HREs as repetições diretas espaçadas por zero a seis oligonucleotídeos; repetições invertidas, também chamadas de palindrômicas e repetições evertidas ou palíndromos invertidos[38].

Diversas estruturas cristalográficas da porção LBD dos RNs têm sido determinadas para poucos apo- (ausência de ligantes) e muitos holo- (presença de ligantes) receptores, as quais têm provido importantes informações sobre os mecanismos envolvidos na ligação do ligante e transrrepressão dos RNs[42]. Essas estruturas indicam que todos os LBDs possuem uma estrutura geral comum, composta predominantemente por 12 α-hélices[43]. O tamanho do bolsão do ligante pode variar significativamente entre os membros da família, sua entrada é fechada pela décima segunda hélice – a hélice 12, a qual forma uma estrutura em formato de uma tampa ou portão do bolsão e contém resíduos cruciais para a função de AF-2. A orientação da H12 é uma conseqüência de efeitos alostéricos induzidos pela modificação conformacional de grupamentos químicos da proteína na presença ou ausência do ligante. O posicionamento dessa hélice constitui um importante elemento na regulação dos RNs, principalmente no recrutamento de coativadores e correpressores[38].

A mudança conformacional induzida pelo agonista no LBD é uma manifestação da função de ativação de um receptor nuclear. O efeito alostérico do ligante na conformação do

LBD também pode modular a atividade da função de ativação-1 (AF-1) do N-terminal através da comunicação cruzada entre os domínios N- e C-terminais. Os detalhes precisos da interação entre os domínios C- e N-terminais ainda são desconhecidos, pois nenhuma estrutura tridimensional de um receptor nuclear completo foi determinada, porém algumas evidências dessa interação foram relatadas para o receptor de androgênios –AR[44].

Dados bioquímicos têm evidenciado uma enorme gama de fatores, geralmente componentes de complexos transcricionais multiproteicos, que coordenam a função dos RNs. Entre eles estão à família de proteínas associadas à arginina metiltransferase-1 (CARM); o complexo formado pelo fator intermediário de transcrição p160, o coativador de receptor nuclear e o coativador de receptor de esteroides (TIF/NCoA/SRC); a proteína E1A de ligação a proteína 300 (p300 ou CBP); o fator associado a p300 (PCAF); e as histonas acetiltransferases (HATs). Estas proteínas podem formar complexos estáveis em promotores responsivos, mas não necessariamente em solução. Atualmente, um grande número de proteínas que participam na regulação dos RNs tem sido descritas e, consequentemente os modelos sobre a regulação da transcrição têm se tornado extremamente complexos[8, 45].

1.2. O receptor de hormônios tireoidianos

Os hormônios tireoidianos (TH) – Triiodotironina (T3) e Tiroxina (T4) afetam muitos tecidos em mamíferos. Eles exercem efeitos profundos na taxa metabólica e consumo de oxigênio, mas também possuem funções únicas em diversos órgãos, incluindo o coração, fígado e glândula pituitária[43]. Estes hormônios atuam nesses sistemas complexos e especializados através de sua interação com seus receptores, os receptores tireoidianos – TRs, os quais regulam a transcrição de genes específicos.

No genoma humano, existem dois genes diferentes que codificam para o TR, um deles, que codifica para o TRα, está localizado no cromossomo 17 e é chamado NR1A1[46, 47]; o outro codifica para o TRβ, está localizado no cromossomo 3 e é o NR1A2[48, 49]. Cada um destes genes resultam em dois ou mais produtos (TRα1 e 2; TRβ 1 e 2), os quais diferem na

seqüência das extremidades amino (TRβ1 e TRβ2) e carboxi-terminal (TRα1 e TRα2) e são gerados pelo processamento diferencial que ocorre no RNA mensageiro[50]. A expressão destas isoformas é diferenciada em vários tecidos, o que sugere funções diferentes para as mesmas. O TRα1 representa um receptor funcional e responde ao hormônio T3, estando diretamente relacionado com o controle da taxa cardíaca[51]. O TRα2 não responde ao T3 e é uma variante que se comporta como um inibidor dominante negativo da isoforma TRα1[52]. A expressão dos transcritos para TRα1 e TRα2 em mamíferos ocorre em um grande número de tecidos, tais como cérebro, rins, coração, entre outros, durante a fase de embriogênese[53]. Após esta fase, uma particular abundância na expressão do TRα1 foi detectada na musculatura esquelética, tecido gorduroso marrom e cérebro. A taxa entre estes dois transcritos é variável de um tecido para outro, entretanto, a isoforma TRα2 é predominate em muitos casos, especialmente no cérebro[53].

As isoformas TRβ1 e TRβ2 ligam-se e respondem ao hormônio com alta especificidade. Além de estarem relacionadas com a supressão da liberação TSH (hormônio estimulador da glândula tiróide), as mutações do TRβ1 e 2 podem ocasionar na síndrome de resistência aos hormônios tireoidianos[50]. Em contraste à ampla expressão do subtipo TRα, o TRβ é mais restrito ao cérebro, olhos, pulmões, e rins, sendo a expressão regulada durante o desenvolvimento do cérebro[53, 54].

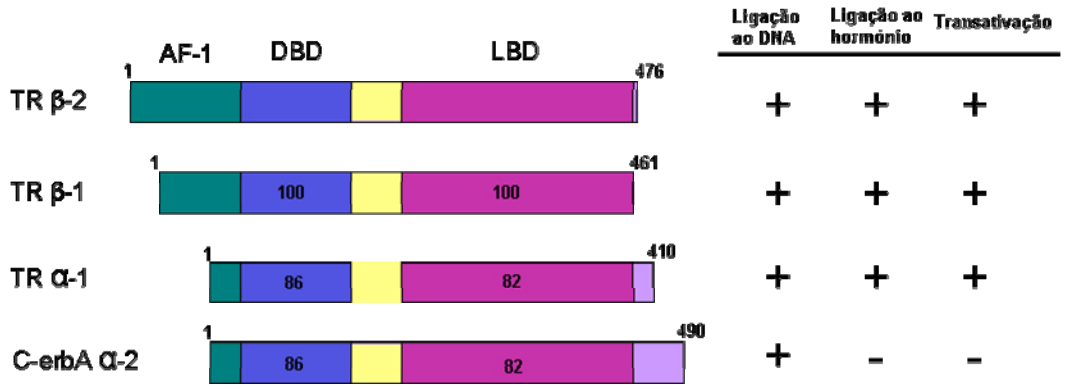


Figura 4 – Comparação das propriedades funcionais entre as diversas isoformas do receptor TR. O tamanho da isoforma (em número de aminoácidos) é dado nas extremidades dos diagramas, e a porcentagem de similaridade entre os aminoácidos para cada domínio e em relação à isoforma TRβ2, está incluída dentro dos diagramas. A presença ou ausência das propriedades descritas na tabela ao lado do diagrama, para cada isoforma, é representada por + e – (figura modificada de 46).

1.2.1. Detalhes estruturais do DBD

O domínio de ligação ao DNA está localizado na porção central do TR, sendo composto por dois motivos em dedos de zinco, caracterizados por 4 resíduos de cisteína que coordenam um íon Zn^{2+} cada. A integridade estrutural de cada dedo de zinco é crítica, pois mutações de aminoácidos ou deleções de um dos dedos de zinco podem comprometer a ligação ao DNA e, consequentemente, a atividade transcricional[55, 56, 57].

O DBD possui 4 sub-regiões, P-, D-, T- e A- *boxes*, as quais foram caracterizadas por definir ou contribuir diretamente em diversos fatores como: (1) na especificidade aos elementos responsivos; (2) na formação de uma interface de dimerização entre os DBDs[58]; (3) e no contato com a cadeia de DNA. O P-*box*, localizado no primeiro dedo de zinco, é responsável pelo reconhecimento seqüência-específico ao DNA e faz contatos com os ácidos nucléicos através de seus grupos fosfatos no sulco maior do TRE[59, 60]. O D-*box,* localizado no segundo dedo de zinco, é responsável pela formação da interface de dimerização em RXR, GR e ER, essa região possui uma arginina característica, a qual demonstra ser importante para a distinção entre os espaçamentos entre os meio-sítios dos HREs[49, 61]. As regiões de T- e A -*box*, estão envolvidas, respectivamente, na formação de contatos adicionais com o DNA para TR e NGFI e na dimerização, através de contatos adicionais da subregião distal do segundo dedo de zinco[34]. Um ponto adicional de contato entre o DBD e os HREs é a região A-*box*, a qual possui contatos importantes com o sulco menor do DNA, na região após o segundo dedo de zinco[39].

Atualmente só existe uma estrutura tridimensional do DBD do TR, obtido por cristalografia de proteínas[58] (PDB ID 2NLL). Nesta estrutura, o TR está heterodimerizado com o RXR e ambos estão complexados ao TRE DR-4. Os dois DBDs possuem as características comuns aos RNs, na qual a hélice 1 contém o P-*box* e contacta o sulco maior do DNA e a outra hélice contém o segundo dedo de zinco, estabilizando a estrutura. A interface dimérica formada nesse caso é assimétrica, com o RXR ocupando a região 5' e o

TR, na posição 3´. Esta interface é formada por resíduos do segundo dedo de zinco do RXR e a região D-*box* do TR, havendo também contribuições do primeiro dedo de zinco e do T-*box*. Um importante aspecto do DBD do TR é o fato do A-*box* no TR ser formado por uma longa hélice, a qual faz contato com o DNA na região espaçadora do TRE, indicando que sua presença impede a formação de heterodímeros TR-RXR com menor espaçamento entre os meio-sítios[59].

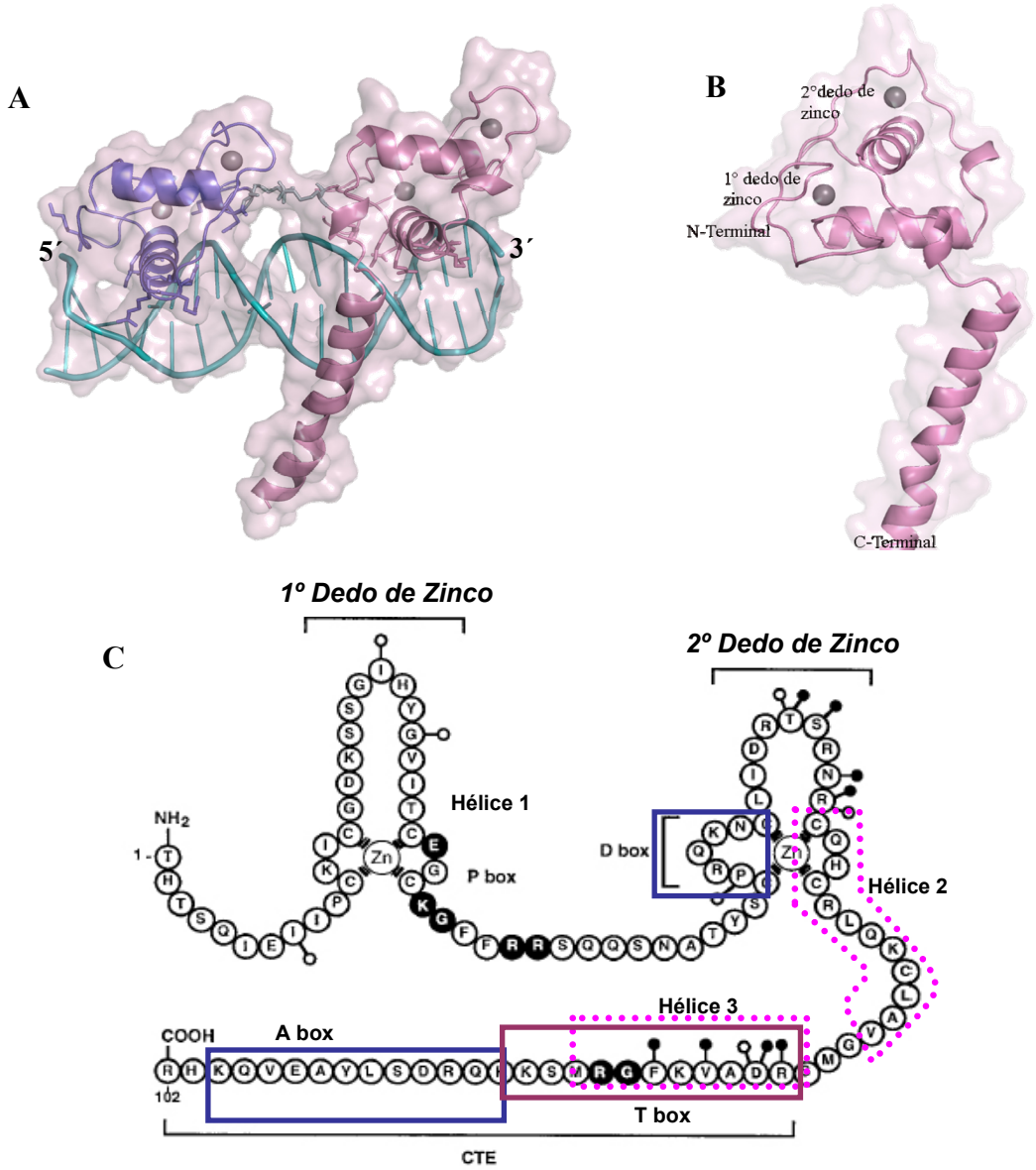


Figura 5 – A. Estrutura cristalográfica do heterodímero 5´RXR-3´TR DBDs, complexados ao HRE DR-4. O RXR está representado em azul e o TR em rosa, os íons zinco estão representados pelas esferas em cinza e o DNA em verde (PDB ID 2NLL) **B.** TR β1 DBD, em que se observa a formação da hélice 3, a qual nem sempre aparece estruturada nos RNs. **C.** Estruturação do DBD, com as regiões do P-*box*, que coincide com a hélice 1; o D-*box* ; a hélice 2; a hélice 3, que coincide com o T-*box*; e o A-*box*. As hélices estão representadas pelos retângulos pontilhados em rosa e os *boxes*, pelos quadros em azul ou magenta. NH_2 e CTE são siglas para N-terminal e C-terminal (figura modificada de 2).

1.2.2. Detalhes estruturais do LBD

Detalhes moleculares do LBD vêm sendo revelados através de uma gama de estruturas cristalográficas que foram resolvidas para esse domínio em diferentes conformações. Estudos recentes de cristalografia de raios-X com o segmento LBD de TRs[62, 63], RAR[64], RXR[65], PPAR[66] e ER[67], demonstraram que o LBD destes receptores possui uma estrutura tridimensional conservada entre os membros da superfamília.

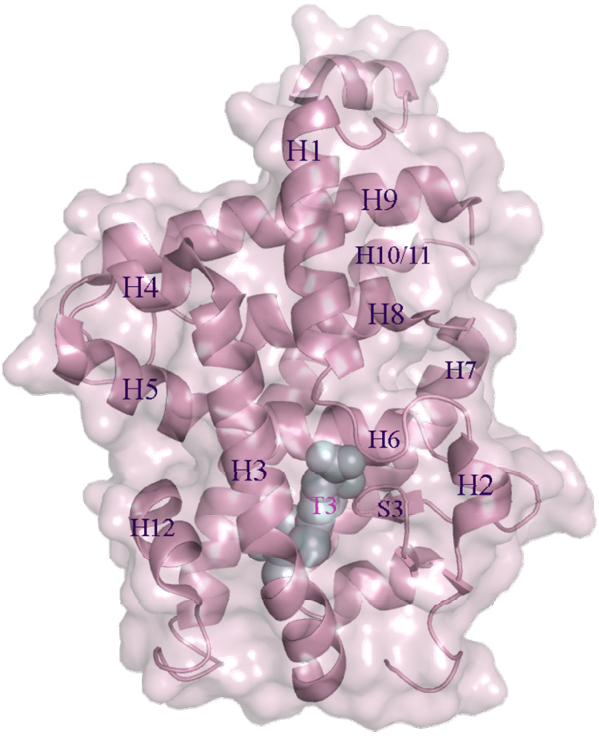


Figura 6 – Estrutura tridimensional do TR β1 LBD complexado com o ligante T3, ilustrando o posicionamento do ligante, que se encontra totalmente enterrado na estrutura da proteína e a composição básica deste domínio.

A estrutura do LBD é constituída predominantemente de um sanduíche formado por 12 α-hélices e um grampo de cabelo formado por 3 a 4 fitas-β, conectando voltas de diferentes tamanhos, conforme demonstrado na **figura 6**[35, 42]. Verificou-se também que o hormônio localiza-se no interior do receptor e não na sua superfície como se imaginava [61, 68]. A cavidade hidrofóbica do receptor onde se aloja o hormônio possui uma forma e um volume exatos para o encaixe do ligante específico[29]. Essa cavidade é formada pela superfície das hélices 3, 4 e 5 do LBD que possuem aminoácidos que estabelecem interações de alta afinidade com grupos químicos do ligante; além da hélice 12 que promove mudanças conformacionais no receptor após a ligação do hormônio, "fechando" esta cavidade do LBD[39, 50, 56].

As mudanças conformacionais geradas após a ligação do ligante são descritas como um mecanismo de "ratoeira" [38, 41, 64], na qual, após a ligação do ligante, a hélice 11 (H11) é reposicionada continuamente à H10, modificando o posicionamento da H12, a qual se dobra sobre a H6 e modifica a posição da H3 (**Fig. 7**). Em sua conformação final, a H12 funciona como um "portão" no bolsão de ligação ao ligante, que estabiliza a ligação através da contribuição do ambiente hidrofóbico e, em alguns casos, fazendo contatos adicionais com o ligante. Essa nova conformação da H12 proporciona a formação de uma região para a interação com proteínas coativadoras. Esta nova interface, chamada de AF-2 ou domínio de ativação (AD), é conservada em todos os receptores nucleares transcricionalmente ativos[69]. A importância da H12 não é restrita somente para o recrutamento de coativadores. Além da função de recrutamento de coativadores, a região de interação do apo-RN a proteínas correpressoras é topologicamente relacionada àquela envolvida na ligação de coativadores[70].

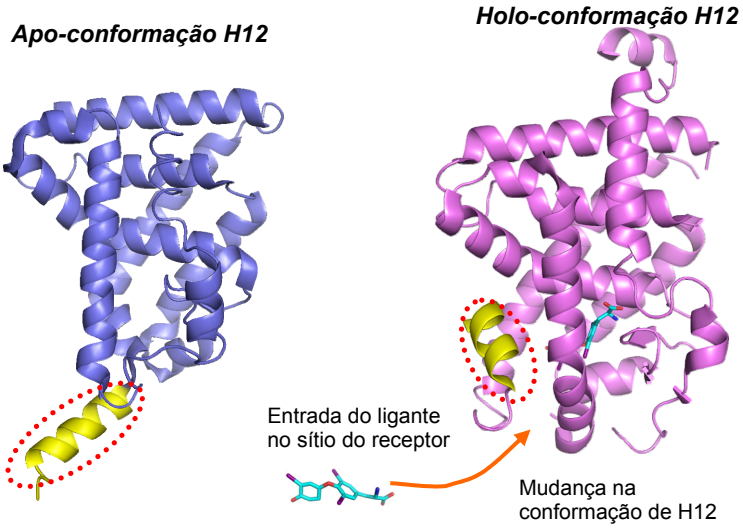


Figura 7 – Mecanismo de ratoeira dos RNs. Estrutura tridimensional do RXR sem ligante (azul) evidenciando a conformação apo ou inativa da hélice 12 (em amarelo, circulada em laranja) e estrutura tridimensional do TR com o ligante T3 (rosa) demonstrando o posicionamento holo ou ativo da hélice 12 (amarelo), o ligante está evidenciado em ciano.

A hipótese mais aceita sobre o mecanismo dinâmico da H12 atribui o papel principal da formação da holo-conformação da hélice 12, a qual sela a entrada da cavidade do ligante após a entrada do hormônio. Supõe-se que a saída do hormônio aconteça seguindo o mesmo caminho. Entretanto, estudos recentes das rotas de dissociação do hormônio (T3) do receptor

tireoideano (TR), usando técnicas computacionais de dinâmica molecular, apontam a existência de, pelo menos, três diferentes caminhos de fuga do T3 ao se dissociar do TR[71]. Isto pode indicar que vários caminhos de entrada no sítio ativo do LBD podem existir, os quais não necessariamente envolvam as mudanças conformacionais da hélice 12.

Atualmente, estão depositadas no PDB várias estruturas do LBD do TR, isoformas α e β, todas complexadas a diferentes ligantes. Estas estruturas revelam informações úteis sobre a natureza do bolsão de ligação ao ligante, sobre como agonistas podem promover o empacotamento da hélice de ativação (H12) contra o cerne do LBD e como o desenho de novos fármacos que ativam ou inibam a conformação produtiva da H12 [72]. A diversidade de estruturas dos TRs, complexados a diferentes agonistas, revelaram que o bolsão de ligação ao ligante pode ser mais flexível do que se imaginava. O LBD possui a capacidade de se rearranjar e expandir para melhor acomodar o ligante[73]. Entretanto, como nenhuma estrutura do apo-TR ou do TR complexado com antagonistas foi resolvida até o momento, os detalhes estruturais da conformação inativa da hélice 12 ainda são desconhecidos. Portanto, os mecanismos propostos para a dinâmica da H12 são resultados de estudos de outros receptores nucleares, o qual, por analogia, acredita-se que possam ser aplicados para os TRs.

As estruturas do TR revelam que poucas diferenças são encontradas entre suas isoformas. A superposição das estruturas cristalograficas obtidas para o TR α e β não apresenta diferenças muito evidentes (**Fig. 8**). Em ambos os casos, o bolsão do ligante é dividido em duas partes. A primeira delas é formada pela parte mais interna do sítio do hormônio, que faz contato com o corpo hidrofóbico do ligante. A outra, pouco hidrofóbica, é composta pela parte mais exposta do bolsão que contém a hélice 12, faz contato com a parte polar do ligante. A parte polar apresenta grandes diferenças em apenas uma região encontrada entre o grampo β, formado pelas fitas β S3 e S4 (Asn 331-Glu 333, para TR β e Ser277-Glu279, para TR α). A parte hidrofóbica é praticamente idêntica quanto às conformações estruturais e em relação aos rotâmeros de aminoácidos, entre as isoformas[74].

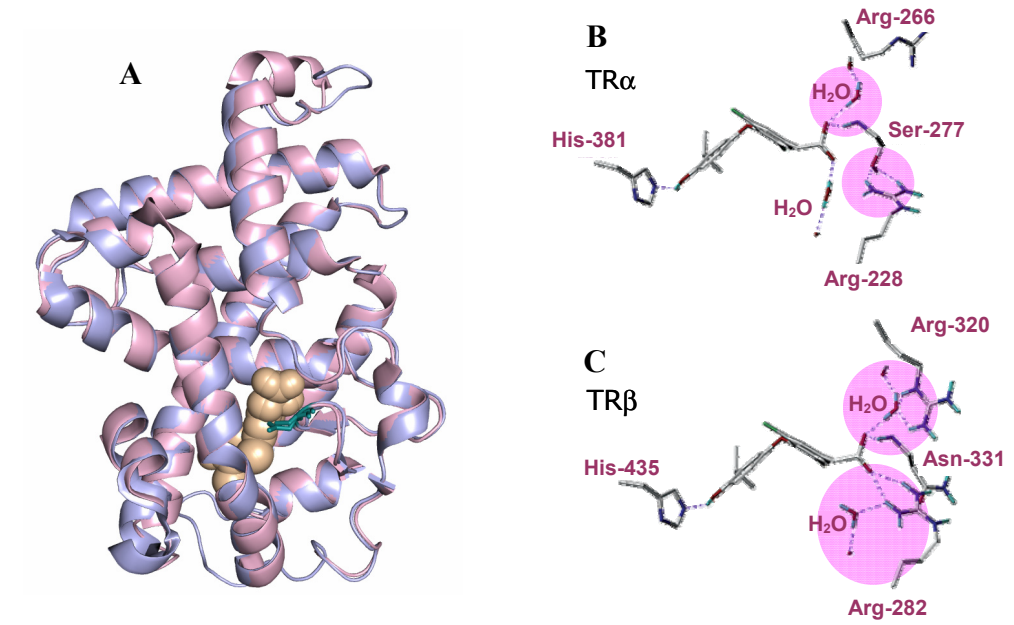


Figura 8 – A. Sobreposição das estruturas de TR α1 e β1 (azul e rosa, respectivamente) complexadas com T3 (creme), demonstrando que poucas diferenças são encontradas no enovelamento protéico, a única diferença se dá pela substituição de Ser227 (TR α1) por Asp331(TR β1), em verde. Ao lado está a representação dos contatos que ocorrem com o ligante no interior do bolsão de ligação do hormônio, para TR α1 (**B**) e TR β1 (**C**). As esferas em rosa demonstram os contatos entre a parte polar do ligante e o sítio de ligação. È possível observar que o TRβ estabiliza melhor o ligante por conter uma ligação de hidrogênio a mais em seu sítio (figura modificada de 74).

A principal diferença no bolsão de ligação do hormônio entre as duas isoformas (TR α1 e β1) é representada pela substituição de um único resíduo em cada um dos dois receptores (Ser277 em TRα e Asn331 em TRβ1), o qual poderia ser útil para o planejamento de fármacos seletivos[75]. Conforme analisado nas estruturas do TR α1 e β1 complexados com Triac e GC-1, a isoforma β apresenta-se mais próxima do ligante[76]. Esta proximidade é causada porque a modificação da Ser (TR α) pela Asn (TR β) faz com que o residuo Arg 282 seja rotacionado, aproximando-se do ligante, o que resulta na formação de uma ligação de hidrogênio à mais entre o ligante e o receptor. Isto gera uma maior estabilização do ligante no sítio de ligação do receptor, o que resulta na seletividade entre as isoformas do TR, uma característica bastante pesquisada pela química medicinal atualmente.

1.2.3. Funcionamento dos TRs

Os receptores tireoidianos podem estar localizados no núcleo celular, tanto na presença quanto na ausência de seus ligantes[77]. Alguns estudos, entretanto demonstraram que uma porção significativa do TRβ1, presente nas células, está localizado no citoplasma na

ausência de T3 e a presença desse ligante promoveria o direcionamento do receptor para o núcleo[78]. Outros estudos *in vivo* sobre o transporte núcleo-citoplasma da isoforma TRα1 revelaram que esta proteína se acumula no núcleo (principalmente na presença do T3), mas se movimenta rapidamente entre os dois compartimentos. Uma das causas observadas para o acúmulo desta isoforma no citoplasma são mutações que afetam a ligação ao DNA e a função de transativação[79]. Estudos desta isoforma apontaram o fato de que a fosforilação da mesma aumenta sua retenção nuclear e/ou inibe sua exportação do núcleo[80].

Os TRs interagem constitutivamente com elementos responsivos ao T3 (TREs) na região promotora de genes alvo, na forma de homodímeros, heterodímeros com o RXR, ou de monômeros[43]. As seqüências destes TREs são compostas por meio-sítios de hexanucleotídeos 5'-AGGTCA-3'. Em promotores de genes naturais, a maioria dos TREs consiste em dois ou mais meio-sítios orientados em repetições diretas, palíndromos ou palíndromos invertidos. O espaçamento dessas seqüências hexaméricas varia de receptor para receptor. Para o TR o espaçamento requerido para repetições diretas é composto por 4 nucleotídeos (DR-4), enquanto que para repetições palindrômicas não há espaçamento entre os meio-sitios[10] (PAL0). Estudos demonstraram que o TRβ1 expresso em bactérias pode se ligar a diferentes TREs *in vitro* (**Fig. 9**). Geralmente esta ligação pode ocorrer como monômeros em meios-sítios isolados (F2M), ou em palíndromos invertidos imperfeitos, espaçados por 4 pares de base (EM1) e em seqüências palindrômicas sem espaçamento (PAL0). A ligação como homodímeros pode ocorrer em seqüências palindrômicas sem espaçamento (PAL0), em palíndromos invertidos espaçados por 4 (EM1pal) e 6 (F2) pares de base e em repetições diretas (DR-4), esta última também é preferencial para heterodimeros TR-RXR[81].

Os receptores tireoidianos podem ativar uma gama de promotores como repressores ou ativadores de transcrição. Ao contrário dos receptores esteroidianos, o TR não complexado ao seu ligante pode estar ligado a TREs e modular a transcrição de genes-alvos. O TR pode reprimir a transcrição basal de TREs positivamente regulados[39]. A presença de T3 induz ao

decréscimo de homodímeros de TR ligados a TREs, confirmando a hipótese que homo- e heterodímeros de TR, na ausência de ligantes, podem mediar a repressão basal de determinados genes[82]. Os receptores tireoidianos possuem dois tipos básicos de função: (1) repressão transcricional dependente de ligante e (2) ativação transcricional dependente de ligante.

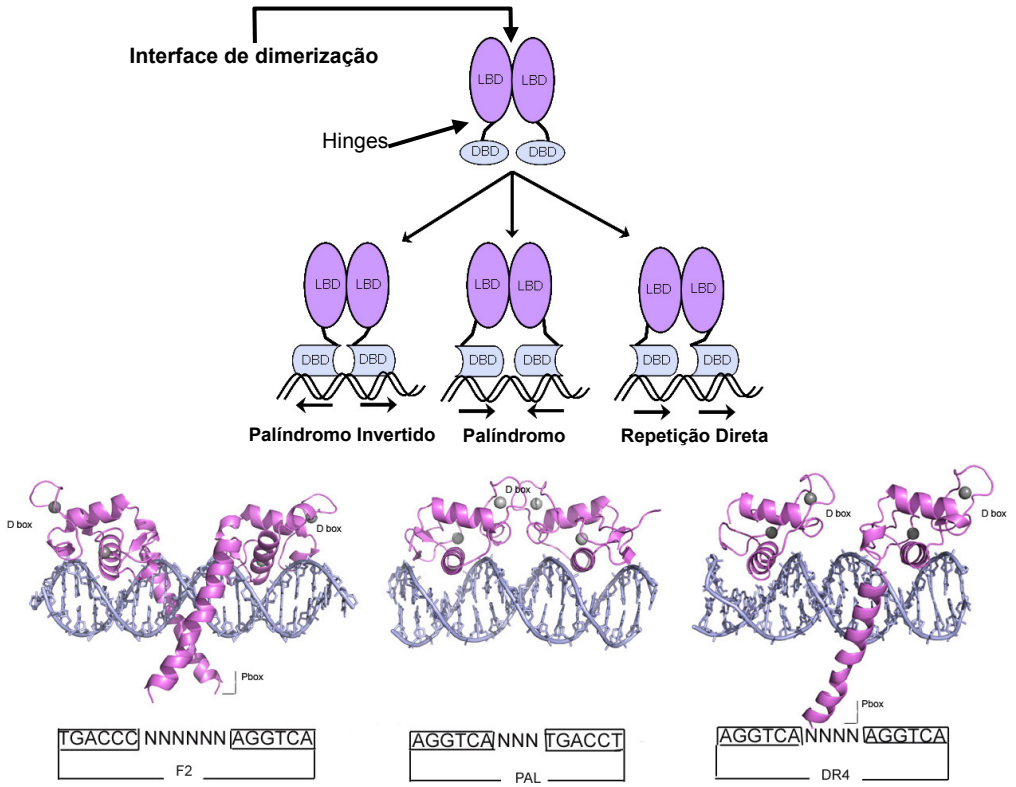


Figura 9 - Mecanismo de ação dos TRs. O TR dimeriza (homo ou heterodimero) através da interface de dimerização presente no LBD. O dímero formado se liga ao DNA através do DBD. Para que o DBD possa reconhecer diferentes arranjos de elementos do DNA é necessário que o *hinge* seja bastante flexível, promovendo torções de até 180° entre os DBDs, estabilizando a interface de dimerização presente nos LBDs. Na figura temos o esquema de arranjos de DNA em que o TR se liga (palíndromo invertido – F2, palíndromo - PAL e repetições diretas –DR4) e os modelos estruturais da ligação dos DBDs aos diferentes arranjos de HREs.

Alguns estudos indicam que o TR, homo- ou heterodimerizado, na ausência de ligantes, recruta correpressores como o NCoR e SMRT. Esses correpressores demonstraram grande habilidade em mediar a repressão basal do TR e RAR em estudos de co-transfecção. Essas moléculas interagem com proteínas que inibem a maquinaria basal, como TFIII, TAFII32 e TAFII70, além de histonas deacetilases (HDACs), as quais mantêm a cromatina em seu estado enovelado, impedindo mecanicamente a transcrição[39].

Os TRs também possuem a capacidade de ativar a transcrição na ausência de T3. Em alguns estudos, o apo-TR foi capaz de ativar de transativação dos TREs para hormônios de

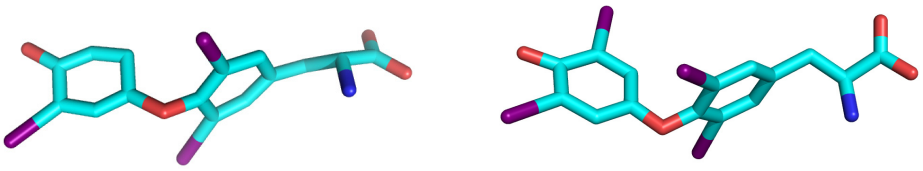
crescimento de rato (rGH) em linhagens de células da glândula pituitária[46]. Além disso, foi demonstrado que os TRs ativam a transcrição de genes negativamente regulados como os que codificam para as subunidades α e β do hormônio estimulador da tireóide (tireotropina – TSH α e β) e o hormônio liberador da tireotropina (TRH), na ausência de ligantes[83, 84, 85]. Esses hormônios são alvos cruciais para o mecanismo fisiológico de retroalimentação negativa do T3 e este permite que o próprio receptor controle os níveis do hormônio T3 no plasma sanguíneo[62]. Em geral, tem-se observado que genes que são reprimidos pelos hormônios tireoidianos são ativados pelo *apo*-TR. De maneira surpreendente verificou-se que correpressores (NCoR e SMRT) estão envolvidos na indução da expressão das proteínas TSHα, TSHβ, e TRH, via TRs sem ligante. A presença do ligante inibiu a expressão destes genes, possivelmente via dissociação dos correpressores[86].

A presença do ligante T3 induz modificações conformacionais na H-12 do TR, a qual passa a adotar uma posição agonista, dissociando o TR do complexo formado pelos correpressores. Após a ligação ao ligante, o TR recruta complexos de proteínas coativadoras como o p160/SRC-1, TIFII/GRIP-1/SRC-2, as quais interagem com outras proteínas adaptadoras para o encaixe da maquinaria basal, como o complexo formado por CBP/p300. Nesse caso, a proteína CBP possui atividade histona acetilase, a qual contribui para o relaxamento da cromatina, permitindo que o TR efetue a ativação transcricional de determinados genes[87, 88]. Posteriormente, foi descoberto outro complexo de coativadores formados por proteínas de interação com o receptor de vitamina D e proteínas associadas ao TR (DRIPs/TRAP complex), bastante semelhantes ao complexo descrito anteriormente[89]. Os estudos deste novo complexo sugeriram que o TR pode recrutar o complexo DRIP/TRAP para a estabilização da holoenzima RNA polimerase II através de suas subunidades externas, porém, DRIP/TRAP não apresentaram atividade histona acetilase[87, 88, 89]. Essas informações levaram à construção de um modelo de ativação dos receptores nucleares, no qual dois diferentes complexos de coativadores são recrutados. Primeiramente o complexo p160/SRC-1

é responsável pela iniciação da transcrição, recrutando cofatores com atividade histona acetilase e, após o relaxamento da cromatina, o complexo DRIP/TRAP se liga aos RNs, recrutando a holoenzima RNA polimerase II, para ativar a transcrição[88, 89].

2.4. Os Hormônios metabólicos do TR

A glândula tireóide é uma das maiores glândulas endócrinas do organismo e secreta dois hormônios importantes: a tiroxina (3,5,3',5'-tetraiodo-L-tironina – T4) e a triiodotironina (3,5,3',-triiodo-L-tironina – T3) (**Fig. 10**). Esses têm efeito profundo no aumento do metabolismo basal[90]. Cerca de 90% dos hormônios metabolicamente ativos secretados pela tireóide consiste em T4, sendo somente 10% representado pelo T3, a concentração de T4 presente no soro sanguíneo é 45 vezes maior que a de T3[91] (90nM *vs* 2nM).



3,5,3',-triiodo-L-tironina – T3 3,5,3',5'-tetraiodo-L-tironina – T4

Figura 10 – Estruturas dos principais hormônios tireoidianos T3 e T4.

Entretanto, quase toda a tiroxina é convertida em triiodotironina nos tecidos, portanto, ambos são metabolicamente funcionais. Essa conversão do T4 em T3 ocorre pela ação de deiodinases, presente nos tecidos periféricos[92]. As funções entre eles diferem na rapidez e na intensidade da ação. O T3 é cerca de 5 a 10 vezes mais potente que o T4. Como exemplo, o K_d determinado para a isoforma TRα de galinha varia entre 0.21-0,33nM para T3 e 1,4nM para T4. Para TRβ, estes valores são 2,3nM para T3 e 50nM para T4 [39].

A primeira etapa na formação dos hormônios tireoidianos consiste no transporte dos íons iodeto do sangue para as células glandulares e os folículos da tireóide. Esse seqüestro de íons ocorre pela bomba de iodeto, presente nas membranas basais das células tireoidianas. A intensidade desse seqüestro é estimulada pelo TSH. Após a captação dos iodetos, eles são oxidados pela enzima peroxidase, na membrana apical da célula, fornecendo iodo oxidado para a região celular onde a tireoglobulina emerge do aparelho de Golgi [39, 90] (**Fig. 11**).

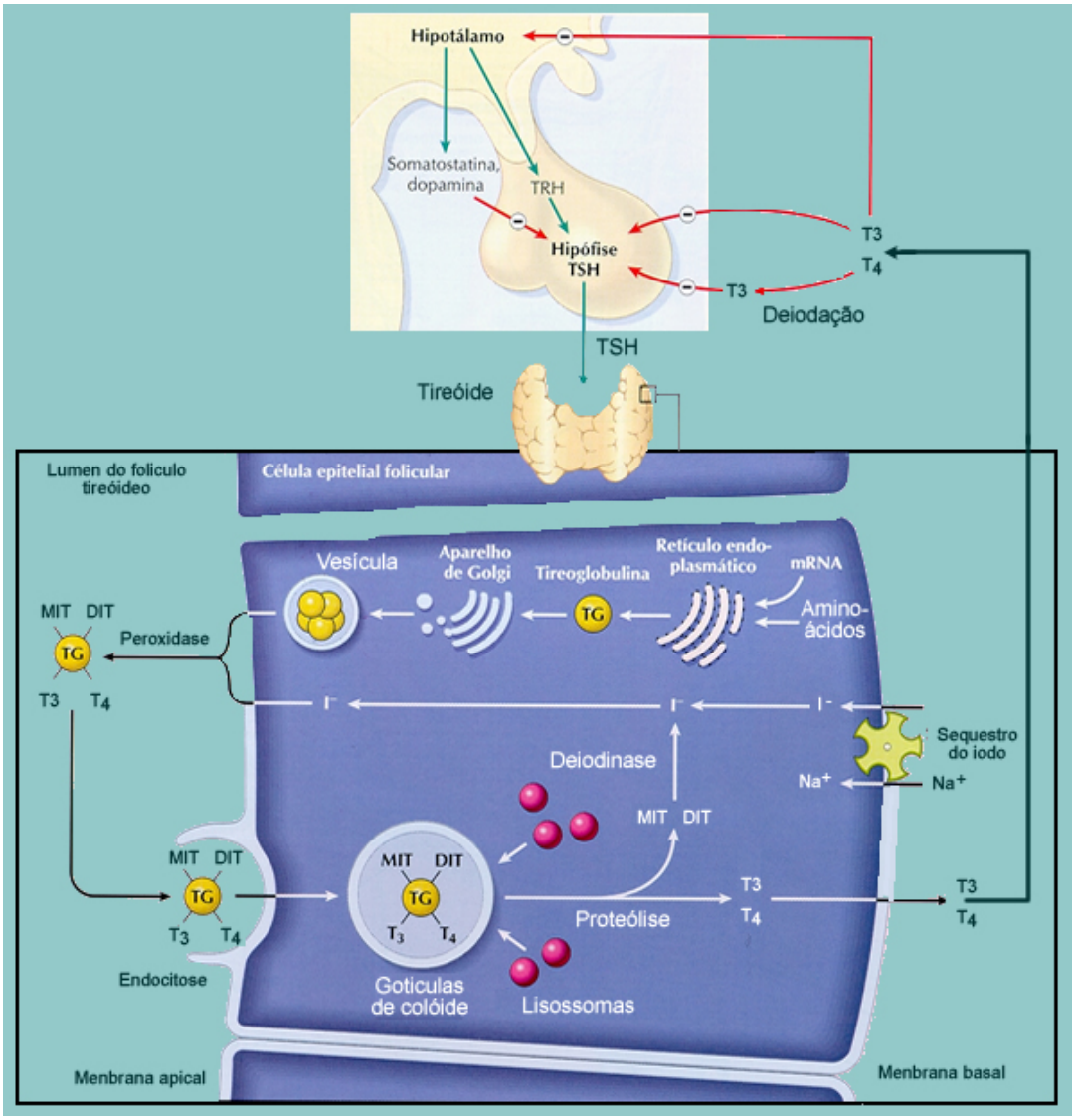
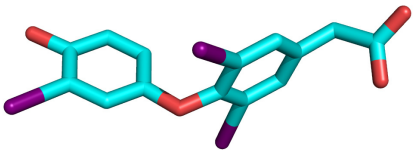


Figura 11 - Mecanismos de produção dos hormônios tireoidianos. A parte superior da figura representa a regulação hormonal que controla a produção de T3 e T4, abaixo tem-se o detalhe de uma célula tireoidiana, explicando como ocorre a síntese hormonal (figura retirada de www.endonutri.med.br, acesso feveveiro 2008).

A ligação do iodo à molécula de tireoglobulina (chamada de organificação da tireoglobulina) é lenta. A iodetação da tirosina pode ocorrer de duas formas, uma delas é quando essa recebe apenas um iodo, formando a monoiodotirosina; a outra é quando há o acoplamento de dois iodos na molécula de tirosina, formando a diiodotirosina. Quando uma molécula de diiodotirosina liga-se a uma de monoiodotirosina, ocorre a formação da triiodotironina, já a ligação de duas diiodotirosinas forma a tiroxina[89, 90, 93]. Após a formação desses hormônios, os mesmos são estocados na glândula tireóide e lançados lentamente na circulação sanguínea, onde se acoplam a proteínas plasmáticas para serem transportados até as

células-alvo. Essas proteínas são, principalmente, a globulina de ligação a tiroxina, a pré-albumina e a albumina de ligação a tiroxina, todas elas sintetizadas no fígado[39, 90, 93].

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'-diiodotironina[94]. Entretanto, 10% do metabolismo de T3 envolve a alteração da cadeia lateral de tirosina, resultando na produção de 3,3',5–ácido triiodotiroacético (Triac – **Fig. 12**). Sob condições patológicas, como, por exemplo, jejum, a produção de Triac é aumentada substancialmente. Além disto, o Triac pode ser importante para supressão da secreção de TSH durante situação de jejum, o que acontece apesar dos baixos níveis plasmáticos de T3 e T4. Além disto, em condições diferentes de jejum, caracterizadas por baixos níveis de TSH, T3 e T4, o Triac pode estar relacionado com a supressão da secreção de TSH[95].



3,3',5 - ácido triiodotiroacético – Triac

Figura 12 – Estrutura do ligante Triac.

Alguns estudos têm demonstrado uma maior eficiência do Triac em relação a T3 e T4 na supressão da secreção de THS em cultura de células da pituitária[96]. A administração de Triac em pessoas com eutiroidismo e hipotiroidismo (conseqüências da Resistência Generalizada a Hormônios Tireoidianos – GRTH) suprime a secreção basal de TSH[97, 98, 99].

Outra característica observada para o Triac é que este se liga aos receptores do hormônio tireoidiano com maior afinidade que o T3, mas apresenta um tempo de permanência muito curto nos receptores e uma pequena meia vida plasmática. Este composto tem sido empregado empiricamente no tratamento da Síndrome de Resistência ao Hormônio Tireoidiano (RTH). O Triac tem se revelado mais potente que o T3 na ação da regulação transcricional dos receptores TRβ1 e TRβ2 sobre os elementos responsivos palindrômicos e palindrômicos invertidos, enquanto que a regulação por TRα1 é equivalente para ambos ligantes[97].

2.5. Fisiologia e importância médica do T3

O potencial farmacológico dos receptores nucleares consiste, em parte, na habilidade de derivados sintéticos ou naturais em reproduzirem ou inibirem a atividade dos hormônios naturais. De fato, agonistas e antagonistas sintéticos de muitos receptores nucleares são constantemente usados no combate ao câncer, diabete do tipo II, hipertensão, osteoporose, reposição hormonal e em fármacos imunossupressivos ou antiinflamatórios[39, 42]. Estima-se que cada oito dos 100 fármacos mais prescritos nos Estados Unidos em 2002, tinham como alvo os receptores nucleares e geraram uma receita anual acima de US$ 9 bilhões (American Thyroid Association). Atualmente, calcula-se que 20% das prescrições farmacêuticas nos Estados Unidos sejam para ligantes de RNs ou para agonistas e antagonistas seletivos desses receptores[72].

As anomalias funcionais da glândula tireóide são freqüentes, acometendo aproximadamente 5 % da população geral, com forte predomínio entre as mulheres. Calcula-se que, atualmente, mais de 200 milhões de pessoas sofrem com alguma forma de doença da tireóide (dados da OMS).

A presença do T3 ligado ao TR ativa o processo de transcrição e faz com que sejam sintetizadas um grande número de enzimas, proteínas estruturais e transportadoras, além de outras substâncias, aumentado à atividade funcional do organismo[90]. Como conseqüência da ativação da expressão de diversos genes, os receptores tireoidianos promovem o aumento da atividade metabólica celular, de maneira que o metabolismo basal pode variar entre de 60 a 100% acima do normal quando há secreção desses hormônios. Com isso, a velocidade de utilização de moléculas para obtenção de energia é aumentada, assim como processos relacionados ao anabolismo e ao catabolismo[93].

Além das funções supracitadas, os hormônios tireoidianos possuem papéis importantes em mecanismos corporais específicos. Um deles é a estimulação do metabolismo de carboidratos, incluindo a rápida captação de glicose pelas células, aumento de glicogenólise e

da gliconeogênese, além do aumento na absorção realizada pelo trato intestinal e na secreção de insulina. Os TH também estimulam o metabolismo de gorduras, com mobilização dos lipídeos, diminuindo suas reservas, aumentando a concentração de ácidos graxos livres no plasma e acentuando a oxidação dos mesmos. Outra forma de atuação ocorre com a diminuição das concentrações plasmáticas do colesterol, fosfolipídeos e triglicerídeos, pois aumenta a secreção dessas moléculas na bile, com a conseqüente perda das mesmas pelas fezes; além de induzirem o aumento de receptores de lipoproteínas de baixa densidade nas células hepáticas[43].

O T3 e T4 aumentam a atividade de muitas enzimas induzindo ao aumento da necessidade de vitaminas que atuam como cofatores enzimáticos[82, 93]. Por fim, esses hormônios também representam papéis importantes sobre o sistema cardiovascular. Eles proporcionam o aumento do fluxo sanguíneo, devido ao aumento do metabolismo; e o aumento na freqüência e força cardíaca. Além disso, atuam sobre outros sistemas, aumentado a taxa de respiração, a motilidade gastrointestinal e a excitabilidade sobre o sistema nervoso central[43, 91].

Existem várias patologias associadas a disturbios causados pelos hormônios tireoidianos, entre elas podemos citar a resistência ao hormônio tireoidiano (RTH), a doença de Grave, a síndrome de Hashimoto, o cretinismo, o hipertireoidismo e o hipotireoidismo, uma das causas da obesidade (anomalia que, atualmente, vem sendo considerada um estado patológico). Em excesso, quadro típico do hipertireoidismo, os hormônios tireoidianos podem causar perda de peso, taquicardia, arritmias atriais e ataques cardíacos[48], além de perda de massa óssea e de tornar o balanço de cálcio no organismo negativo[97]. No hipotireoidismo, estes hormônios causam retardamento no crescimento, baixo débito cardíaco, acúmulo de tecido adiposo, aumento do colesterol, além de retardamento mental - caso típico de hipotireoidismo neonatal[43, 89]. Outras respostas fisiológicas são a redução dos níveis de colesterol plasmático, interferência na lipogênese e perda muscular, entre outras[42].

Embora muitos ligantes naturais dos receptores nucleares possuam propriedades farmacológicas interessantes, o uso destes na prática médica está restrito, pois os mesmos elucidam uma mistura de ações e efeitos benéficos e deletérios. Estudos demonstram que os efeitos deletérios da ação do TH se dão, principalmente, através de ativação da isoforma α do receptor TR (TRα), que é predominantemente expressa no tecido cardíaco, enquanto os efeitos benéficos do TH são mediados pela isoforma β do receptor (TRβ), que encontra-se expressa no fígado[42, 43] .

A possibilidade de mapear as diferenças estruturais no modo de ligação dos ligantes às isoformas do TR traz a promessa de desenvolvimento de ligantes isoforma-específicos que poderiam ativar seletivamente uma das isoformas do receptor de maneira independente. Isso poderia diminuir de maneira significativa os efeitos colaterais causados por administração de compostos que ativam os receptores nucleares de maneira não-seletiva.

Apesar de muito ter sido feito no desenvolvimento de fármacos que atuam nos receptores nucleares, muito mais compostos químicos com potencial terapêutico ainda podem e devem ser desenvolvidos, tornando ainda mais necessárias pesquisas que procurem novos ligantes que possam funcionar como agonistas e/ou antagonistas dos receptores nucleares. A procura por fármacos naturais, como os fitoterápicos, tem sido uma alternativa bastante usada, principalmente no Brasil, onde a diversidade de espécies que podem ser estudadas para se buscar princípios ativos é enorme.

Capítulo 2 – Objetivos e Justificativa do Trabalho

Este trabalho visa os estudos biofísicos, bioquímicos e estruturais dos receptores de hormônios tireoidianos (TR), na busca de um melhor entendimento sobre os mecanismos de funcionamento dessas moléculas. Os objetivos específicos dessa tese foram:

(1) Estudos de oligomerização do receptor.

Utilizando diferentes construções do receptor, a primeira contendo o domínio de ligação ao ligante e o domínio de ligação ao DNA; outra com o domínio de ligação ao ligante

e o *hinge*; e somente o domínio de ligação ao ligante, permititindo avaliar a participação de cada domínio no processo de formação dos oligômeros e ainda a influência do ligante sobre o processo. As principais técnicas aplicadas foram a cromatografia por gel filtração, a eletroforese por gel não desnaturante, o *crosslinking* químico e o espalhamento dinâmico de luz (DLS); além dessas técnicas, o espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS) também auxiliou nesses estudos.

(2) Estudos estruturais em solução através do espalhamento de raios-X a baixos ângulos

Baseando-se principalmente na técnica de SAXS. Devido à ausência de estruturas cristalográficas de construções mais completas do receptor, aliada à dificuldade de cristalizá-las, essa técnica permitiu inferir sobre as disposições de cada um dos domínios do receptor, além de resultar no primeiro envelope molecular do receptor completo em solução. Para esses estudos foram empregadas construções diversas do TR em ambas as isoformas, na tentativa de evidenciar o envelope de cada domínio e do receptor completo. Além disso, foram avaliados os efeitos da adição do hormônio e de elementos responsivos de DNA sobre o receptor.

(3) Estudos da afinidade do receptor a diversos elementos responsivos de DNA.

Executados na tentativa de se estabelecer valores de constantes de afinidade entre diferentes construções do TR e os principais elementos responsivos de DNA (HREs), preferenciais para os receptores dos hormônios tireoidianos e de ácido 9-*cis*-retinóico. Empregando técnicas de anisotropia de fluorescência, foi possível avaliar as preferências de ligação do TR aos diversos HREs e a influência de cada domínio no processo de ligação receptor-DNA. Além disso, também foi verificada a influência do íon magnésio no processo de ligação e especificidade do TR aos diferentes HREs.

(4) Estudos da dinâmica da ligação do ligante ao domínio de ligação ao hormônio.

Esses estudos permitiram inferir sobre pequenas mudanças estruturais no receptor antes e após a adição do ligante. Para tanto, utilizou-se a técnica de troca de hidrogênio por deutério, monitorada pela espectrometria de massas. Com base nesses estudos e com a utilização da estrutura cristalográfica do domínio de ligação ao hormônio do receptor foi possível um melhor entendimento das modificações conformacionais do receptor antes e após a adição do ligante.

Esses estudos são de extrema importância para o melhor entendimento dos receptores nucleares, em particular do receptor dos hormônios tireoidianos. Com esse trabalho foi possível avançar no entendimento do funcionamento deste receptor, aliado à participação de cada um de seus domínios. O entendimento profundo sobre as bases moleculares da função dos receptores de hormônios tireoidianos podem acarretar em melhores estratégias na tentativa de combate ou controle das diversas anomalias resultantes do mau funcionamento desta proteína, o que seria de grande utilidade no combate às inúmeras patologias associadas a este receptor.

Capítulo 3 – Metodologias Utilizadas

As principais técnicas e construções da proteína utilizadas nesse trabalho serão brevemente descritas. Além da expressão e purificação da proteína, também estão descritas nesse capítulo como foram efetuadas todas as técnicas utilizadas nos estudos de oligomerização (gel filtração, gel nativo, DLS e *crosslinking*), nos estudos de SAXS, fluorescência e espectrometria de massas.

3.1. Informações sobre os clones, proteínas utilizadas e construções.

As construções da proteína utilizadas nessa tese foram obtidas no Laboratório de Cristalografia de Proteínas do Instituto de Física de São Carlos. Nesses experimentos foram utilizadas principalmente duas isoformas do TR humano, α1 e β1, em diferentes construções (**Fig. 13**).

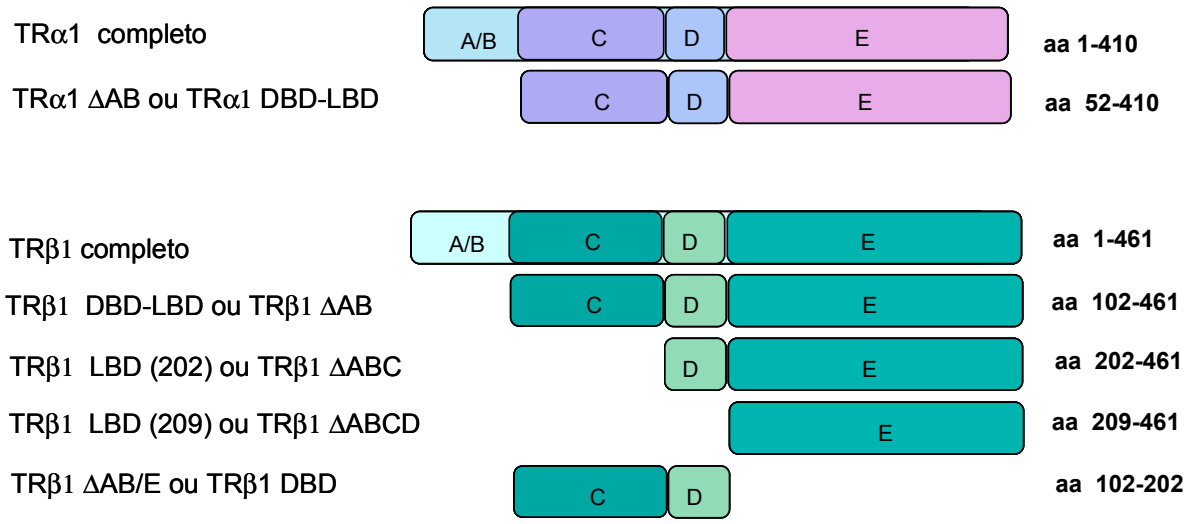


Figura 13 – Esquema contendo as principais construções de TR α1 e β1 utilizadas nesse trabalho nos próximos capítulos, com a numeração do aminoácido (aa) inicial e final de cada construção. A, B, C, D e E são os domínios pertencentes a cada construção.

Nos estudos realizados com o TRβ1, foram utilizadas as construções contendo os domínios DBD-LBD, LBD com e sem *hinge* (os quais se iniciam nos aminoácidos E202 e E209, respectivamente) e DBD. Também se tentou expressar e purificar a construção completa, porém a proteína apresenta-se bastante instável e em pouca quantidade, o que inviabilizou os estudos utilizando esta construção. Todos os clones do TRβ1 citados estão inseridos no vetor de expressão pET-28a(+), com exceção do TRβ1 ΔABCD (TRβ1 LBD 209) o qual está inserido no plasmídeo pETDuet. Esses vetores contêm uma fusão com cauda de histidina na janela aberta de leitura dos clones e resistência aos antibióticos kanamicina e ampicilina (pET-28a(+) e pETDuet).

As construções estudadas do TR α1 continham todos os domínios (TRα1 completo) e o DBD-LBD. A construção contendo a proteína completa foi inserida no vetor de expressão

pET-28a(+), enquanto a construção DBD-LBD está inserida no vetor pSMT3, um pET-28a(+) modificado que, além da cauda de histidina, contém uma fusão a mais com a proteína ULP1, a qual possui alta solubilidade.

3.2. Transformação em *Escherichia coli* BL21(DE_3) e DH5α

Os vetores contendo os genes de cada construção foram primeiramente transformados em células de *Eschirichia coli*, linhagem DH5α, para propagação de plasmídeos. As células transformadas foram utilizadas para o crescimento de uma pequena cultura (10 mL), a qual foi utilizada para a purificação dos plasmídeos através da mini preparação plasmidial. Os plasmídeos purificados foram então transformados em células de *E. coli* em uma linhagem específica para a expressão de proteínas BL21(DE_3). Esses passos foram realizados seguindo-se protocolos muito bem estabelecidos e detalhados na literatura[100].

3.3. Expressão de proteínas.

Os procedimentos empregados foram adaptados de protocolo fornecido pelos colaboradores da Universidade da Califórnia, São Francisco, EUA. Os ensaios de indução para o hTR foram feitos de acordo com protocolos pré-estabelecidos por esse mesmo grupo, procurando-se uma condição ideal para cada construção e isoforma utilizada.

Para a expressão em larga escala, inoculou-se os meios 2x-Luria Bertani (meio LB concentrado 2x – 2% peptona, 1%extrato de levedura e 1%NaCl) ou 2xYT (1,6%triptona, 1%extrato de levedura e 0,5% NaCl) contendo 50 µg/mL de kanamicina, ou ampicilina, empregados para a expressão da proteína com pré-cultura crescida por 18 horas, a 37°C, no volume determinado pela divisão: 2/Abs_{600} pré-cultura. A cultura foi crescida a 22°C até que a DO_{600} atingisse valores entre 1,2 e 1,6. Depois de atingida esta DO, induziu-se a expressão da proteína com 0,5-1,0 mM de IPTG (Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo) e manteve-se a indução das bactérias por 4 a 6 horas, na mesma temperatura do crescimento da cultura. Posteriormente, as bactérias foram sedimentadas por centrifugação a 6.000 rpm (Sorvall-GS3) por 10 minutos, a 4 ^{o}C. Os sedimentos foram congelados rapidamente em nitrogênio líquido,

ou usados em seqüência para o preparo do extrato protéico. Os detalhes da expressão de cada construção e isoforma estão representados na Tabela 1.

Tabela 1- Detalhes da expressão de todas as isoformas e construções utilizadas.

Construção/ Proteína	Meio de cultura	Vetor/ antibiótico de resistência	Temperatura de crescimento da cultura e indução	DO_{600nm} e tempo de indução	[IPTG] para indução	Aditivos usados na indução
TRα1 completo	2XYT	pET-28a(+) Kanamicina	22 °C	1,2-1,5 4 a 6 hs	1 mM	10 mM $ZnSO_4$*
TRα1 DBD-LBD	2XYT	pSMT3 Kanamicina	22 °C	1,2-1,5 4 a 6 hs	1 mM	10 mM $ZnSO_4$*
TRβ1 completo	2XYT	pGEX Ampicilina	22 °C	1,2-1,5 12 a 16 hs	1 mM	10 mM $ZnSO_4$*
TRβ1 DBD-LBD	2XYT	pET-28a(+) Kanamicina	22 °C	1,2-1,5 4 a 6 hs	1 mM	10 mM $ZnSO_4$*
TRβ1 LBD (202)	2xLB	pET-28a(+) Kanamicina	22 °C	1,2-1,5 4 a 6 hs	0,5 mM	-----
TRβ1 LBD (209)	2xLB	pETDuet Ampicilina	22 °C	1,2-1,5 4 a 6 hs	0,5 mM	------

*aditivo utilizado para o fornecimento de zinco, para a formação correta do DBD.

3.4. Preparo do extrato protéico.

Devido ao fato que a proteína é termo-sensível, todos os procedimentos para a produção do extrato protéico foram realizados mantendo-se a soluções e frascos em gelo. Para o preparo dos extratos da proteína TRα1 completa e DBD-LBD e da TRβ1 DBD-LBD, LBD (com e sem *hinge*) e DBD, os sedimentos de bactérias foram ressuspendidos inicialmente em tampão TST (50mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20, 10 mM β-mercaptoetanol), na quantidade 20 mL para cada 6 g de células. O TRβ1 completo foi ressuspendido em tampão PBS (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,8 mM KH_2PO_4, 1 mM DTT).

Após a ressuspensão e homogeneização das células no tampão, foi adicionado à solução 10 mg de lisozima e 1 mM de PMSF. Deixou-se a lisozima agir por 30-60 minutos em gelo, para o rompimento da parede celular. Após esse passo, o extrato foi sonicado 6 vezes

por 30 segundos e depois, centrifugado a 14.000 rpm (Sorvall- SS34) por 1 hora, a 4 ^{o}C. O sobrenadante foi purificado imediatamente ou congelado com N_2 líquido e armazenado a -80 ºC para posterior purificação.

Em alguns casos, para a produção do holo-TR, o ligante foi adicionado ao extrato pronto, em excesso de 10 vezes sobre a concentração protéica estimada para o fim da purificação, e a mistura foi incubada por cerca de 1 hora, com agitação, para posterior purificação. Em outras situações, o ligante foi adicionado após a completa purificação da proteína, em excesso de 3 vezes a concentração protéica.

3.5. Purificação por afinidade - IMAC

Com exceção do TRβ1 completo, todas as proteínas foram expressas em fusão com uma cauda N-terminal contendo 6 histidinas codificadas pelo plasmídeo pET-28(+), pSMT3 e pETDuet. A presença desta cauda confere à proteína uma alta afinidade para ligação em resinas de cromatografia contendo íons de metal (Cu^{2+}, N^{2+}, Ni^{2+}, Fe^{3+}) quelados, sendo esta técnica conhecida como IMAC (cromatografia por afinidade a um íon-metal imobilizado). Portanto, no primeiro passo de purificação empregado foi utilizada 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 imobilizado 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 com 1 mL de resina *Talon Gravity Flow* (Clontech) para cada 6g células por 1 hora com agitação, a 4°C. A resina foi pré-equilibrada com tampão AA (contendo 50 mM Fosfato Sódio pH7,8, 200 mM NaCl, 10% Glicerol, 10 mM imidazol). Após a incubação, a mistura contendo extrato e resina foi centrifugada a 500 rpm (centrífuga Eppendorf 5810R rotor A-4-62), por 4 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi aspirado e posteriormente, descartado. As lavagens foram efetuadas acrescentando-se 40 mL de tampão AA, acrescido de 5 mM β-mercaptoetanol, para cada mL de resina utilizada. A resina foi vagarosamente ressuspendida no tampão e centrifugada a 500 rpm, por 4 minutos, a 4 ^{o}C. Este

procedimento de lavagem foi executado por três vezes, para que impurezas, com ligações inespecíficas à coluna, fossem eliminadas. Após a lavagem, a resina foi transferida para coluna de plástico Poly-Prep (Bio-Rad) e deixou-se eluir o restante do tampão de lavagem. A eluição se deu pela passagem de 2 mL de tampão AB (contendo 50 mM Fosfato Sódio pH 7,8, 200 mM NaCL, 10%Glicerol, 300 mM Imidazol) para cada mL de resina, por 3 vezes.

As amostras obtidas foram analisadas em SDS-PAGE (concentração de poliacrilamida de 10 a 15%, dependendo do tamanho da proteína purificada). As bandas de proteínas foram visualizadas através de coloração com *Coomassie brilliant blue* (0,25% de *Coomassie brilliant blue* R-250- Bio-Rad, 90% de etanol absoluto e 10% de ácido acético glacial).

3.6. Purificação por interação hidrofóbica

Após coluna de afinidade, a proteína foi submetida a uma coluna de interação hidrofóbica, Phenyl 5PW 8/7 (TOSOHAAS) para aumentar o grau de pureza, empregando-se o equipamento Akta Purifier (Amersham-GE). Esse tipo de purificação foi utilizado em apenas alguns casos. Essa coluna possui capacidade de separar o TR com e sem ligante, sendo utilizada principalmente para garantir que a amostra purificada estivesse homogênea.

As frações aplicadas foram acrescidas de sulfato de amônia para condutividade próxima do tampão inicial HicA (20 mM Hepes pH 8,0, 600 mM $NH_4(SO_4)_2$, 1 mM DTT) e aplicadas na coluna em fluxo de 0,75 mL/min. Após isto lavou-se a resina com tampão inicial por 10 minutos, fluxo 0,75 mL/min. A eluição se deu em um gradiente de tampões, aumentando-se de 0-100% a quantidade de tampão HicB (20mM Hepes pH 8,0, 1mM DTT, 20% glicerol e 10% acetonitrila), mantendo-se o mesmo fluxo, por 60 min.

As amostras obtidas foram analisadas em SDS-PAGE (concentração de poliacrilamida de 10 a 15 %) e coradas com *Coomassie Blue.* A quantificação foi feita utilizando-se o método colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976) via o kit Bio-Rad Protein Assay, segundo especificações do fabricante. Quando necessário, as proteínas foram concentradas através de

centrifugação a 1500 g, 4°C, pelo tempo necessário, utilizando-se do concentrador Amicon Ultra 10MWCO, 15 mL(Millipore).

3.7. Purificação por Gel Filtração

Este passo de purificação foi realizado para garantir um maior grau de pureza às proteínas purificadas por afinidade ou pela coluna de fenil. Para tanto, foram utilizadas, dependendo do tamanho e estado de oligomerização das proteínas purificadas, as colunas Superdex 75 HL 26/60 ou Superdex 200 HL 16/60 (Amersham-GE), utilizando-se o equipamento Akta Purifier (Amersham-GE). A coluna foi pré-equilibrada com tampão contendo 20 mM Hepes pH 8,0, 50 a 200 mM NaCl, 5% glicerol e 2 mM DTT. As amostras de proteína foram aplicadas na coluna e realizou-se uma eluição isocrática utilizando-se um volume e meio de coluna e fluxo de 2 mL/min, Todos os passos foram realizados utilizando-se as soluções em gelo e as colunas em banho térmico a 4C.

Para se estimar o volume de eluição de cada proteína, a coluna foi previamente calibrada com os kits de calibração de coluna de gel filtração para alto e baixo peso molecular (Amersham-Bioscience). Através dessa calibração foi possível prever a localização de cada pico de eluição das proteínas e calcular seus raios hidrodinâmicos.

3.8. Clivagem da cauda de histidina

Todas as fusões utilizadas nas construções do TR possuem sítio para clivagem com trombina protease, exceto o TRα DBD-LBD, que contém fusão com a proteína SUMO e sítio de clivagem para a protease ULP1. As clivagens das fusões foram feitas usando-se a proporção de 1 unidade de trombina protease (Amersham-GE), diluída em PBS (1U/µL), para cada 100 ug de proteína purificada. Vários ensaios de clivagem testando-se quantidade de enzima (1U/µg proteína), temperatura (10 e 18°C) e tempo de clivagem (1 a 20h) foram efetuados. A concentração de proteína ótima, utilizada no processo de clivagem foi cerca de 1 mg/mL e o tempo de clivagem variou de 3 a 8 horas, dependendo da construção. Somente as

construções dos TR β1 LBD (202 e 209), não puderam ser clivados, pois estes contêm sítios de clivagem de trombina expostos em sua estrutura e, com isso, ocorre também a clivagem da proteína, além da cauda.

Como, em alguns casos, não foi possível a visualização das diferenças nas alturas das bandas da proteína clivada e não clivada em SDS-PAGE, optou-se pelo gel nativo, o qual separa as proteínas de acordo com seus tamanhos e cargas, e pelo *imunoblotting*, que consiste na marcação da cauda de histidina através de anticorpos específicos, além disso, o gel de tricina também apresentou uma resolução adequada das bandas, pois este contém uma maior concentração de poliacrimalida, o que conferemaior resolução ao gel.

3.9. *Imunoblotting*

Para confirmar se a clivagem da cauda foi total ou parcial, e para a determinação do tempo exato de clivagem fez-se um imunoblotting com anticorpos específicos para o reconhecimento da cauda de histidina.

Após o ensaio de clivagem da cauda, realizou-se uma eletroforese nativa utilizando-se o sistema *Phast* (Amersham-GE). O gel foi colocado sob uma membrana de transferência, a qual foi deixada 5 minutos em 25 mM Tris, 192 mM glicina e 20% metanol. A transferência das proteínas do gel para a membrana foi realizada em aproximadamente 4 horas. Após a transferência, a membrana foi corada com Pounceau por 10 minutos para a confirmação da transferência. Depois a membrana foi lavada com 0,1% ácido acético; em seguida foi incubada por 1h30 em solução com de TBS com 5% de leite desnatado em pó em TBS (10 mM Tris pH 8,0, 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl), lavada 4 vezes em TBS-Tween (0,05% Tween 20 em TBS) e incubada 1 hora com anticorpo anti-cauda de histidina (0,1% em TBS). Após a incubação a membrana foi novamente lavada em TBS (4 vezes de 5 minutos) e colocada na solução reveladora (Bio Rad), preparada segundo especificações do fabricante, até que as bandas aparecessem. A reação foi terminada com água destilada e a membrana foi seca em papel de filtro.

3.10. Clivagem da SUMO

Vários ensaios foram feitos para a clivagem da sumo com a protease ULP1, a qual é expressa e purificada em nosso laboratório. Após a expressão e purificação do TR com SUMO, iniciamos ensaios de clivagem da proteína sumo e cauda de histidina com a protease ULP1. Utilizamos uma proporção de 0,1 mg de ULP1 para 1 mg de TR. A mistura de proteínas foi incubada a 4°C com agitação por 6 horas, a cada hora uma amostra foi separada, e a ela foi adicionada 0,1μM de PMSF para a inibição da protease. O monitoramento da clivagem se deu por eletroforese, através das amostras que obtivemos a cada hora do período de clivagem.

A separação do TR, da protease e da SUMO se deu por mais uma coluna de afinidade, na qual o TR passa pela coluna sem sofrer interações, em tampão de gel filtração, a ULP1 e SUMO interagem com a coluna pela cauda de histidina. A eluição da protease ULP1 e da sumo se dá após a passagem pela coluna de tampão com 250 mM de imidazol.

3.11. Estudos de oligomerização

Estes experimentos foram realizados para análise do estado de oligomerização do holo e apo hTRβ1 DBD-LBD, LBD 202 e LBD 209, recém purificados. As concentrações de proteína usadas nos experimentos de gel nativo, gel filtração e DLS foram: 1, 3, 5, 7 e 10 mg/mL; no *crosslinking* a concentração protéica foi de 0,6mg/mL, aproximadamente.

3.11.1. Gel filtração analítica

Através da técnica de gel filtração, moléculas em solução são separadas de acordo com diferenças em seus tamanhos enquanto migram pela matriz. Essa metodologia foi utilizada para a availação das formas oligoméricas do receptor TRβ em solução.

O método de filtração em gel, baseado no efeito de filtro ou peneira molecular, tem sido usado para a separação de substâncias de acordo com o tamanho e forma moleculares. Estes filtros são redes porosas tridimensionais, constituídas por cadeias lineares de polímeros que se entrecruzam e formam a matriz do gel. As partículas que formam o gel possuem poros

de tamanho característico, dependendo das características da matriz do gel. As moléculas penetram na rede formada pela matriz dependendo de seu tamanho e forma molecular. Moléculas pequenas tendem a penetrar nos poros formados pelo gel, enquanto moléculas grandes tendem a não penetrar no gel e passar direto pela matriz. Desta forma moléculas muito grandes (fora do limite de separação da resina) sairão no volume equivalente ao volume morto da coluna (líquido intersticial) e as demais serão separados segundo sua capacidade de ficarem retidas nos poros.

As colunas utilizadas nesses experimentos foram previamente calibradas com os kits de calibração contendo proteínas de massas moleculares variadas (Amersham-GE). Desta forma aplicou-se o conjunto de proteínas de baixa massa molecular contendo Ribonuclease A, Quimiotripsinogênio A, Ovalbumina e Albumina, e um conjunto de alta de massa molecular contendo Aldolase, Catalase, Ferritina e Tiroglobulina (valores de raios hidrodinâmicos: Ferritina – 6,1 nm, Catalase – 5,22 nm, Aldolase – 4,81 nm, Albumina – 3,55 nm, Ovoalbumina – 3,05 nm, Quimotripsinogenio – 2,09 nm e Ribonuclease – 1,64 nm). O volume morto (Vo) da coluna foi determinado através da aplicação do corante *Blue Dextran* pela coluna. Todos os passos foram realizados seguindo-se as indicações (fluxo, concentração de amostra, etc) do fabricante. Através dos volumes de eluição de cada protreína (Ve), foi possível calcular os valores de Kav, os quais estão relacionados aos perfis de migração de cada molécula, segundo a equação:

$$Kav = \frac{Ve - Vo}{Vt - Vo}$$, onde Vt é o volume total da coluna.

Os valores obtidos para os Kavs foram graficados como $\sqrt{-\log(kav)}$ contra o logarítimo dos raios hidrodinâmico (Rh) das proteínas correspondentes, dado o fato que as determinações da massa molecular não apresentam boa correlação na curva de calibração para proteínas não globulares. A equação de reta, obtida através da regressão linear, foi então utilizada para o cálculo do peso ou raio hidrodinâmico das proteínas em estudo[101].

Para avaliar as formas oligoméricas presentes nas soluções de apo e holo TRβ1DBD-LBD e LBD, o receptor foi aplicado na coluna e os valores de $\sqrt{-\log(kav)}$ foram calculados para cada pico de eluição, com isso foi possível obter, através da equação de reta gerada pela calibração da coluna, o raio hidrodinâmico de cada uma das formas do TR.

Para os estudos de oligomerização do TRβ1 DBD-LBD e LBD, nas formas apo e holo, foram empregadas a coluna de gel filtração Superdex 75 HR 10/30 (Amersham-GE), Superdex 200 HR 10/30. As colunas foram pré-equilibradas com o tampão contendo 20 mM Hepes-Na pH 8,0, 1 mM DTT, 200 e 400 mM NaCl; a purificação se deu em taxa de fluxo de 0,5 mL/min e a quantidade de amostra aplicada na coluna foi de 0,25 mL. Todas as purificações foram realizadas mantendo-se os tampões, coluna e o coletor de amostra resfriados a 4°C.

3.11.2. Eletroforese por gel não desnaturante (gel nativo)

O gel não desnaturante, também chamado gel nativo, é uma técnica de separação para análise de proteínas que se baseia em três propriedades para a separação: diferenças de cargas, peso molecular (tamanho) e conformação. Este experimento foi efetuado para a verificação visual de possíveis monômeros, homodímeros e homotetrâmeros do TR que se formaram na presença e ausência do ligante em uma concentração de 1mg/mL (~25 μM), a 4°C.

Para os experimentos de oligomerização foram usados géis nativos do sistema *Phast System* (Amersham-GE) de gradiente, com a concentração de poliacrilamida variando em um gradiente de 8 a 25%. As proteínas foram submetidas à eletroforese, em sua forma nativa, após a gel filtração e clivagem da cauda de histidina. A concentração protéica utilizada foi de 1mg/mL do apo- e holo-TR.

Juntamente às amostras, um padrão de proteínas de conhecido peso molecular foi submetido à eletroforese (kit de calibração de eletroforese GE-Amersham – alto peso molecular). Os géis foram corados com *Coomassie blue*. Os fatores de retardação (Rf) foram

graficados como 100log(100x Rf) *versus* raio hidrodinâmico (Rh) na forma de um gráfico de Ferguson, a equação linear obtida foi então usada para calcular o Rh das bandas do TR[102].

A eletroforese por gel não-desnaturante também foi utilizada para o monitoramento das condições de todas as proteínas, nesse caso foram avaliadas propriedades como agregação, oligomerização, modificações após a adição de ligantes e ligação ao DNA. Esse monitoramento foi realizado como uma pré-análise das proteínas antes de outros experimentos, principalmente para se checar a monodispersividade das amostras submetidas a experimentos de espalhamento de raios-X a baixos ângulos.

3.11.3. Estudo do estado de oligomerização do TR através de *Dinamic Light Scattering* (DLS)

A Espectroscopia de fotocorrelação (PCS) ou Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) possui relação com a investigação da correlação entre fótons. A técnica de espalhamento de luz dinâmico mede as flutuações de luz espalhada pela amostra. É chamado de dinâmico porque reside no fato de possuir objetos espalhadores (no caso algumas moléculas de proteínas) que estão em movimento, dinamicamente se difundindo através da amostra. O DLS percebe quão rápido os objetos estão se movendo e relaciona este fato com o tamanho da molécula estudada.

A luz, quando interage com a matéria, pode ser absorvida ou espalhada. A dispersão ocorre pela interação dos elétrons com a radiação incidente, a qual induz a conversão desses elétrons em dipolos oscilantes que reemitem a radiação. Com isso os elétrons tornam-se fontes de radiação em movimento Browniano. O movimento Browniano das partículas em solução está relacionado tanto ao coeficiente de difusão das moléculas, quanto a seu tamanho e forma.

A função de autocorrelação é construída usando-se a diferença no número de fótons emitidos dentro dos intervalos de tempo usados pelo equipamento de intensidade e descreve a probabilidade de detectar-se um segundo fóton como uma função do tempo; ela descreve

quando as moléculas espalhadas se moveram mais rápido que a escala de tamanho de um fóton (dada pelo inverso do vetor de espalhamento).

A taxa de decaimento da função de correlação é devida à difusão das partículas ou moléculas em solução. Desta maneira pode-se medir a constante de difusão destes espalhadores à partir da taxa de decaimento da função de autocorrelação. À partir desta constante (coeficiente de difusão translacional, D) pode-se calcular o raio hidrodinâmico através da equação de Stokes-Einstein: $D = kBT / 6\pi\eta RH$, onde kB é a constante de Boltzmann, T a temperatura absoluta em Kelvin, η é a viscosidade do solvente e o RH é o raio hidrodinâmico da partícula dispersante. O raio hidrodinâmico possui este nome pelo fato de que a hidrodinâmica da solução é levada em conta (como a viscosidade do solvente) correspondendo ao tamanho que os espalhadores aparentam ter em função do líquido em volta – partícula mais camada de solvatação.

A inversão de Laplace da função de correlação pode predizer a distribuição de tamanhos dos objetos os quais 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, grandes partículas, eles irão sobrepujar o sinal de espalhamento das partículas menores.

A técnica do DLS foi empregada para estudar o estado de oligomerização em solução do receptor nuclear purificado, além disso, foi usada para o monitoramento de amostras usadas em outros experimentos, como o espalhamento de raios-X a baixos ângulos. Empregou-se o equipamento *DynaPro MS* (Protein Solutions) para monitorar a concentração e mudanças dependentes da presença do ligante, para os estados oligoméricos do receptor. As medidas foram realizadas a 4°C com tempo de aquisição de 2,5 segundos e 30 aquisições por medida. Foram feitas 5 medidas seqüenciais para cada concentração de apo e holo TR DBD-

LBD e LBD. As características do solvente (quantidade de glicerol) foram registradas e descontadas, sendo que nesse trabalho utilizou-se 5% glicerol. Todas as amostras foram centrifugadas 10.000 rpm 10 min. 4°C, ou filtradas, antes de serem medidas. Os raios medidos em cada concentração foram promediados, seus desvios padrões foram calculados e graficados *versus* concentração de proteína, no programa Origin.

Essa técnica também foi utilizada para monitoramento das condições de todas as proteínas, nesse caso foram avaliadas propriedades como agregação, oligomerização, modificações após a adição de ligantes e ligação ao DNA. Esse monitoramento foi realizado como uma pré-análise das proteínas antes de outros experimentos, principalmente para experimentos de espalhamento de raios-X a baixos ângulos.

3.11.4. Crosslinking químico

O *Crosslinking* é uma técnica que permite a visualização de estados oligoméricos em géis SDS desnaturantes, pois transforma interações proteína-proteína em ligações covalentes. 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 intra-moleculares (espaçadores curtos, em geral 5 Å) ou produtos inter-moleculares (espaçadores longos, tipicamente 11 a 16 Å).

Para estes estudos, o reagente de *crosslinking* utilizado foi o reagente homobifuncional DSS (ácido subérico ou N-hidroxisucsinimidil-éster) (DSS- Sigma Aldrich), o mesmo usado para estudos de *crosslinking* com o receptor nuclear RXR[103]. Os grupos reativos deste composto são ésteres de NHS os quais realizam ligações através de aminas primárias.

Nesse experimento, 1 μL do reagente DSS diluído em dimetil sulfóxido (0,05 mM) em 9 μL de apo- e holo- hTRβ1 DBD-LBD e LBD em tampão de gel filtração (concentração final de TR -14 μM). A mistura foi incubada a temperatura ambiente (25°C) por 15 minutos e

a reação foi encerrada com 3 μL de etanolamina a 1 M. As amostras foram submetidas a uma eletroforese em gel SDS PAGE com 10% de acrilamida e as bandas foram visualizadas com *Coomassie briliant blue*. Junto às amostras foi corrido um marcador de alto peso molecular para controle da eletroforese (marcador de peso molecular Bio-Rad *High Range*). Todos os passos foram realizados em temperatura ambiente para que não ocorresse hidrolise do DSS, somente a proteína foi mantida no gelo até que a mistura fosse preparada.

3.12. Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)

O Espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS) é uma ferramenta que nos fornece informações estruturais de flutuações ou heterogeneidades na densidade eletrônica com dimensões características da ordem de 10 a 1000Å.

Em um experimento de SAXS, as ondas eletromagnéticas associadas aos raios X incidentes provocam oscilações dos elétrons dos átomos componentes da amostra 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 de espalhamento de partículas em solução, a amostra é isotrópica, ou seja, as partículas estão em movimento browniano e podem assumir todas as orientações possíveis em relação ao feixe incidente. Assim, temos acesso experimental somente a média esférica para as orientações da macromolécula[104].

Um parâmetro estrutural interessante utilizado na análise de mudanças conformacionais de macromoléculas em solução é o raio de giro (*Rg*). O *Rg* 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 *Rg* pode ser obtido a partir da porção da curva de espalhamento a muito baixos *q's* (relacionado ao ângulo de espalhamento), para a

qual é válida a aproximação de Guinier[105]. O *Rg* 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 *Rg* pode indicar uma mudança nas posições relativas entre os átomos ou domínios que compõem a macromolécula.

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 o histograma de distâncias entre todos pares de pontos (elementos de volume) da p(R) 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[106].

Nesse trabalho, os estudos de SAXS foram realizados objetivando-se a principalmente a determinação do estado de oligomerização das proteínas, na presença e ausência de ligantes, e para a definição do envelope molecular das proteínas, buscando-se modelos de baixa resolução. Esses estudos foram realizados em colaboração com o aluno de doutorado Mario de Oliveira Neto, do Instituto de Física de São Carlos, Departamento de Física e Informática – Grupo de Cristalografia de Proteínas. Todas as medidas de SAXS foram realizadas no LNLS, Campinas-SP, onde utilizamos as linhas de SAXS 1 e SAXS 2[107]. O comprimento de onda do raio incidente que foi utilizado nas diversas experiências foi λ = 1,488 Å, a distância do detector utilizada variou de 1030,3 mm a 1630 mm, dependendo da configuração da linha no dia da medida. Para aquisição de dados utilizou-se um detector unidimensional (1D) sensível

a posição (DSP), na linha SAXS 1; e um detector bidimensional (2D) tipo CCD, na linha SAXS 2.

Através das medidas com o DSP e com a ajuda de um multicanal adquiriu-se a curva de intensidade de espalhamento em função do número de canal. O espalhamento parasita do ar, janelas e das fendas foi subtraído da intensidade total espalhada. Nas medidas que foram realizadas com detecção unidimensional houve necessidade de realizar o procedimento de *desmearing*, isto é, corrigir os dados experimentais para evitar os efeitos de borramento introduzidos pela janela de entrada dos fótons no detector. Para as medidas realizadas no CCD, foi necessária a integração do padrão bidimensional de espalhamento para se chegar a uma curva unidimensional curva de espalhamento, essa integração dos dados foi realizada pelo programa Fit2D[108].

As curvas de espalhamento das proteínas e seus solventes foram coletadas em 20 *frames* de 100 segundos para monitoramento da radiação e da estabilidade da linha, nos experimentos realizados na SAXS1. Na linha SAXS2 foram medidos 2 *frames* de 300 segundos. Os dados foram normalizados com o feixe incidente e corrigidos pela resposta de homogeneidade do detector. O espalhamento do tampão foi subtraído e as diferentes curvas foram escalonadas pela concentração. As funções de distribuição de distâncias p(r) e os raios de giração (Rg) foram calculados pelo programa que realiza transformada inversa de Fourier – GNOM[109].

Os experimentos de oligomerização e determinação do envelope molecular do TR foram realizados para as construções DBD-LBD e completa das duas isoformas do TR (α1 e β1). A construção do TR β1 estudada foi o TR DBD-LBD. Estes estudos objetivaram, além da determinação dos envelopes do receptor e um modelo estrutural inicial de um receptor contendo mais de um domínio, comparar os níveis de oligomerização das diferentes preparações da amostra (com e sem T3 e com o DNA F2). As medidas foram realizadas na presença e ausência do ligante T3, nas seguintes concentrações protéicas: 2, 5 e 8 mg/mL. Na

tentativa de conseguirmos avaliar estruturalmente o que ocorre na ligação proteína-DNA, foram realizadas medidas do TRβ1 DBD-LBD complexado com o elemento responsivo F2, um palíndromo invertido com o motivo de ligação AGGTCA espaçados por 6 pares de base. Essas medidas foram realizadas nas seguintes concentrações: 3, 5 e 8 mg/mL.

As construções do TR α1 estudadas foram a do receptor completo e dos domínios DBD-LBD. Primeiramente, esses estudos foram realizados para se propor um modelo estrutural de um receptor nuclear completo. Além disso, esses estudos foram realizados para a avaliação do estado de oligomerização dessa isoforma do receptor. As medidas do TR α foram realizadas nas concentrações de 3, 5 e 8 mg/mL, com o receptor em suas formas apo e holo.

3.12.1. Construção dos modelos

Para as análises do envelope, subtraiu-se uma constante dos dados experimentais para aumentar a intensidade em altos ângulos de decaimento. Seguindo-se a lei de Porod´s para partículas homogêneas[110], essa constante é calculada pelo programa de determinação de envelope DAMMIN[111], o qual utiliza do método *ab initio*. Nas construções realizadas com o programa GASBOR não há necessidade de subtrair a constante, pois o programa simula a estrutura interna da proteína. Para a análise automatizada das reconstruções e elaboração de modelos médios usou-se o pacote de programas DAMAVER[112]. Todas as amostras submetidas aos experimentos de SAXS foram previamente analisadas por gel nativo e DLS para se avaliar a monodispersividade da amostra.

Os envelopes de baixa resolução foram gerados a partir dos dados experimentais utilizando duas abordagens independentes. Na primeira delas, o envelope é descrito como uma função angular, parametrizada em termos de harmônicos esféricos[104,106]. O número máximo de harmônicos esféricos é escolhido para o ajuste dos parâmetros livres, os quais estão diretamente realacionados ao número de canais de Shannon[113], nos dados experimentais. Com essa abordagem, os modelos foram construídos sem restrições de simetria,

posteriormente foram aplicadas simetrias P2 e P222, respectivamente, para os modelos de dímeros e tetrâmeros, resultando na redução do número de parâmetros livres do modelo. Essas simetrias utilizadas nos modelos foram extraídas das estruturas cristalográficas de dímeros do TR e tetrâmeros do RXR -PDB 2NLL[58]e 1NAX[75].

A outra abordagem *ab initio* utilizada foi implementada pelo programa DAMMIN[111]. Os modelos foram gerados primeiramente sem e posteriormente com imposição de simetria. Foram realizadas vinte simulações independentes *ab inito,* as quais geraram um modelo médio, calculado pelo pacote de programas DAMAVER.

Os modelos de alta resolução que foram encaixados nos envelopes obtidos pelo SAXS foram elaborados a partir de conjuntos de coordenadas dos domínios separados do TR β1 DBD e LBD, obtidas do banco de dados de proteínas (PDB ID 2NLL e 1NAX) o modelo do TR DBD-LBD foi construído através do programa MODELLER[114]. Os dímeros e tetrâmeros foram gerados pela imposição de simetria P2 e P222 no programa PDBSET do pacote CCP4[115]. Os oligômeros foram ajustados manualmente, evitando-se sobreposições, através do programa COOT[116]. Para o correto empacotamento dos tetrâmeros, quatro domínios de TRβ1 LBD foram superpostos ao tetrâmero de hRXRα LBD (PDB ID 1G5Y[117]) usando-se o programa SUPERCOMB[110]. As posições relativas dos domínios DBD foram encontradas pela rotação da função envelope para minimizar as discrepâncias com o envelope de baixa resolução. Os modelos foram gerados usando-se o programa MASSHA[118]. O raio de giro (Rg), as distâncias máximas intrapartículas (D_{max}), as funções dos envelopes e as curvas de espalhamento foram calculadas a partir das coordenadas atômicas através do programa CRYSOL, levando-se em conta a influência da camada de solvatação[119].

3.13. Anisotropia de fluorescência da ligação TR-DNA

A anisotropia de fluorescência mede, indiretamente, a movimentação de moléculas em solução, complexos maiores possuirão maiores valores de anisotropia por se moverem mais lentamente. Nesse caso, a anisotropia foi utilizada para investigar forças dominantes

envolvidas na interação proteína-proteína (TRβ1 DBD-LBD) e proteína-DNA (TRα1 completo, TRβ1 DBD-LBD e TRβ1 DBD), com o objetivo de se encontrar os valores das constantes de dissociação dos complexos TR – TR e TR com seus diferentes HREs, e de saber se esse tipo de interação é cooperativa e quais elementos facilitam ou dificultam a ligação no DNA. Além disso, também se estudou a influência de íons, como o magnésio (Mg^{2+}), na especificidade da ligação e a influência da concentração de NaCl na associação proteína – DNA. Esses estudos foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Luis MaurícioT. R. Lima, da Faculdade de farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

3.13.1. Preparo dos oligonucleotídeos sintéticos

As fitas simples dos oligonucleotídeos, contendo a extremidade 5´ da fita *sense* marcada com fluoresceína, purificados por HPLC, foram adquiridos pela Alpha DNA (Canadá), suas concentrações foram calculadas através de seus coeficientes de extinção a 260nm. Os quatro elementos responsivos do DNA utilizados nos experimentos, contendo 18 a 26 pares de base, com duas seqüências de reconhecimento ao TR (A/GGGTCA), estão apresentadas a seguir, Além deles, também foi utilizado um oligonucleotídeo inespecífico para a ligação aos receptores nucleares, conforme demonstrado abaixo.

F2 – 5' AGCTTATTGACCCCAGCTGAGGTCAAGTTACG 3',

TRE Pal – 5' ATATTCAGGTCATGACCTGAATAT 3',

DR-4 – 5' AGCTAAAGGTCAGATCAGGTCAGTAGGA 3',

DR-1 – 5' AGCTAAAGGTCAGAGGTCAGTAGGA 3',

DNA não específico – 5 ' TAATTAGGCATGTCTAGGAAA 3'

Cada fita simples de DNA foi inicialmente diluída em água e pareada com sua complementar através de um equipamento de PCR (Perkin-Elmer 480 programmable thermocycler, Perkin-Elmer, USA), em concentrações equimolares, através de aquecimento a 100°C por 10 minutos, seguido por um resfriamento lento até 25°C. Os oligonucleotídeos anelados foram estocados a -20°C.

3.13.2. Gel nativo TR DBD-LDB com seus elementos responsivos

Para a obtenção da intensidade da ligação da proteína com o DNA, além da forma oligomérica apresentada pelo complexo, foram realizados ensaios de eletroforese nativa. Em um primeiro ensaio, 48 μM de TRβ1 DBD-LBD foi incubado por 1 hora com 24 μM de cada um dos tipos de TREs utilizados nos ensaios de fluorescência (F2, TER Pal, DR-1 e DR-4), essa mistura foi aplicada em um gel nativo com gradiente de 8 a 25% de acrilamida, no sistema P*hast System* (Amersham-GE).

Além desse ensaio, também foram realizadas eletroforeses nativas variando-se a concentração de NaCl no tampão da proteína, para verificar se a concentração de sal interfere na ligação proteína-DNA. Para tanto, utilizou-se as seguintes concentrações de NaCl 50, 100, 150, 200, 300, 500 e 1000mM NaCl. Por fim, para checar a estequiometria da ligação, fez-se mais uma eletroforese nativa mantendo-se a concentração de proteína constante e variando-se a concentração de DNA em 0; 0,1; 0,25; 0,5; 1 e 3 vezes a concentração molar de proteína.

3.13.3. Medidas de Anisotropia de fluorescência

Todas as medidas foram realizadas em um espectrofluorímetro ISS-PC1 (ISS, Champaign, IL), montado em geometria L, a 10°C. O comprimento de onda de emissão utilizado foi 495nm, utilizou-se um filtro de *cuttoff* de 515nm (corte de 50% da intensidade em 515nm) para coletar o espalhamento da luz emitida. Os valores de anisotropia foram calculados pelo programa Vinci-ISS da seguinte maneira[120]:

$$R = [\ I_{VV} - (G*I_{VH})\ ] / [\ I_{VV} + (2*G*I_{VH})\ ] \qquad (1)$$

em que I refere-se à intensidade de fluorescencia medida, os indices *V* (vertical) e *H* (horizontal) referem-se à posição dos polarizadores durante a excitação (primeiro índice) e emissão (Segundo índice) e *G* é um fator de correção o qual considera diferenças da sensitividade, nas duas direções I_{VH} e I_{HH}, de acordo com[120]:

$$G = I_{HV} / I_{HH} \qquad (2)$$

Para cada medida, os valores de anisotropia foram medidos atós absolutos fossem menores que 0,005. Os dados foram corrigidos para as contribuições fracionais da fluorescência sobre a anisotropia. Para cada experimento foram realizadas no mínimo 3 medidas para cada condição do experimento, utilizando-se amostras diferentes em dias diferentes.

3.13.4. Ensaio de titulação da interação TRβ1 DBD-LBD – TRβ1 DBD-LBD

Esses ensaios foram realizados para analisar o estado oligomérico do apo- TR, na ausência de seus elementos responsivos, na busca de se avaliar o comportamento da proteína antes da ligação ao DNA. Para se medir a associação do TR DBD-LBD em solução, inicialmente, as proteínas recém purificadas foram marcadas com a sonda fluoresceína (FITC), a qual se liga em grupos amina da proteína.

O ensaio de marcação foi preparado incubando-se proteína a 5 mg/mL com um excesso molar de sonda de 3 vezes a concentração proteíca, por 2 horas a 10°C. Após este passo, o complexo proteína-sonda foi aplicado em uma coluna de *desalting* (HiTrap desalting – GE healthcare) para a separação do excesso de sonda do complexo TR-fluoresceína. As amostras foram monitoradas em 280 nm para checar a proteína e em 495 nm, para a sonda.

Nesses ensaios titulou-se separadamente, em pequenos passos, apo-TR, em uma faixa de concentração de 10 nM a 10 μM, em uma solução contendo 5 nM de TRβ1 DBD-LBD marcado com fluoresceína. As medidas de anisotropia foram tomadas em cada concentração do ensaio (5 nM, 10 nM, 50 nM, 100 nM, 500 nM, 1 μM, 5 μM e 10 μM), tomando-se cuidado para que o volume final não fosse diluído mais que 20%. Os ensaios foram realizados em tampão contendo 50 mM NaCl, 20 mM Hepes pH 8, 3 mM DTT, 5% glicerol, a 10°C. As curvas de titulação foram analisadas considerando-se um simples equilíbrio reversível de dois estados entre as formas do TR.

Para a avaliação do estado oligomérico do TRβ1 DBD-LBD nas concentrações iniciais e finais da transição encontrada nas curvas, foi realizado um experimento de *crosslinking.* O

apo-recetor, a 0,5 e 5 μM, foi submetido ao *crosslinking*, utilizando-se o reagente DSS, após a reação de ligação, as amostras foram submetidas a uma eletroforese desnaturante e o gel foi corado com prata.

3.13.5. Ensaio de titulação de interação TR-DNA

Esses ensaios foram realizados tanto para o TR α1 completo, quanto para as construções DBD e DBD-LBD do TR β1. Todos os ensaios de titulação proteína-DNA foram executados adicionando-se pequenas quantidades de proteína concentrada (em um intervalo de 1 nM a 1000 nM) a uma quantidade fixa de DNA (10 nM para cada um dos HRES: F2, DR-4, DR-1 e PAL). Após cada adição de proteína, as amostras foram homogeneizadas e medidas de anisotropia foram tomadas. Em todos os casos, a diluição máxima da amostra não ultrapassou 20% e as mudanças na intensidade da anisotropia foram corrigidas pela diluição. As reações de ligação foram realizadas a 10°C, utilizando-se 10 nM TREs marcados, 50 mM NaCl, 20 mM Hepes pH 8,0, 3 mM DTT e 5% glicerol. Essas medidas foram realizadas na presença e ausência de 1mM $MgCl_2$ para a avaliação da ligações inespecíficas. As isotermas provenientes dos ensaios de titulação foram analisadas e consideradas em um simples equilíbrio reverso de dois estados. Sabe-se que a ligação TR-DNA ocorre com a proteína dimérica[79], nesse caso a constante de dissociação será calculada a partir da reação:

$$2\ TR + DNA \rightleftharpoons 2\ TR : DNA$$

A constante de dissociação foi definida de acordo com a equação:

$$Kd = (D*TR)/TRD \qquad (3),$$

Sendo D é a concentração molar da dupla fita de DNA livre em solução, TR é a concentração molar do dímero livre e TRD é a concentração molar do complexo formado pelos dímeros de TR e os TREs. O complexo foi relacionado às medidas de fluorescência através de:

$$TRD = Dt*\alpha \qquad (4),$$

$$\text{sendo , } \alpha = \text{fração ligada de DNA} = (A_{obs} - A_i)/(A_f - A_i) \qquad (5),$$

Sendo A_{Obs} é o valor observado de anisotropia e A_i e A_f são, respectivamente, os valores assintóticos limites menor e maior, obtido pelo ajuste das curvas. Com essa equação, segue-se que:

$$A_{obs} = A_i + (A_f - A_i)*\{[(TR + n)/(k^n)]/ [1+(TR^n/k^n)]\} \quad (6),$$

sendo TR é a concentração molar de proteína monomérica livre; k é a constante de dissociação aparente; e **n** é o coeficiente de Hill, que mede cooperatividade na ligação, se não houver cooperatividade n=1[121].

3.13.6. Ensaio de dissociação TR-DNA por titulação de NaCl.

Para avaliarmos a dependência da força iônica na ligação TR-DNA, fez-se medidas de dissociação do TR aos seus quatro elementos responsivos diferentes, através da titulação de NaCl. As medidas de anisotropia foram realizadas após incubar 400 nM TR DBD-LBD com 200 nM de qualquer um dos elementos responsivos, garantindo-se ligação de todos os complexos e, depois, titulou-se NaCl a essa mistura. Os ensaios foram realizados a 10°C e as concentrações finais de NaCl em cada medida foram: 50, 60, 80, 100, 150, 250, 350, 550, 800 e 1000 mM. Em todos os casos a diluição máxima da amostra não ultrapassou 20% e as mudanças na intensidade da anisotropia foram corrigidas pela diluição. As isotermas obtidas nos ensaios de titulação TR-DNA foram analisadas considerando-se um simples equilíbrio de dois estados entre TR-dímero e DNA. Estes ensaios foram realizados para o TR β 1 DBD-LBD e DBD, ligados aos quatro elementos responsivos (F2, TER Pal, DR-1 e DR-4), na presença e ausência de 1mM de $MgCl_2$.

3.14. Estudos de dinâmica da ligação do ligante por espectrometria de massas

Proteínas não são estruturas estáticas em solução, elas possuem movimentos naturais ou em resposta a estímulos externos. Esses movimentos, também chamados de dinâmica proteica, podem ser extremamente importantes para a função das proteínas[122]. Enquanto muitos métodos biofísicos medem propriedades características de proteínas, a maioria das

técnicas, como dicroísmo circular, calorimetria diferencial e ultra-centrifugação, provêm informações globais sobre este tipo de macromoléculas. Somente cristalografia de proteínas por raios-X e ressonância magnética nuclear podem resultar em informações estruturais localizadas e em alta resolução[123]. A utilidade de ambas as técnicas é bem conhecida, entretanto, as duas possuem limitações; para a cristalografia de proteínas, o gargalo é a própria cristalização da macromolécula; e para a ressonância magnética nuclear são necessárias amostras em condições adequadas, altas concentrações e com limite de tamanho da macromolécula. Em meio a esse contexto, surgiu a espectrometria de massas baseada na troca isotópica de Hidrogênio por Deutério (Troca H/D). Essa técnica permite a análise de dinâmica e estrutura de proteínas em condições não tão restritas[123, 124, 125].

A técnica divide-se em duas etapas, primeiramente a macromolécula é submetida à troca isotópica dos hidrogênios das amidas (pertencentes à cadeia principal) expostas ao solvente pelo deutério, em excesso na solução. A segunda etapa da técnica consiste na digestão proteolítica da proteína em estudo, geralmente feita com a pepsina, por apresentar seu funcionamento ótimo próximo ao das condições experimentais. A macromolécula é então clivada especificamente nas seqüências reconhecidas pela enzima, gerando peptídeos com seqüência e tamanho conhecidos, os quais serão analisados no espectrômetro de massas. A diferença na incorporação se dá pela comparação dos espectros da proteína clivada sem ser incubada e incubada com deutério. Cada deutério incorporado em cada peptídeo resulta em um aumento de massa, deslocando os picos encontrados no espectrômetro de massas. Com base nos dados torna-se possível conhecer regiões com maior ou menor mobilidade; regiões expostas ou interiorizadas de acordo com sua condição; além de interfaces de oligomerização, entre outros[123, 124, 125].

Os estudos da dinâmica da ligação do ligante foram feitos para o TRβ1 LBD nativo e mutante F451x (aas 209-461), na ausência e presença do ligante T3. Esses ensaios foram feitos para se examinar as mudanças conformacionais que ocorrem na proteína após a ligação

do ligante. Esses experimentos foram feitos em colaboração com o Prof. Dr. Mario Sérgio Palma, do Laboratório de Zooquímica da Unesp – Rio Claro.

Após a purificação, o tampão inicial da proteína foi trocado em uma coluna de *desalting* (HiTrap desalting column – GE healthcare), para um tampão contendo apenas 50 mM acetato de amônio, pH 7,0. A troca do tampão foi necessária para o experimento, pois o equipamento não permite o uso de grande quantidade de sais e, também, para melhorar a ionização da proteína. Além disso, foram testadas amostras com diversos tampões: 20 mM Hepes pH 7,0; 50 mM Tris-HCl pH 8,0 e 50 mM acetato de amônio pH 7,0, e a última condição foi definida como a de maior ionização para a proteína. Para a produção do holo-TR, adicionou-se T3 à proteína em um excesso molar de 3 vezes, essa mistura foi incubada por 1 hora à 4°C.

Para os ensaios de deuteração, apo- e holo-TR LBD (1 mg/mL, ~40 μM) foram concentrados 20 vezes em uma *speedvac*, a 4°C. As trocas Hidrogênio/Deutério (H/D) foram inicializadas pela diluição da proteína, com e sem ligante, (20 vezes) no mesmo tampão, contendo 90% de água deuterada (D_2O – pD 7,0) a 25°C. As trocas H/D foram feitas em vários períodos de tempo: 1, 3, 8, 15, 60, 180, 300 e 480 minutos. Nos tempos específicos, adicionou-se 5% de ácido fosfórico a 100 μL de cada amostra para pausar a reação (pH 2,6). Essas reações foram imediatamente aplicadas em um espectrômetro de massa acoplado a um triplo quadrupolo (*Quattro II Triple-quadrupole mass spectrometer*, Micromass) equipado com um equipamento *eletrospray* (ESI), ou digeridas com pepsina em uma proporção molar de 2:1 (proteína:enzima). As digestões foram realizadas a 25 °C, por 10 minutos e as reações de clivagem foram pausadas quando a reação foi colocada a 0 °C.

Para análise dos 60 peptídeos pépticos gerados pela digestão, as amostras foram aplicadas no espectrômetro assim que as reações foram finalizadas, a fim de evitar trocas reversas com hidrogênios da solução. O nível de deutério em cada peptídeo foi determinado pelas diferenças no centróide de cada pico do espectro de massa, entre as formas deuteradas e

não deuteradas. A proteína inteira (não clivada) foi usada como controle para a estimativa da perda de deutério durante a digestão, tanto para a forma apo-, como para o holo-TR.

A identificação dos íons-peptídeos formados pela digestão foi feita através do programa MS-Digest[126], o qual identifica, à partir da seqüência da proteína e da enzima digestiva utilizada, quais seriam os peptídeos formados em uma digestão péptica e suas respectivas relações carga/massa. A deconvolução dos espectros foi feita pelo programa do próprio equipamento (Maslink). O número total de hidrogênios trocados foi determinado pela seguinte relação:

$$N_H = N_{Lp} + 1H_{pep} - N_{Pro} \quad \text{(Eq. 6)}$$

sendo, N_H é o número total de hidrogênios trocados por deutério, N_{Lp} é o número de ligações peptídicas de cada peptídeo, H_{pep} é o hidrogênio do n-terminal de cada peptídeo e N_{Pro} é o número de prolinas de cada peptídeo. A estrutura secundária da proteína foi determinada pelo programa DSSP e as taxas de deuteração e hidrofobicidade de cada resíduo foram graficados pelo programa TexShade[127].

Capítulo 4 – Oligomerização do TR em Solução

4.1. Introdução

Esse capítulo irá descrever, além dos resultados de oligomerização do TRβ1 DBD-LBD, os quais foram publicados em revista interanacional[128], alguns resultados obtidos com estudos de oligomerização das construções LBD, TRβ1ΔABC e TRβ1ΔABCD, as quais, passarão a ser chamadas de TR β1 LBD 202 e TR β1 LBD 209. Além disso, os principais resultados de expressão e purificação também serão descritos nesse capítulo. Esses estudos foram uma continuação do trabalho da Dra. Sandra Martha Gomes Dias[8].

4.1.1. Oligomerização dos receptores nucleares

Conforme descrito no **capítulo 1**, os receptores de hormônios tireoidianos podem atuar sobre seus elementos responsivos de três maneiras distintas – como monômeros, homodímeros e heterodímeros com o RXR. A maneira como o TR irá se ligar aos TREs depende da orientação e arranjo dos meio-sítios no DNA e da mudança do estado oligomérico do receptor, o que gera a especificidade de cada forma do TR a cada promotor distinto[43].

Os TRs são os únicos receptores da subfamília 1, que além de regularem a transcrição associados como heterodímeros a HREs em arranjos de repetições diretas, podem atuar também como homodímeros ligados a outros arranjos de DNA. À exceção do TR, não se observa a formação de homodímeros entre os receptores desta subclasse[129]. Alguns estudos relatam que os homodímeros do TR são encontrados na ausência do hormônio, e a adição do mesmo, promove a dissociação destes complexos, o que indiretamente concorre para a formação dos heterodímeros entre TR e RXR[79].

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 do receptor TR que existem em solução são monômeros e heterodímeros TR/RXR, sendo que os homodímeros se formam mais fracamente[130, 131, 132].

O único receptor desta subclasse que atua comprovadamente como homodímero é o RXR, o qual é ativado pelo ácido 9-*cis* retinóico em DR-1. Portanto, o RXR se distingue dos outros receptores desta subclasse ao atuar como homodímero e também participar efetivamente da formação de heterodímeros[133]. Estudos de auto-associação do receptor RXRα em solução revelaram que este receptor forma homotetrâmeros em solução. Estes tetrâmeros se associam com alta afinidade e de uma maneira cooperativa, tornando-se a espécie predominante em concentrações entre 50-100 nM. Também foi demonstrado que a ligação do

agonista ao RXR resulta em uma rápida dissociação desses tetrâmeros para monômeros e dímeros[103, 134, 135, 136].

Após a resolução da estrutura cristalográfica do tetrâmero do RXR LBD e da construção de modelos em baixa resolução, através de SAXS, o mecanismo de auto-repressão do RXR tem sido mais evidenciado[137, 138, 139, 140]. Os detalhes moleculares da organização tetramérica revelaram que os quatro monômeros se associam em uma estrutura compacta na forma de discóide, com dois homodímeros simétricos. O modelo de tetrâmero construído com bases nos dados de SAXS apontou que os dímeros estão rotacionados um em relação ao outro, enquanto que a estrutura cristalográfica apresentou um tetrâmero mais plano (**Fig. 14**). A interface de dimerização de cada homodímero é clássica para os receptores nucleares, formadas pelas hélices H9 e H10. A hélice 11 de cada monômero do dímero superior está empacotada contra a correspondente na unidade inferior, formando o centro da interface de tetramerização. A hélice 12, que contém AF-2, se projeta da interface dos monômeros de um dímero, fazendo contato com o sítio do coativador do outro dímero. Em adição à interface de dimerização, cada monômero contribui de fato com três áreas distintas, que compõem a interface de tetramerização: a interface H3/H3, a interface H11/H11 e a interface AF2/sítio de coativador[117]. Nesta configuração, cada monômero de um dímero reprime a ligação de um coativador no monômero correspondente do outro dímero. A presença do ligante 9-*cis* promove a remoção das H12 das suas posições de inibição mútua, com o empacotamento destas hélices contra o corpo dos monômeros. Por conseqüência, ocorre a liberação de dímeros e/ou monômeros ativos**.** Estes resultados demonstram que o processo de auto-inativação dos tetrâmeros é feito pelo mascaramento da região do RXR, importante para a interação com coativadores[137] (**Fig. 14**).

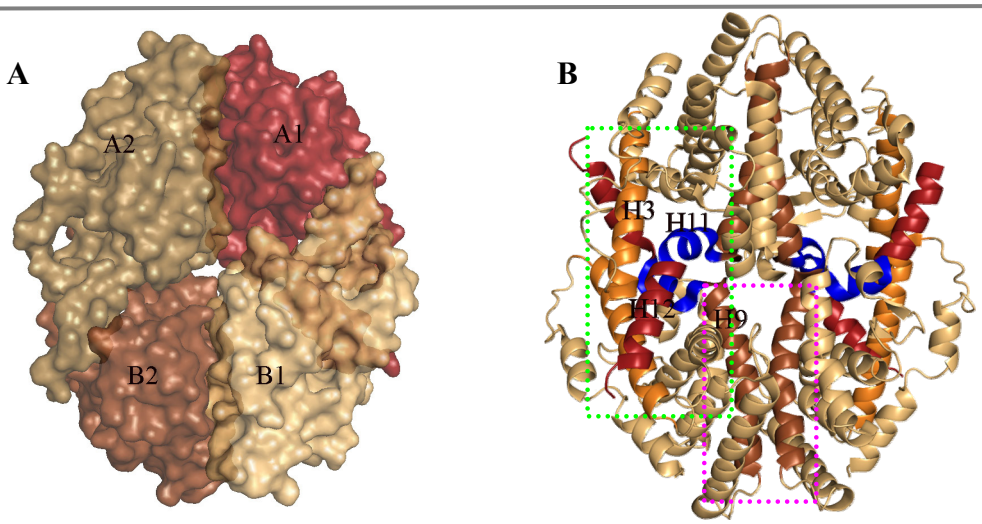


Figura 14 - (A) Estrutura cristalográfica representada como superfície de *van der Walls* dos átomos do LBD do RXR α1 humano associado como tetrâmero; A1 e A2 são os monômeros que compõem um dos dímeros, B1 e B2 são os monômeros do outro dímero. (B) Mesma estrutura representada em *cartoon*, indicando a interface de dimerização de cada dímero (quadro pontilhado em rosa, H9/H9, em marrom), e os contatos da interface de tetramerização (quadro pontilhado em verde) H3/H3, em laranja; H11/H11 em azul; e H12/ sitio de coativador, em vermelho (PDB ID 1G1U, ref. 117).

Enquanto os mecanismos de auto-associação do RXR têm sido bastante estudados, a auto-associação do TR e o papel do ligante na regulação desse processo ainda não está definido. Foi com base nesses fatos que se optou pela investigação do estado oligomérico do TR. Nesse capitulo serão apresentadas análises sistemáticas do estado oligomérico do TR em solução. Para tanto, foram comparados dados do TR β1 DBD-LBD e com o TR β1 LBD com e sem *hinge* (202 e 209), procurando-se evidenciar a participação de cada domínio nesse processo. Além disso, alguns estudos preliminares de oligomerização foram realizados com a isoforma α do receptor (construções DBD-LBD e completo).

4.2. Resultados

4.2.1. Purificação do TR β1 DBD-LBD, TR β1 LBD E202 e TR β1 LBD E209

O TR foi expresso em três construções diferentes para a comparação de seus principais domínios no processo de oligomerização. Entre essas construções estão o TRβ1 DBD-LBD (também chamado TRβ1ΔAB), similar à construção usada em estudos de oligomerização do RXR em solução[140]. Esta construção, apesar da ausência do domínio N-terminal, possui todos os domínios necessários para a ligação do hormônio e para a oligomerização. As outras construções utilizadas foram o TRβ1 ΔABC (LBD 202), que contém aminoácidos que

compõem o *hinge* e o TRβ1 ΔABCD (LBD 209), que não contém o *hinge*. Todas essas construções foram expressas em *E. coli* como fusões com cauda de histidina e foram purificadas inicialmente por uma coluna de afinidade a cobalto, conforme as condições indicadas no capítulo 2. Após a purificação por afinidade, parte dessas proteínas foi incubada com excesso de ligante T3, para os estudos da ação do hormônio na oligomerização.

O TR β1 DBD-LBD com e sem ligante (holo- e apo-TR) foi aplicado à coluna de interação hidrofóbica como um passo de purificação a mais, apresentado um alto grau de pureza. Além disso, esse passo de purificação foi utilizado para a confirmação da preparação do holo- e apo-TR. Observou-se que a proteína foi eluída quando a concentração de tampão B era aproximadamente de 45% na presença do ligante e de 65% na ausência do mesmo. O rendimento da purificação do TR β1 DBD-LBD foi considerado razoável, cerca de 4 mg por litro de cultura (**Fig. 15A**).

O TRβ1 LBD com e sem *hinge*, por apresentarem-se razoavelmente puros após a afinidade (em torno de 90% de pureza), foram aplicados na coluna de interação hidrofóbica somente na presença de T3, para a garantia da homogeneidade das amostras. O rendimento apresentado na purificação dessas duas construções foi cerca de 8-10 mg de TRβ1 LBD 202 (**Fig. 15B**) e 10-12 mg de TRβ1 LBD 209 (**Fig. 15C**) por litro de cultura expressa. Todas as amostras foram submetidas à coluna de gel filtração, como o ultimo passo de purificação, o que garantiu às amostras, uma pureza maior.

Todas essas proteínas foram congeladas em N_2 líquido e estocadas a -80°C ou utilizadas imediatamente após as purificações para os ensaios que serão descritos nessa tese. O tampão final, em que as proteínas foram mantidas e estudadas, foi o de gel filtração (20 mM Hepes, pH 8, 50 a 400 mM NaCl, 5% glicerol e 1 a 3 mM DTT). Em alguns casos, o tampão foi trocado no próprio concentrador ou através de uma coluna de *desalting*. O monitoramento de todas as purificações foi realizado através de eletroforese em SDS-PAGE.

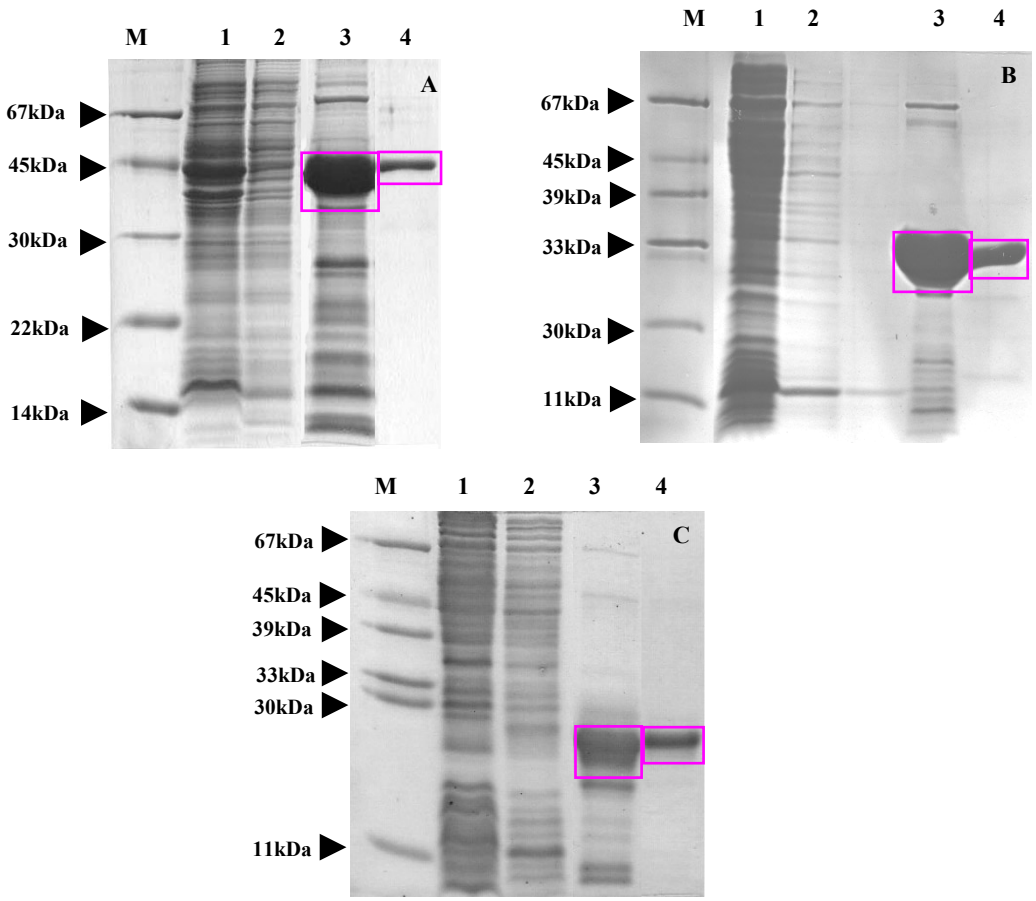


Figura 15. SDS-PAGE de *pools* de frações coletadas contendo as proteínas TR β1 DBD-LBD (**A**), LBD 202 (**B**) e LBD 209 (**C**), após cromatografia de afinidade e gel filtração, corados com *Coomassie Blue*. Os marcadores de massa molecular estão evidenciados nas figuras. M = marcador de massa molecular , **1**. Extrato após incubação com resina de afinidade, **2**.Lavagens da coluna de afinidade, **3**.Frações coletadas da coluna de afinidade e **4**. Frações coletadas da coluna de gel filtração.

4.2.1.2. Purificação do TR α1 completo e TR α1 DBD-LBD

As purificações de todas as proteínas foram feitas conforme descrito para o TR β1 LBD-DBD, uma afinidade seguida por uma filtração em gel. Os TRα1 completo e DBD-LBD não precisaram da coluna de fenil para conter um alto grau de pureza. A purificação dessas proteínas apresentou rendimento e pureza consideráveis e os tamanhos das proteínas são condizentes com o esperado.

O TR α1 completo apresentou um bom rendimento na expressão e purificação, sendo este, aproximadamente 3-5 mg proteína produzida por litro de cultura induzida (**Fig. 16A**), enquanto que para o TR α1 DBD-LBD, esse rendimento foi em torno de 7-10 mg (**Fig. 16B**). Após os dois passos de purificação as proteínas apresentaram alto grau de pureza (em torno de 90%), conforme apresentado na **figura 16**.

Todos os passos de purificação foram checados por eletroforese em SDS-PAGE com 10% acrilamida para o TR α1 completo e para o TR α1 DBD-LBD. Tanto o TR α1 completo, como o TR α1 DBD-LBD apresentaram massas moleculares de acordo com o previsto. O TR α1 DBD-LBD, antes da clivagem, apresentou massa molecular maior que 60 kDa (42 kDa do TR + 20 kDa da SUMO), após a clivagem a massa molecular do TR α1 DBD-LBD foi de, aproximadamente, 42 kDa. O TR α1 completo apresentou uma massa um pouco acima de 45 kDa antes da clivagem, após esta a massa ficou um pouco abaixo de 45kDa. Todas essas proteínas foram congeladas em N_2 líquido e estocadas a -80°C ou utilizadas imediatamente após as purificações para os ensaios que serão descritos nessa tese. O tampão final, em que as proteínas foram mantidas e estudadas, foi o de gel filtração (20 mM Hepes, pH 8, 50 a 400 mM NaCl, 5% glicerol e 1 a 3 mM DTT).

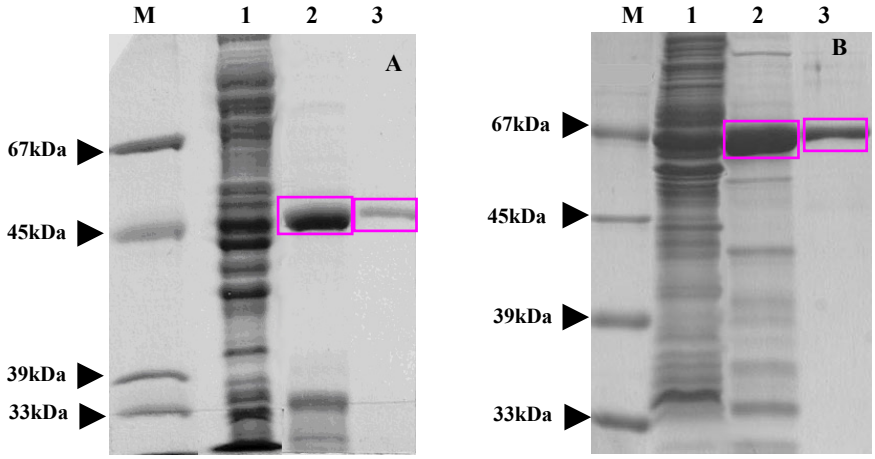


Figura 16 – Gel SDS PAGE da purificação do TR α1 completo (**A**) e TR α LBD-DBD (**B**). Após cromatografia de afinidade e gel filtração, corados com *Coomassie Blue*. Os marcadores de massa molecular estão evidenciados nas figuras. M = marcador de massa molecular, **1**.Extrato após incubação com resina de afinidade, **2**.Frações coletadas da coluna de afinidade e **3**. Frações coletadas da coluna de gel filtração.

4.2.2. Remoção das fusões

4.2.2.1. Remoção da cauda de histidina do TRβ1 ΔAB ou TRβ1 DBD-LBD.

Para os estudos biofísicos do receptor, optou-se por clivar a cauda de histidina tentando, dessa forma, minimizar qualquer tipo de interação não específica à proteína. A cauda de histidina foi removida somente para a construção do TR DBD-LBD, as construções do TR β1 LBD 202 e 209 possuem um sítio de clivagem com trombina, exposto na estrutura,

o qual não é exposto na construção DBD-LBD. A clivagem da cauda do TR β1 DBD-LBD ocorreu após sua incubação com 1U trombina por 100 µg de TR, a 18°C, a reação foi pausada com 1 µM PMSF. Para a confirmação da clivagem foram realizadas eletroforeses em gel de tricina 16% e em gel nativo (**figura 17**).

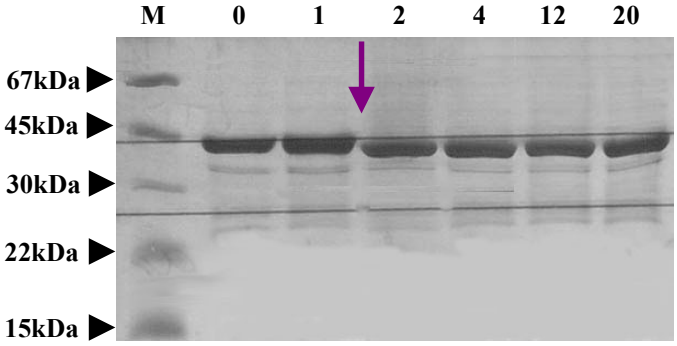


Figura 17 - Gel de tricina do ensaio de clivagem do TR β1 DBD-LBD com trombina protease. Na primeira coluna está o conjunto de proteínas marcadoras de marcadores de massa molecular (**M**). Nas colunas seguintes estão representados os tempos de incubação para a clivagem de 0, 1, 2, 4, 12 e 20 h.

A verificação do tempo de clivagem se deu pelo experimento de *imunoblotting* contra cauda de histidina. Nesse experimento foi possível a confirmação do tempo total de clivagem, que ocorreu em 2 horas.

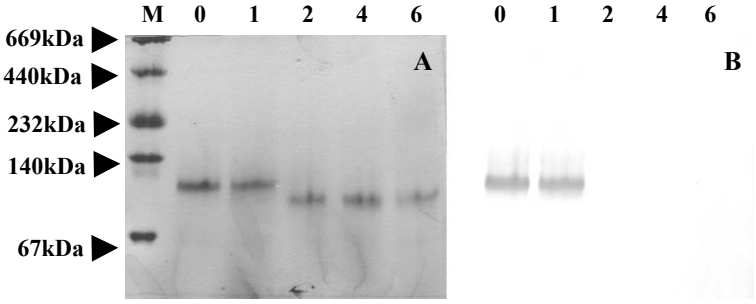


Figura 18 - A. Gel nativo do ensaio de clivagem da cauda de histidina do TR β1 DBD-LBD apresentando diferenças nos tamanhos das bandas entre 0 e 2 horas de incubação com trombina. **B.** Membrana do *blotting* corada com os anticorpos anti-cauda de histidina. Os anticorpos reconheceram apenas a cauda de histidina nos tempos 0 e 1 hora, comprovando que a partir de duas horas, a cauda de histidina foi removida da proteína. **M.** Marcador de massa molecular, 0, 1, 2, 4 e 6 são os tempos de incubação, em horas, utilizados nos ensaios.

O TR α completo foi clivado após a purificação de gel filtração, em tampão contendo 20 mM Hepes pH 8, 200 mM NaCl, 5% glicerol e 3 mM DTT, por 5 horas a 10°C, utilizando-se 1U de trombina por 100 µg de proteína pura. A separação da proteína e a cauda de histidina, após a clivagem, foi realizada no próprio concentrador (Amicon ultra 10 MWCO, Millipore), em que a proteína fica retida e a cauda passa por seus poros (**Fig. 19**).

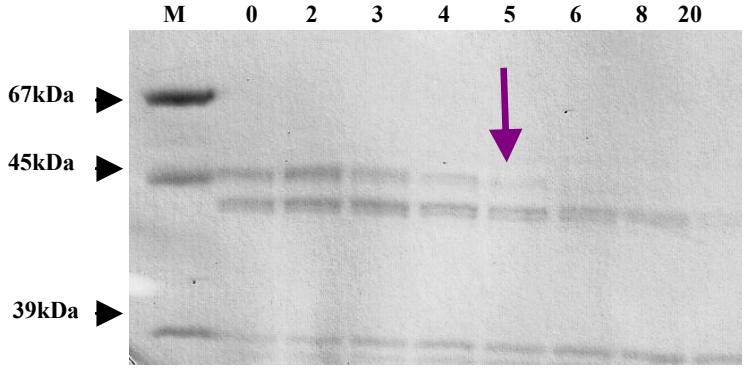


Figura 19 – Gel SDS PAGE de 10% acrilamida ilustrando a clivagem da fusão TR α completo – cauda de histidina. Naprimeira fila, tem-se os marcadores de massa molecular. Nas canaletas seguintes do gel tem-se a reação de clivagem da proteína nos tempos 0, 2, 3, 4, 5, 6, 8 e 20 horas. Após 5 horas de clivagem a banda superior desaparece (seta), constatando a clivagem completa do receptor.

4.2.2.2. Clivagem da fusão com a SUMO.

A clivagem da proteína SUMO (20 kDa) e da cauda de histidina ocorreu após 2 horas de incubação do TR α1 DBD-LBD purificado por gel filtração e a protease ULP1 (30 kDa). A mistura ficou incubada por até 6 horas a 4°C, com agitação e amostras foram retiradas a cada hora, para monitoramento da clivagem através de eletroforese em gel de poliacrilamida 15%. A reação de clivagem foi interrompida pelo inibidor de protease PMSF (1 uM). Como não interage com a coluna, o TR continuou no mesmo tampão usado para a gel filtração. Após a clivagem, as proteínas foram passadas por mais uma coluna de afinidade e conseguiu-se separar a SUMO e a ULP1 do TR, conforme ilustrado na **figura 20**.

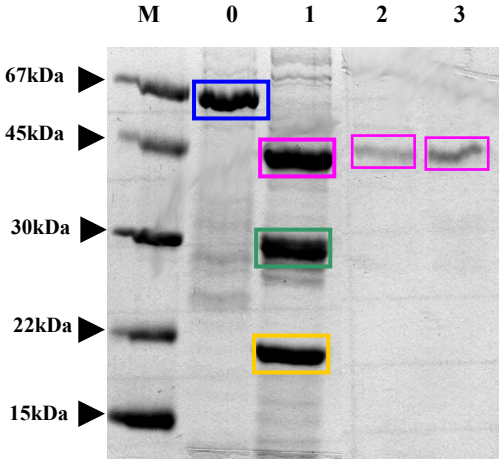


Figura 20 – Gel SDS PAGE de 10% acrilamida ilustrando a clivagem da fusão entre o TR α DBD-LBD e a proteína SUMO. Em primeiro lugar tem-se os marcadores de massa molecular (**M**). Em **0** tem-se a proteína purificada antes da clivagem (representada em azul), em **1.** está representada a mistura das três proteínas (TR em rosa, ULP1 em verde e SUMO, em amarelo) após a clivagem com a protease ULP1, **2** e **3** representam a proteína após a separação através de um coluna de afinidade à cauda de histidina.

4.3. Estudos de oligomerização do TR β1 DBD-LBD

Recentemente foi publicado o envelope em baixa resolução do receptor nuclear RXR DBD-LBD nas formas diméricas e tetraméricas[140]. A partir das informações de raio de giro (Rg) obtidos pelos gráficos de Guinier e p(r) resultantes das curvas de espalhamento calculou-se os raios hidrodinâmicos (R_H) (programa Hydro[141]) para as formas dimérica e tetramérica desta proteína e inferiu-se o raio do monômero, sendo eles, respectivamente, 4,3 nm, 5,6 nm e 3,6 nm. Estes valores foram assumidos como sendo próximos aos valores de Rh para as mesmas formas oligoméricas do receptor TR β1 DBD-LBD, dado que ambas as proteínas possuem mesma massa molecular e a estrutura dos domínios são altamente conservadas.

4.3.1. Eletroforese por gel não desnaturante.

Para examinarmos os estados oligoméricos do TR em solução, suas formas apo e holo foram submetidas à eletroforese sob condições não desnaturantes nas seguintes concentrações 33 μM, 99 μM, 165 μM, 240 μM e 330 μM (1, 3, 5, 7 e 10 mg/mL). Surpreendentemente, foi possível observar para o apo-TR β1 DBD-LBD a presença uma banda que possui o tamanho corresponde ao esperado para tetrâmeros. Para o Holo-TR β1 DBD-LBD uma só banda foi observada na posição correspondente à migração de dímeros (**Fig. 21**).

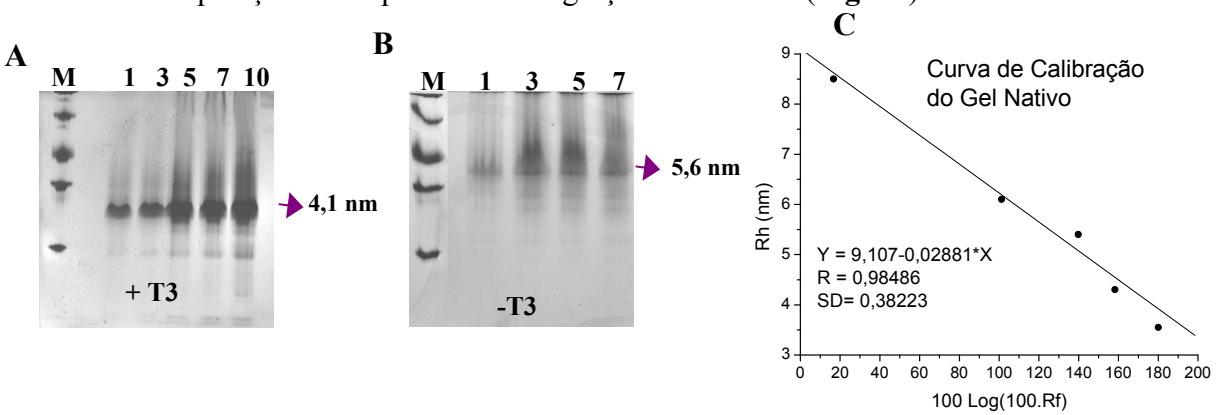


Figura 21 – Eletroforese não desnaturante. As analises das espécies do apo-TR β1 DBD-LBD e holo-TR β1 DBD-LBD foram feitas em gel com um gradiente de 8-25% de acrilamida em pH 8,8 a 10 °C e coradas com *Coomassie blue* A concentração de proteína aplicada foi de 1, 3, 5, 7 e 10 mg/mL para o complexo TR-T3 (**A**) e 1, 3, 5 e 7 mg/mL para o apo-TR (**B**). Para o cálculo dos raios hidrodinâmicos do TR, proteínas de raio e massa molecular conhecidas (**M.** proteínas do padrão →Tiroglobulina, ferritina, catalase, aldolase e Albumina) foram submetidas a eletroforese e seus fatores de retardação em gel (*Rf*) foram graficados como*100xLog(100xRf) versus* Rh (nm), o que gerou a curva uma curva de calibração, permitindo-se o cálculo dos R_H das amostras do TR, após a eletroforese nativa (**C**).

As análises da migração de cada uma dessas espécies de TR apresentaram os raios hidrodinâmicos de 4,1 nm e 5,6 nm para o complexo TR-T3 e para o apo-TR, respectivamente. Estes valores corroboram com os raios hidrodinâmicos teóricos de 4,3 nm e 5,6 nm, estimados, respectivamente, para dímeros e tetrâmeros. Com esses resultados pode-se afirmar que os TRs formam tetrâmeros em solução e que, a adição de ligantes promove sua dissociação em dímeros.

4.3.2. *Crosslinking* químico.

O *crosslinking* foi realizado na tentativa de se obter uma confirmação independente da composição das formas oligoméricas do apo- e holo-TR β1 LBD-DBD em solução. Após a reação do *crosslinking*, as amostras foram submetidas a uma eletroforese desnaturante.

Observou-se que o holo TR β1 DBD-LBD apresenta uma banda forte que corresponde a dímeros e duas bandas mais fracas nas posições relativas a monômeros e tetrâmeros. Porém, o apo-TR β1 DBD-LBD apresenta os tetrâmeros como sua principal espécie, enquanto os dímeros e monômeros estão presentes em bandas bem menos intensas (**Fig. 22**). Estes resultados reafirmam a presença de um equilíbrio das duas formas oligoméricas tetrâmeros-dímeros em solução, além disso, é um outra evidência que o ligante contribui para a dissociação dos tetrâmeros em dímeros.

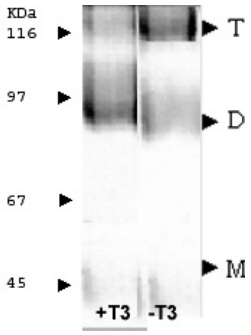


Figura 22 - Crosslinking químico do holo- e apo TR β1 DBD-LBD (+T3 e –T3, respectivamente). A proteína a 0,6 mg/ml foi submetida ao *crosslinking* com 0,05 μM DSS, e aplicada em um gel SDS-PAGE, com 10% de acrilamida, e coradas com *Coomassie blue*. T-tetramero, D-dimero, M-Monomero, os marcadores de massa molecular estão representados na figura.

4.3.4. A dependência da concentração do TRβ1 DBD-LBD na formação de tetrâmeros

Para o entendimento da dependência da concentração para a formação das diferentes espécies oligomericas do TR, o apo- e holo- receptor foram analisados através da técnica de

cromatografia por gel filtração analítica. Para esses experimentos o apo-TR e holo-TR foram concentrados e aplicados na coluna de exclusão molecular Superdex 200 10/30. Os perfis de eluição de cada amostra, as quais sofreram diluições de cerca de 15 vezes em comparação com a amostra aplicada, foram determinados e comparados com os de proteínas padrões de raio hidrodinâmicos (Rh) conhecidos.

O Apo-TR DBD-LBD foi aplicado na coluna nas seguintes concentrações: 33 µM, 99 µM, 165 µM e 240 µM (1, 3, 5 e 7 mg/mL). O Rh calculado para cada fração eluída, os quais foram inferidos através do principal pico de eluição, foi de 4,2 nm, correspondente ao valor de raio de dímeros. Nas maiores concentrações protéicas (5 e 7 mg/mL – 165 e 240 µM), pode-se observar a formação de um ombro no perfil de eluição, o qual apresentou um raio calculado de 5,2 nm, correspondente a espécies tetraméricas (**Figura 23**).

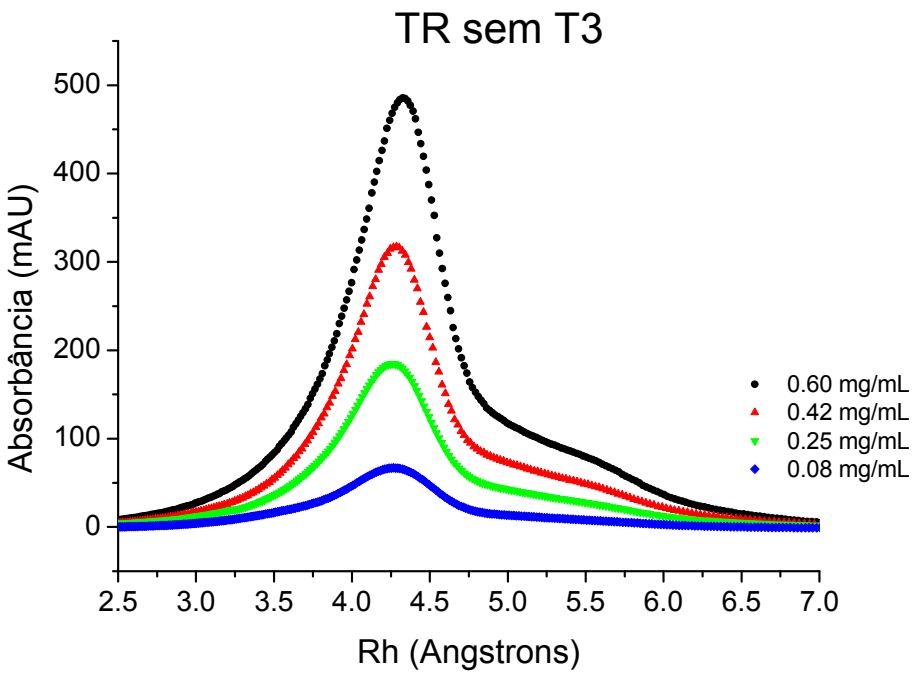


Figura 23 – Perfil cromatográfico do Apo-TR β1 DBD-LBD aplicado na superdex 200 10/30 em diversas concentrações. O raio hidrodinâmico do principal pico de eluição foi 4,2 nm (D) e o ombro correspondente aos tetrâmeros apresentou um raio de aproximadamente 5,5 nm (T).

Levando-se em conta que o fator de diluição da coluna, de cerca de 15 vezes ao da amostra aplicada, pode-se inferir que os resultados do apo-TR DBD-LBD são consistentes com a dissociação dos tetrâmeros em dímeros. As concentrações finais do receptor, após a

passagem pela coluna, que correspondem aos picos observados foram cerca de 3 µM, 8,5 µM, 14 µM e 20 µM (0,08, 0,25, 0,42 e 0,6mg/mL). Além disso, os resultados demonstraram que aumentos na concentração final do receptor, após eluir da coluna, levam ao equilíbrio das formas oligoméricas em solução.

O holo-TR β1 LBD-DBD foi aplicado na coluna nas mesmas concentrações que o apo-TR (33 µM, 99 µM, 165 µM e 240 µM – 1, 3, 5 e 7 mg/mL). Nesse caso, os volumes de eluição dos picos principais do cromatograma revelaram que a maior parte da proteína se apresenta na forma monomérica, com um Rh de 3,6 nm. Um ombro também foi observado quando a concentração de proteína foi aumentada (165 µM e 240 µM), o Rh calculado para as espécies pertencentes a esse ombro foi de 4,2 nm, o que corresponde a dímeros (**Figura 24**). As concentrações finais do receptor, após a passagem pela coluna, que correspondem aos picos observados foram cerca de 3 µM, 8,5 µM, 14 µM e 20 µM (0,08, 0,25, 0,42 e 0,6mg/mL). Esses resultados sugerem que o monômero é a forma predominante do holo-TRβ1 DBD-LBD em baixas concentrações (aproximadamente 3 µM) e que o receptor se associa em dímeros com o aumento de sua concentração na solução, acima de 14 µM.

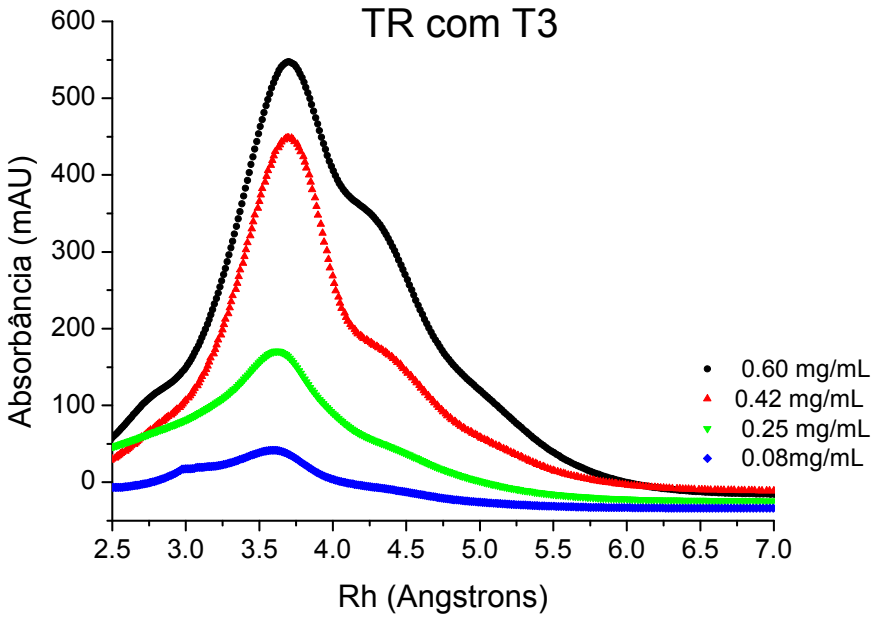


Figura 24 – perfil cromatográfico do Holo-TR β1 DBD-LBD aplicado na superdex 200 10/30 em diversas concentrações. O raio hidrodinâmico do principal pico de eluição foi 3,6 nm (M) e o ombro correspondente aos dímeros apresentou um raio de aproximadamente 4,2 nm (D).

A alteração da concentração da proteína que ocorre na gel filtração (ocasionada pela diluição da proteína na coluna) é limitada à máxima concentração aplicada na coluna. Para a caracterização do equilíbrio dímero-dímero em maiores concentrações de proteína, foram realizados experimentos de espalhamento dinâmico de luz (DLS) para o apo-TR β1 DBD-LBD e holo-TR β1 DBD-LBD, em concentrações crescentes do receptor.

Os experimentos de gel filtração e gel nativo demonstram que as espécies monoméricas estão presentes somente em baixas concentrações protéicas. A confirmação das proporções relativas das espécies diméricas e tetraméricas em solução foi realizada a partir dos experimentos de DLS, porém, não foi possível obter dados representativos de monômeros por esta técnica devido ao fato que baixas concentrações de proteínas produzem um sinal de espalhamento de luz muito fraco (**Fig. 25**).

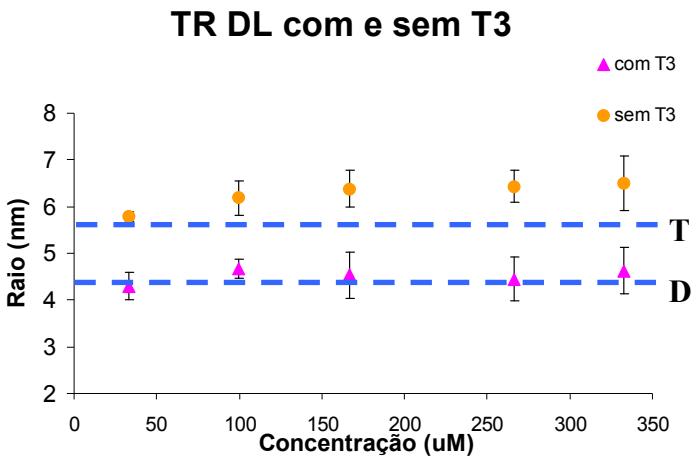


Figura 25 – Raios hidrodinâmicos do TR β1 DBD-LBD com e sem ligante, em função da concentração proteica. Os raios do holo-TR (triângulos em rosa) se apresentam como dímeros; o apo-TR (pontos em laranja) se apresenta como tetrâmeros, sendo que apenas nas maiores concentrações apresentam raios maiores (possíveis agregados). **T.** Tetrâmeros **D.** Dímeros

Os resultados de DLS sugerem que o apo-TR β1 DBD-LBD existe predominantemente como tetrâmeros em solução em concentrações acima de 20 μM. Em contraste, o complexo TR β1 DBD-LBD – T3 apresenta-se dimérico em quase todas as concentrações utilizadas no experimento. Portanto, os experimentos de DLS confirmam a idéia de que o TR β1 DBD-LBD existe em solução como uma mistura de duas formas

oligoméricas distintas, dímeros e tetrâmeros. Mais ainda, ambas as técnicas utilizadas sugerem que essas espécies existem em equilíbrio dinâmico, com a formação de tetrâmeros induzida pelo aumento da concentração protéica e fortemente inibida pela presença do ligante (**Fig. 25**).

4.4. Estudos de oligomerização do TR β1 LBD

Os estudos de oligomerização do TR β1 LBD com e sem *hinge* foram feitos para evidenciar a participação dos domínios separados no processo de oligomerização. Para tanto, foram utilizadas as técnicas de gel filtração analítica, *crosslinking* e gel nativo da construção contendo os domínios LBD e *hinge* do receptor. Os estudos da proteína sem *hinge* foram realizados apenas através da eletroforese por gel não desnaturante. Esses resultados revelaram uma grande contribuição desse domínio na tetramerização e dimerização da proteína, tanto na presença quanto na ausência do *hing*e, porém demonstraram que os oligômeros formados são menos estáveis, além de evidenciar a existência de mistura entre as formas oligoméricas. Os R_H calculados para as construções do TRβ1 LBD (ΔABC e ΔABCD), foram 2,6 nm, 3,2 nm e 4,3 nm, respectivamente para monômeros, dímeros e tetrâmeros.

4.4.1. Eletroforese por gel não desnaturante

O apo e holo TR 202 e 209 (respectivamente ΔABC e ΔABCD) foram submetidos aos experimentos de gel nativo, nas concentrações de 40 μM, 120 μM, 200 μM, 280 μM e 400 μM (1, 3, 5, 7 e 10 mg/mL), na presença e ausência do hormônio T3. O apo-TR β LBD 202 (com hinge e sem ligante) se apresenta como uma mistura de monômeros, dímeros e tetrâmeros em solução **(Fig. 26)**. Porém, o aumento das formas oligoméricas parece estar relacionado ao aumento da concentração do receptor. Na concentração mais baixa utilizada no ensaio, 1 mg/mL, observa-se somente a presença de monômeros, nas concentrações intermediárias, a banda de dímeros torna-se evidente e, somente nas concentrações mais altas

(7 e 10 mg/mL) é observado a formação da banda de tetrâmeros. Quando adicionamos ligante (T3) à proteína TR β1 LBD 202, observa-se apenas monômeros no gel nativo, sendo que somente em altas concentrações, 10mg/mL, é que observamos uma pequena banda de dímeros (**Figura 26**). Esses resultados reafirmam que o TR pode se apresentar como uma mistura de oligômeros em solução e, mais ainda, confirmam a dissociação induzida pelo ligante dessas formas oligoméricas.

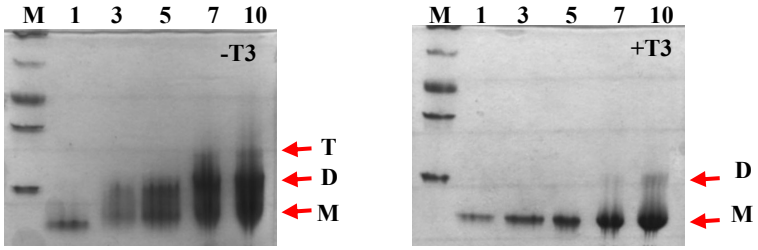


Figura 26 - Gel nativo da proteína TR LBD 202 sem ligante (-T3) e com ligante (+T3). Os marcadores de massa molecular representam a migração equivalentes a 669 kDa, 440 kDa, 232 kDa, 140 kDa e 67 kDa. As setas indicam a migração das bandas nas posições calculadas para tetrâmeros (T), dímeros (D) e monômeros (M). As concentrações de proteína usadas são 1, 3, 5, 7,e 10 mg/mL

O apo-TR β LBD 209 (sem *hing*e e sem ligante) apresenta-se também como uma mistura de monômeros e dímeros no gel nativo, em todas as concentrações. A maioria das espécies se apresenta como dímeros à medida que a concentração protéica é aumentada (**Fig. 27**). Também se observa nas concentrações protéicas mais altas aplicadas no gel, a existência de um arrasto próximo à posição prevista para o raio de tetrâmeros (aproximadamente 4,2 nm), todavia, devido à má formação de uma banda no gel nativo, torna-se impreciso afirmar se este arrasto trata-se de uma banda de tetrâmeros ou de um efeito de agregação da proteína.

O holo-TR β LBD 209 apresenta-se como monômeros em baixas concentrações, mesmo assim, uma banda bem formada e característica de dímeros começa a aparecer no gel ainda em baixas concentrações. A proteína com ligante parece estar mais estável que a holo-proteína por seu perfil no gel, em que é possível observar a presença de bandas bem definidas, ao contrário do que ocorre com a apo-proteína, com bandas borradas e mal definidas. Nesse caso, a adição do ligante parece impedir uma possível agregação do TR, tornando-o mais estável.

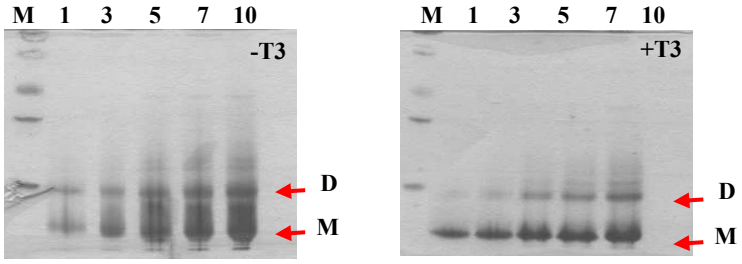


Figura 27 - Gel nativo da proteína TR 209 sem ligante (-T3) e com ligante (+T3). Os marcadores de massa molecular representam a migração equivalentes a 669 kDa, 440 kDa, 232 kDa, 140 kDa e 67 kDa. As setas indicam a migração das bandas nas posições calculadas para dímeros (D) e monômeros (M). As concentrações de proteína usadas são 1, 3, 5, 7 e 10 mg/mL.

Os raios hidrodinâmicos previstos para monômero, dímero e tetrâmero são, respectivamente, 2,6 nm, 3,4 nm e 4,1 nm, esses raios foram obtidos através do programa Hydropro. O gel empregado, no gradiente utilizado, não apresenta proporção linear entre migração e Rh (ou log MW) para proteína menores que 50 kDa. Desta forma, os valores de Rh e MW obtidos para a forma monomérica não são coincidentes com o esperado (2,6 nm), tendo sido calculado em 3,16 nm, os raios calculados para dímeros e tetrâmeros, foram, respectivamente 3,4 nm e 4,0 nm, coincidentes com o que se esperava.

4.2. Crosslinking químico.

Os resultados obtidos com o experimento do *crosslinking* confirmam os resultados obtidos pelo gel nativo. Para o apo-TR β1 LBD com *hinge*, observa-se uma mistura das três formas em solução, sendo que a forma mais predominante é a dimérica. Ao acrescentar hormônio à preparação, observa-se a ocorrência da dissociação das formas oligoméricas maiores, em contrapartida, o surgimento de monômeros e uma pequena fração composta por dímeros é observado (**Fig. 28**).

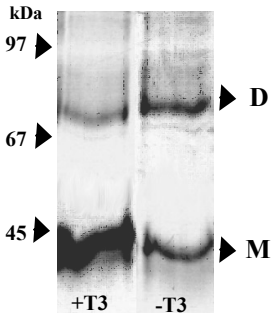


Figura 28- Crosslinking químico do holo- e apo TR β1 LBD (+T3 e –T3, respectivamente). A proteína a 1mg/ml foi *crosslinkada* com 0,05μM DSS, e aplicada em um gel SDS-PAGE, com 10% de acrilamida e coradas com Coomassie blue. D-dimero, M-Monomero, os marcadores de peso molecular estão representados na figura.

4.4.3. Gel filtração analítica

Os experimentos de gel filtração analítica também demonstram a presença de mistura de formas para o apo- TR β1 LBD com hinge (**Fig. 29 e 30**) . Considerando-se a diluição da proteína que ocorre na coluna, as concentrações finais do receptor, após a passagem pela coluna, que correspondem aos picos observados foram cerca de 3,5 µM, 10 µM, 17 µM e 24 µM (0,08, 0,25, 0,42 e 0,6mg/mL).

Os resultados do apo-TR LBD revelaram uma variação de raios hidrodinâmicos (Rh) entre 3,3 e 2,9 nm, à medida que a concentração de proteína foi reduzida de 7 para 1 mg/mL, o que significa uma mistura entre dímeros e monômeros (Rh 3,4 nm e 2,6 nm, respectivamente) em concentrações entre 3 e 24 µM, compredominãncia para dímeros.

Os raios calculados na gel filtração para o holo-TR β LBD 202 estão em torno de 2,6 a 3,05 nm, à medida que se aumenta a concentração protéica, demonstrando a predominância de monômeros, nesta mesma faixa de concentração. Esses resultados reforçam a idéia de que o domínio LBD se apresenta como uma mistura de formas oligoméricas composta por monômeros e dímeros e, mais ainda, que a presença do ligante desloca esse equilíbrio de formas para a dissociação em monômeros, maioria das espécies formadas nessa condição.

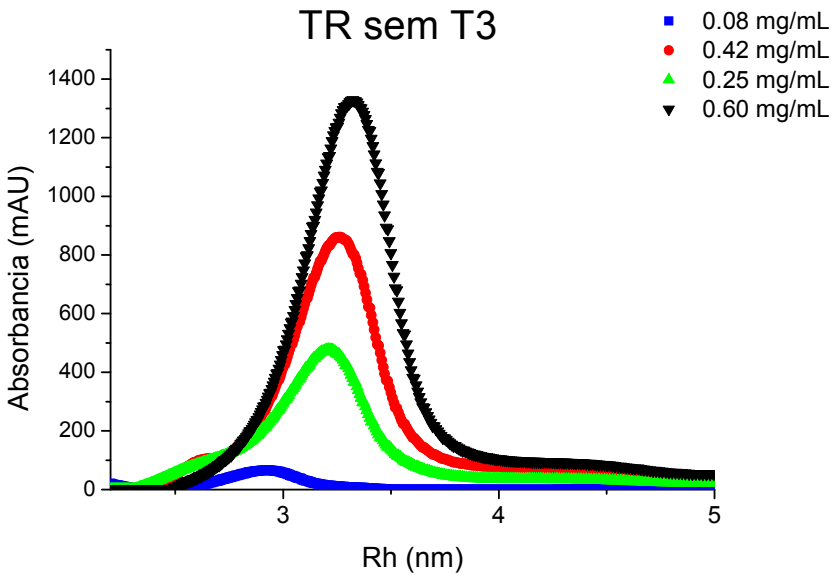


Figura 29 – Perfil cromatográfico do Apo-TR β1 LBD aplicado na superdex 75 10/30 em diversas concentrações. Os raios hidrodinâmicos dos picos de eluição variaram entre 2,9 nm (1 mg/mL) a 3,3 nm (7 mg/mL) o que corresponde a uma mistura de dímeros e monômeros, com predominância de dímeros.

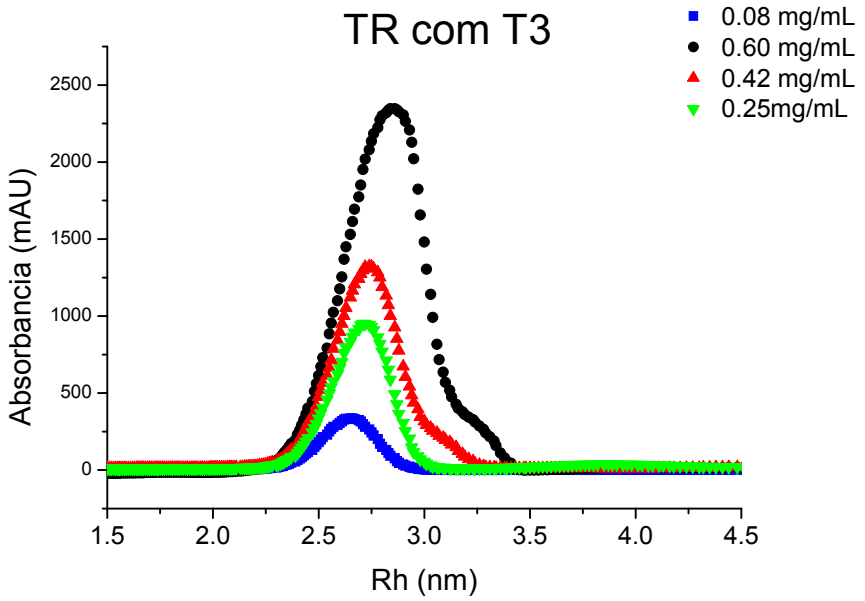


Figura 30 – Perfil cromatográfico do Holo-TR β1 LBD aplicado na superdex 75 10/30 em diversas concentrações. Os raios hidrodinâmicos dos picos de eluição variaram entre 2,6 nm (1mg/mL) a 3,05 nm (7 mg/mL) o que corresponde a uma mistura de dímeros e monômeros, com predominância de monômeros.

Estes experimentos demonstram que a dissociação de oligômeros do TR β1 LBD com *hinge*, através da adição do ligante, é coerente com a dissociação observada nos dados apresentados do TR β1 DBD-LBD, porém, as formas oligoméricas não são as mesmas. Isso talvez revele que a presença do DBD seja também importante na estabilização de oligômeros maiores que dímeros. Os estudos do TR sem *hinge* mostram que este domínio deve ser importante para a especificidade na formação dos dímeros e nas respostas ao ligante. Foi relatado que o *hinge* pode contribuir com a formação de dímeros diferenciados do TR, o que poderia influenciar na regulação do receptor. Nesse estudo, o hinge faz contatos com a interface de ligação ao coativadores. Portanto, os dímeros visualizados nos experimentos de gel nativo do TRβ1 LBD sem hinge com ligante podem ser diferentes dos dímeros funcionais[63].

4.5. Estudos de oligomerização do TR α1 completo e DBD-LBD.

Esses estudos foram realizados, inicialmente, para se caracterizar as amostras antes dos experimentos de espalhamento de raios-X a baixos ângulos, portanto foram feitos de maneira mais simplificada que os estudos de oligomerização do TR β1. Tanto o TR α1

completo, quanto o TR α1 DBD-LBD foram submetidos aos experimentos de gel nativo e espalhamento dinâmico de luz. As concentrações de proteína utilizadas para o TR α1 completo foram 1, 3 e 6 mg/mL, para o TR α1 DBD-LBD, as concentrações foram 1, 3, 8 e 11 mg/mL.

O TR α1 se comportou, preferencialmente, como dímeros em ambas as construções, tanto na presença quanto na ausência de T3. Os tetrâmeros não foram visualizados nem em concentrações mais altas. Os raios hidrodinâmicos observados nos experimentos de DLS para o TR α1 completo variaram de 4,3 a 4,7 nm, enquanto que para o TR α1 DBD-LBD, os raios variaram de 4,1 a 4,4 nm. O gel nativo do TR α completo demonstra que a proteína apresenta-se preferencialmente como dímeros e monômeros (**Fig. 31**). Estes estados oligoméricos parecem não mudar na presença e ausência de T3 ou na presença do HRE F2 (**Fig. 33**). Nas maiores concentrações dos experimentos o TR α1 completo apresenta um arrasto acima das bandas do dímero, que pode ser interpretado como um sinal de agregação ou a presença de oligômeros maiores, porém mal definidos (**Figura 31**).

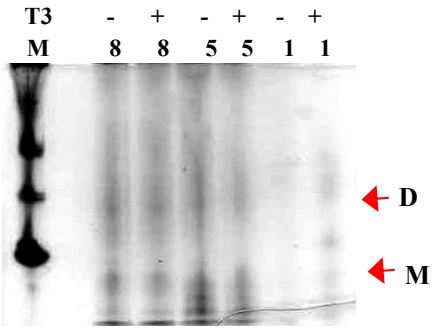


Figura 31 - Gel nativo da proteína TR α1 completo sem ligante (-) e com ligante (+). Os marcadores de massa molecular (**M**) representam a migração equivalentes a 669 kDa, 440 kDa, 232 kDa, 140 kDa e 67 kDa. As setas indicam a migração das bandas nas posições calculadas para dímeros (D) e monômeros (M). As concentrações de proteína usadas são 1, 5, e 8 mg/mL

O TR α1 DBD-LBD apresentou-se mais estável que a construção completa e também apresentou-se majoritariamente como dímeros no experimento de eletroforese nativa. A presença do T3 também não foi influente sobre a forma oligomérica desta proteína. Nas concentrações mais altas do experimento (11 mg/mL) a presença do arrasto no gel também foi detectado, o que sinaliza para a possível agregação dessa proteína (**Fig. 32**).

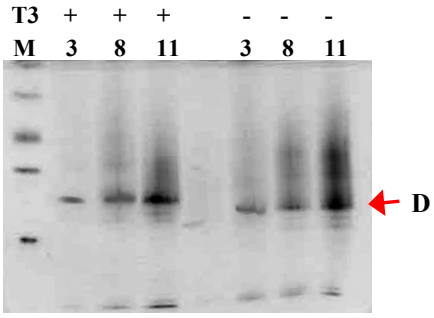


Figura 32 - Gel nativo da proteína TR α1 DBD-LBD sem ligante (-) e com ligante (+). Os marcadores de massa molecular (**M**) representam a migração equivalentes a 669 kDa, 440 kDa, 232 kDa, 140 kDa e 67 kDa. As setas indicam a migração das bandas nas posições calculadas para dímeros (D) e monômeros (M). As concentrações de proteína usadas são 3, 8 e11 mg/mL

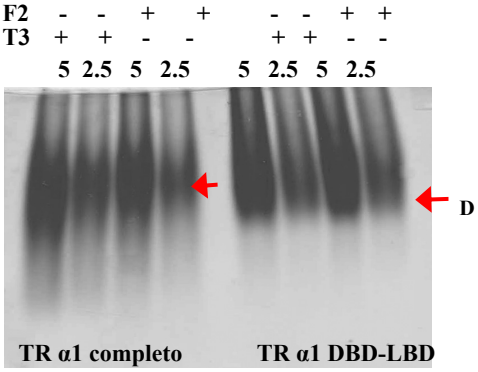


Figura 33 - Gel nativo com 10% de acrilamida, da proteína TR α1 completo e TR α1 DBD-LBD sem (-) e com (+) ligante (**T3**) ou DNA (**F2**). As setas indicam a diferença na migração entre as isoformas, o dímero do TR α1 completo é maior que o do DBD-LBD. As concentrações de proteína usadas são 2,5 e 5 mg/mL.

4.6. Discussão dos Resultados.

O estado de oligomerização de um receptor nuclear pode influenciar em sua atividade. Os TRs, assim como muitos outros receptores nucleares, desempenham suas funções como heterodímeros com o RXR, homodímeros ou monômeros. Entretanto, a forma como o TR se auto-associa em solução e a maneira como o ligante governa esse processo ainda não tinham sido estudadas sistematicamente. Nesse trabalho foi analisado os estados oligoméricos do TR β1 em solução, utilizando-se de três construções diferentes (DBD-LBD, LBD sem *hinge* e LBD com *hinge*), através das técnicas de gel filtração, gel nativo, *crosslinking* e DLS. Também se analisou duas construções do TR α1, uma da proteína completa e a outra dos domínios DBD-LBD, através de gel nativo e DLS.

Os resultados demonstraram que o TR β1 LBD-DBD apresenta-se como tetrâmeros em solução, e que a adição do hormônio T3 leva à sua dissociação em dímeros. O TR β1

LBD com *hinge,* na ausência de ligantes, apresenta-se como uma mistura de formas oligoméricas (tetrâmeros, dímeros e monômeros), as quais são concentração-dependentes. Nesse caso, a adição de ligantes também leva à dissociação das formas oligoméricas maiores em espécies menores. Esses resultados foram organizados em um artigo científico, o qual foi publicado em revista internacional (conforme apresentado no Anexo1).

A construção do TR β1 LBD sem *hinge* apresenta-se como uma mistura de monômeros e dímeros, sem distinção quanto a presença ou não de ligantes. O TR α1 apresenta-se majoritariamente em sua forma dimérica, independente da concentração protéica e da presença da região N-terminal. Além disso, a presença do ligante parece não interferir no estado de oligomerização dessa isoforma.

Esses resultados indicam que (1) o TR β1 também é capaz de se tetramerizar em solução, o que poderia resultar em uma forma de regulação semelhante à do RXR, através do auto-silenciamento; (2) a capacidade de tetramerização ocorre no domínio LBD de forma concentração-dependente. Este domínio possui as interfaces de dimerização e tetramerização, porém, a presença do DBD poderia servir para a estabilização desses oligômeros; (3) a presença do *hinge* parece ser de grande importância para a formação dos tetrâmeros do TR β1; e (4) a presença do ligante causa a dissociação dos tetrâmeros do TR β1. Além disso, pode se concluir que (5) a capacidade de tetramerização do TR está restrita à isoforma β, pois a isoforma α1 apresenta-se predominantemente dimérica; e (6) a presença do ligante T3 e do DNA não causam modificações no estado de oligomerização da isoforma α1 do receptor. Esse trabalho revela as primeiras evidências da tetramerização do TR na ausência de seu ligante cognato e que esta propriedade não é restrita ao RXR, e, mais ainda, demonstra que a capacidade de tetramerização pode ser isoforma específica.

O comportamento do TR β1 em solução contrasta com o comportamento de uma construção similar de outro receptor o RAR, o qual também forma heterodímeros com o RXR. Este receptor não forma dímeros nem tetrâmeros em solução e existe estritamente como

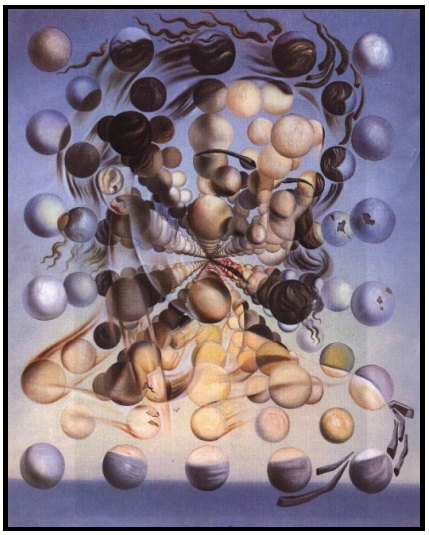
monômero[142]. Assim como o RXR, o TR possui a capacidade de formar oligômeros em solução, e estas espécies estão em um equilíbrio dinâmico, dependente da concentração do receptor. Os monômeros do TR só são detectáveis a baixas concentrações, enquanto que os tetrâmeros tendem a ser predominantes nas altas concentrações de proteínas, contudo, o equilíbrio entre as espécies é reversível.

Os tetrâmeros são as formas predominantes do apo-TR β em concentrações acima de 10 μM (**Fig. 21**). Entretanto, eles podem se dissociar rapidamente após a adição do ligante. A aplicação dos tetrâmeros e dímeros na coluna de gel filtração – a qual resulta em uma diluição da proteína em torno de quinze vezes – resulta em uma mistura de formas oligoméricas menores nas frações eluídas, o que pode explicar a dependência da concentração na formação dos oligômeros. Os tetrâmeros e dímeros podem se dissociar rapidamente em dímeros e monômeros, respectivamente, enquanto passam pela coluna. Assim como o RXR, o equilíbrio entre as formas oligoméricas do TR pode ser fortemente influenciado pelo ligante, promovendo a dissociação deste em dímeros. Essa informação, aliada às previamente expostas sugere que a formação de tetrâmeros de RXR e TR podem envolver mecanismos similares. Já a forma predominante do TR α1 é a dimérica independente da presença de ligantes ou DNA (**Fig 32**), o que poderia evidenciar uma forma de regulação diferente entre as isoformas de um mesmo receptor.

Enquanto o apo-RXR interage fracamente com correpressores, o apo-TRβ possui interações bastante fortes com essas moléculas. Portanto, não se sabe qual a fração do apo-TRβ poderia ser disponível para a formação de homotetrâmeros, sob condições típicas, e se esse processo seria de grande importância na regulação da ação dos TRs. Entretanto, é sabido que fatores de transcrição são freqüentemente seqüestrados em pequenas sub-regiões do núcleo, ou concentrados como multímeros em sítios de promotores alvos no DNA. Com base nesses eventos, a concentração de TR no núcleo celular poderia ser elevada, contribuindo com a formação dos tetrâmeros.

Além da formação dos tetrâmeros, esse trabalho também reporta os efeitos do ligante T3, o qual inibe também a formação de dímeros em algumas condições. Conforme demonstrado nos experimentos de gel filtração, o apo-TRβ em baixas concentrações está presente em solução, majoritariamente, como dímero (Rh 4,2 nm), enquanto o holo-TR é predominantemente monomérico sob as mesmas condições (**Fig. 24**). O T3 promove a dissociação dos homodímeros TRβ-TRβ dos elementos responsivos de DNA, entretanto as bases moleculares que explicam esse fato ainda não são claras. Seria interessante especular se este efeito está relacionado com alterações no equilíbrio monômero-dímero de maneira hormônio-dependente (ou independente). Com isso, seria possível investigar a possibilidade do ligante influenciar na atividade de ligação TR-DNA, através de efeitos diretos na conformação da superfície de dimerização do LBD do TR.

A tetramerização é um evento freqüente na regulação do reconhecimento proteína-DNA e na regulação da transcrição[143, 144, 145]. Em vista das evidências encontradas para a formação de tetrâmeros dos receptores TR e RXR humanos, seria interessante o questionamento se a auto-associação em tetrâmeros poderia representar um nível geral de regulação celular, sinalizada pelos receptores nucleares. A auto-montagem dos receptores nucleares em formas tetraméricas inativas dentro da célula poderia contribuir para o acúmulo e estoque desses receptores, os quais poderiam ser facilmente disponíveis para a ativação na presença de um ligante ou DNA específico ou, até mesmo, pela queda na concentração desses receptores.



Capítulo 5 – Estudos Estruturais em Baixa Resolução do TR Através de SAXS

5.1. Introdução.

Os estudos apresentados nesse capítulo objetivaram, principalmente, a construção dos envelopes moleculares dos receptores, visando estudos estruturais. Além disso, esses experimentos contribuíram com os estudos de oligomerização do receptor. Os experimentos de SAXS foram realizados com as duas isoformas do TR, α1 e β1, em diversas construções – TR α1 completo e DBD-LBD, na presença e ausência do hormônio T3; e TR β1 DBD-LBD na presença e ausência do hormônio T3 e na presença do TRE F2. Todas as amostras

submetidas aos experimentos de SAXS foram checadas, em termos de monodispersividade e agregação, por experimentos preliminares de gel nativo e DLS, apresentando boas características. Uma parte do trabalho apresentado nesse capítulo, que contém os envelopes dos dímeros e tetrâmeros do TR β1 DBD-LBD, foi publicada[146] na revista indexada internacional *biochemistry* (**Anexo1**) e indicada pela mesma como *hot article.*

As estruturas obtidas através de cristalografia de proteínas do TR DBD e do holo-TR LBD, juntamente com as estruturas obtidas para outros receptores nucleares, resultaram em informações importantes sobre a ação dos RNs e do TR[64, 117, 137, 147]. A estrutura do TR DBD confirmou a ocupação 3´ no DNA DR-4 do TR, no heterodímero formado com o RXR, além de fornecer os detalhes moleculares acerca da interação TR-DNA[138]. As estruturas do TR LBD, além das interações TR-ligantes, sugeriram grandes mudanças conformacionais geradas pela ligação de diferentes ligantes[2]. Por fim, as estruturas de ambos os domínios revelaram que muitos aminoácidos, que originalmente foram identificados como formadores do domínio D (*hinge*) estão estruturados em uma extensão em α-hélice entre os domínios DBD e LBD[34, 38].

As análises reportadas sobre o comportamento do TR β1 em solução demonstram uma maior complexidade desse receptor. O RXR era considerado como o único receptor capaz de formar homotetrâmeros em solução, porém os estudos com o TR β1 demonstraram que esse receptor também é capaz de formar tetrâmeros em solução, os quais podem ser dissociados pela incubação com o ligante ou com TREs[59, 148.]

Nenhuma estrutura de alta resolução dos TRs ou outro receptor nuclear em uma construção maior (por exemplo, um receptor completo ou contendo os domínios DBD-LBD) foi resolvida. Até o momento, a única estrutura em baixa resolução de uma construção maior de um receptor nuclear foi resolvida para o RXR LBD-DBD, através da técnica de SAXS[140]. Essa ferramenta revela a estrutura de macromoléculas em solução, em resolução nanométrica,

e pode ser usada para a determinação de posições e orientações de domínios individuais. Portanto, demonstra um modelo da estrutura do receptor.

Nesse trabalho serão apresentados estudos extensivos de SAXS utilizando-se diversas construções do TR. Os dados revelam o primeiro modelo de estrutura a baixa resolução de dímeros e tetrâmeros do TR β1 DBD-LBD, além de revelarem o primeiro modelo estrutural de uma construção completa do TR α1. Foi observado que, apesar de existirem fortes semelhanças entre o TR e o RXR, os modelos também demonstram diferenças bastante claras. Os modelos de SAXS dos tetrâmeros do RXR DBD-LBD possuem uma forma em X, com os 4 domínios DBD fortemente espaçados e separados do cerne formado pelos LBDs[140]. Os dímeros do RXR DBD-LBD apresentam uma estrutura mais similar que a encontrada para o TR (**Fig. 34**).

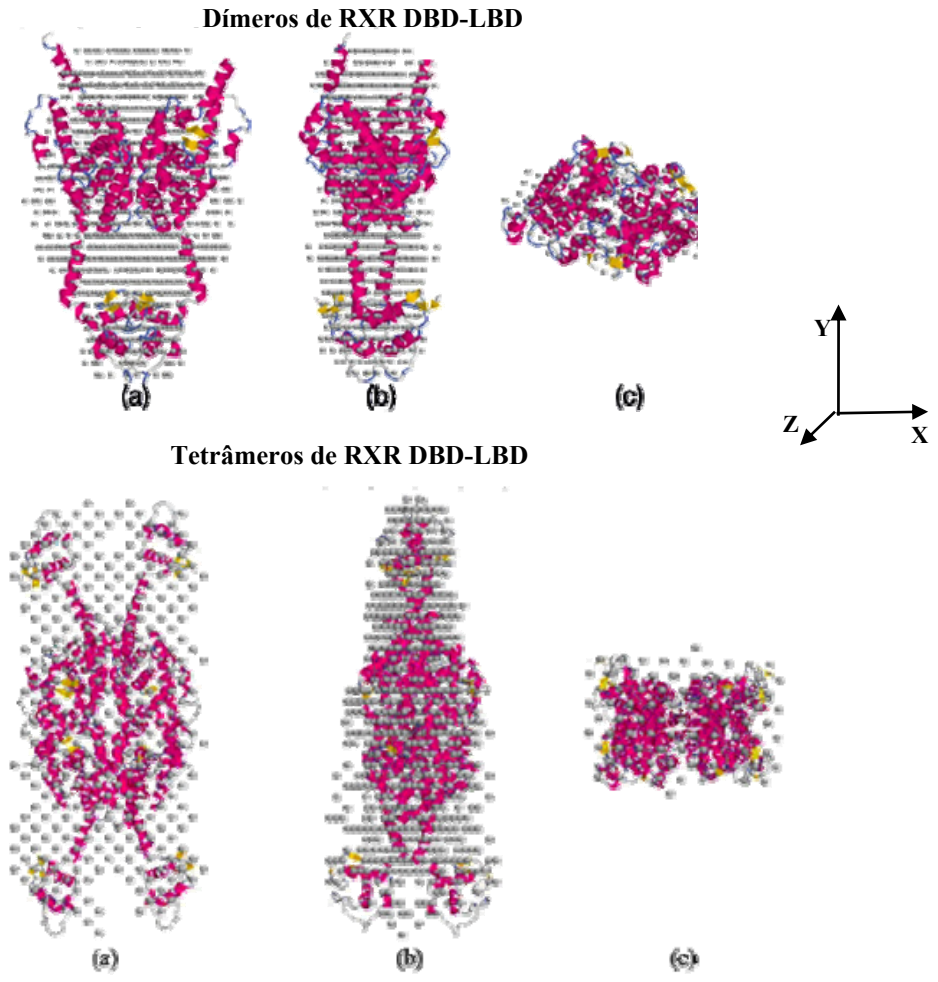


Figura 34 - Modelos de baixa resolução de dímeros e tetrâmeros do RXR DBD-LBD, obtidos por SAXS. (a), (b) e (c) São as representações das visões ortoscópicas dos modelos, 140.

5.2. Resultados

5.2.1. Espalhamento de raios-X a baixos ângulos do TR β1

5.2.1.1. O TR β1 DBD-LBD com e sem ligante

Os resultados de SAXS para o TR β1 DBD-LBD confirmam os resultados dos estudos de oligomerização (capítulo 4). As preparações do TR β1 LBD-DBD com e sem ligante, em uma escala de diferentes concentrações, resultaram em envelopes diméricos e tetraméricos do receptor. As curvas de espalhamento típicas obtidas do receptor estão representadas na **figura 35**, e os parâmetro estruturais derivados de cada curva estão representados na **Tabela 2**.

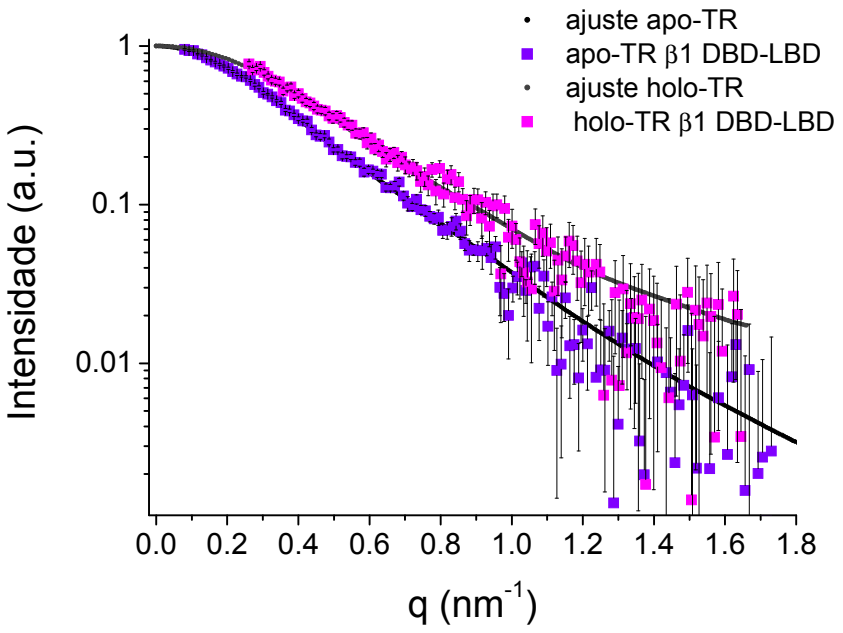


Figura 35- Curvas experimentais de espalhamento de apo e holo TR β1 DBD-LBD. Curvas de Intensidade de espalhamento log I *versus q* do Holo-TR β1 DBD-LBD e do Apo-TR β1 DBD-LBD normalizadas por um fator de escala de intensidade, dado que essas curvas representam medidas realizadas em dias diferentes. Holo-TR β1 DBD-LBD e Apo-TR β1 DBD-LBD representam as curvas experimentais; sobre essas curvas estão ajustadas as intensidades de espalhamento teóricas calculadas através do programa GNOM.

Os dados indicam que a distância máxima intra-partículas (D_{max}) e o raio de giro (Rg) do apo-TR β1 DBD-LBD são, respectivamente, 18 nm e 4,9 nm, enquanto o holo-TR β1 DBD-LBD formam espécies com D_{max} de 12 nm e Rg de 3,8 nm. Esses resultados confirmam a presença de dímeros do holo-TR e tetrâmeros do apo-TR e estão de acordo com dados obtidos por DLS (onde $Rg^{tetrâmero}$ = 4,6 nm e $Rg^{dímero}$ = 3,5 nm), e também sugerem que ambas as espécies são relativamente alongadas. Isso também pode ser evidenciado pelas máximas

distâncias intra-partícula calculadas para os dímeros e tetrâmeros do TR β1 DBD-LBD, as quais são 3 a 4 vezes maiores que o Rg dos oligômeros do receptor. Essa idéia de um receptor mais alongado também pode ser suportada pelos perfis de distribuição de distâncias (p(r)) calculados (**Fig. 36**), os quais são típicos de proteínas alongadas [149].

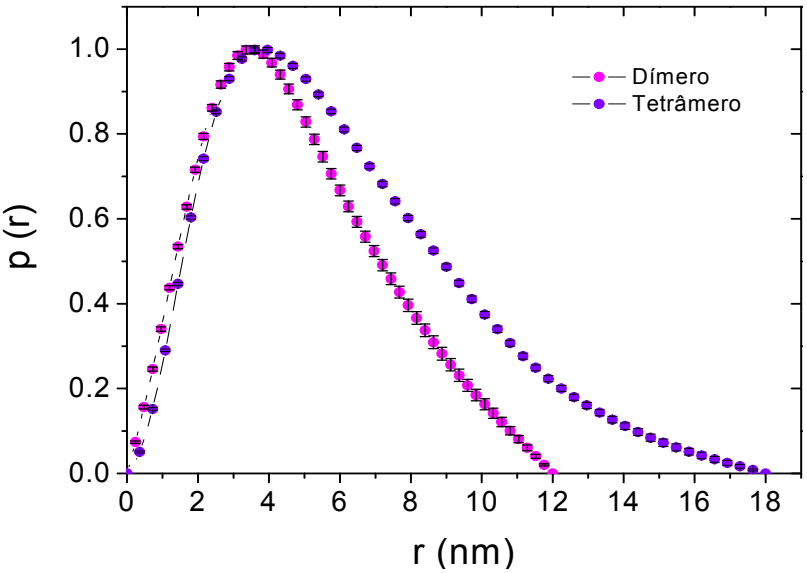


Figura 36 – Função de distribuição de distâncias dos dímeros (rosa) e tetrâmeros (violeta) do hTR β1 DBD-LBD.

Para a geração do modelo, o volume de esferas encontrado para o dímero foi estabelecido, em número de átomos DAM, em N_{DAM} = 6603, com um raio de empacotamento de r_a= 0,29 nm em uma esfera de diâmetro D_{max} = 12,0nm. Para o tetrâmero, N_{DAM} = 7376, r_a= 0,42 nm e D_{max}= 18,0 nm. Vinte simulações *ab* initio independentes foram executadas. Delas, 182±10 átomos dummy foram atribuídas ao modelo final do dímero hTR β1 DBD-LBD, e 590±30 átomos dummy foram designadas para o modelo final dos tetrâmeros hTRβ1DBD-LBD. Essa diferença no número de átomos dummy entre o dímero e o tetrâmero pode ser atribuída à diferença de informação presente em cada uma das curvas, sendo que a curva do apo-TR, correspondente aos tetrâmeros, possui maior quantidade de informação, em comparação à curva do dímero (holo-TR), e por isso foi atribuído um número maior de átomos dummy para o tetrâmero. Além disso, os tetrâmeros apresentam um maior valor de $D_{max,}$ o que também contribui para essa diferença.

Os envelopes globais do TR β1 DBD-LBD com e sem ligantes foram determinados *ab initio* através de dois procedimentos independentes e estão representados nas **figuras 37** e **38**. Ambas as reconstruções *ab initio* resultaram em formas moleculares semelhantes. O holo-TR β1 DBD-LBD possui uma estrutura terciária em formato mais achatado e globular que o apo-TR β1 DBD-LBD (**Fig. 37**), enquanto o formato do apo-TR β1 DBD-LBD apresenta-se mais cilíndrico ou prolato (**Fig. 38**). Os tetrâmeros do TR são significantemente mais alongados que os dímeros, o que é consistente com sua massa molecular, porém não acomoda dois dímeros do holo-TR em um arranjo cabeça-cabeça. Isso sugere que deve haver alterações significantes nas posições respectivas do DBD e do LBD nos arranjos em dímeros e tetrâmeros.

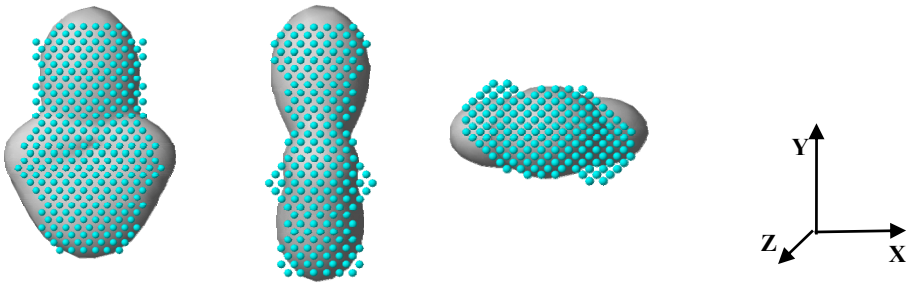


Figura 37- Três vistas ortogonais do envelope de SAXS dos dímeros do holo-TR β1 DBD-LBD derivado de cálculos *ab initio*. Os envelopes moleculares foram obtidos por expansões de harmônios esféricos (SASHA) e estão representados pela superfície sólida em cinza, os modelos de átomos Dummy, obtidos pelo programa DAMMIN, estão representados pelas esferas em ciano, figura em escala com a **Fig. 38**.

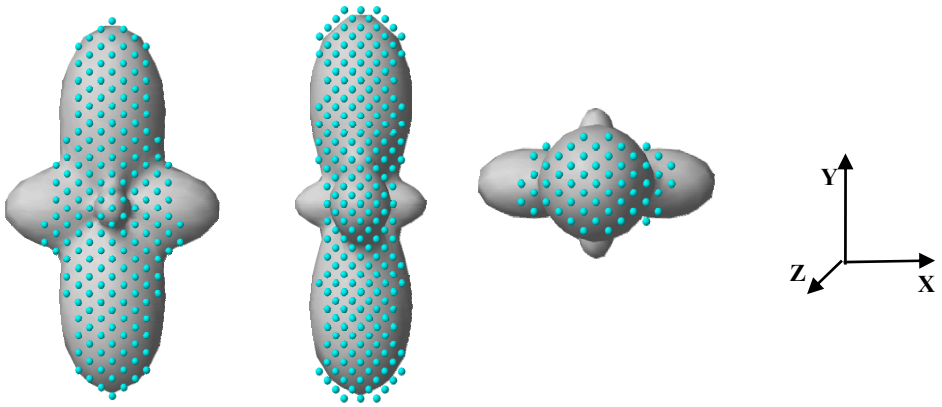


Figura 38- Três vistas ortogonais do envelope de SAXS dos tetrâmeros do apo-TR β1 DBD-LBD derivado de cálculos *ab initio*. Os envelopes moleculares foram obtidos por expansões de harmônios esféricos (SASHA) e estão representados pela superfície sólida em cinza, os modelos de átomos Dummy, obtidos pelo programa DAMMIN, estão representados pelas esferas em ciano, figura em escala com a **Fig. 37**.

Para a determinação das posições e orientações relativas dos TR β1 DBDs e LBDs no envelope de baixa resolução do TRβ1 DBD-LBD dimérico, foi criado um modelo estrutural

dos dímeros de TR baseado nas estruturas cristalográficas desses domínios e analisando-se o melhor ajuste destes modelos sobre o envelope molecular. De acordo com as estruturas *ab initio* a baixa resolução, foi assumido uma simetria de ordem 2 nos modelos dos dímeros, ao longo do eixo maior do modelo, passando através do centro do envelope. A seqüência correspondente ao domínio D, a qual liga os domínios DBD e LBD, foi modelada, pelo programa Modeller, como uma α-hélice.

Tabela 2- Parâmetros experimentais e calculados para os dados de SAXS

Parâmetro/ amostra	hTRβ-1 DBD LBD dímero[d]			hTRβ-1 DBD LBD tetrâmero[e]		
	Exp.[a]	Mod.[b]	DAM[c]	Exp.[a]	Mod.[b]	DAM[c]
Dmax (nm)	12,0 ± 1,00	12,80	12,10	18,0 ± 1,00	18,61	17,84
Rg (nm)	3,79 ± 0,50	3,82	3,66	4,97 ± 0,50	4,96	4,84
Discrepância χ	-	0,9	0,9	-	1,2	1,1
Resolução (nm)	3,8	-	3,8	3,5	-	3,5

a Exp., calculado dos dados experimentais. *b* Mod., parâmetros dos modelos de dímeros e tetrâmeros. *c* DAM, parâmetros dos modelos de átomos dummys, após 10 modelos. d Simetria imposta de ordem 2. *e* Simetria imposta de ordem 222.

O melhor ajuste para o modelo do TR β1 DBD-LBD, superposto sobre o envelope prolato do dímero está evidenciado na **figura 39**. Os LBDs se encontram na base maior do envelope e ocupam um volume consistente com as interações preditas para um homodímero simétrico em arranjo cauda-cauda, mediado pela interface de dimerização formada pelas hélices 10 e 11 do LBD. As análises dos melhores ajustes do DBDs indicam que eles estão localizados no extremo oposto do envelope, afastados dos LBDs. O domínio D, que liga esses dois domínios, precisa estar relativamente estendido; a separação entre o DBD e LBD é consistente com a noção que o domínio D forma uma hélice contínua, análoga ao modelo estrutural e sugerida pelos modelos cristalográficos dos domínios DBD e LBD em separado. Os DBDs estão em contato próximo, o que levanta a possibilidade de que possam envolver-se em contatos intermoleculates até então inesperados.

A posição dos modelos estruturais do DBD no envelope molecular sugere que o melhor ajuste se dá para a orientação cauda-cauda, compatível com a ligação a TREs em

palíndromos invertidos, arranjo de DNA preferencial para homodímeros do TR[2]. A resolução do envelope molecular (~3,5 nm, Tabela 2) não é suficiente para a distinção direta entre as posições relativas do DBD, entretanto, foi observado que os domínios D se sobrepõem na orientação cauda-cauda (palíndromo invertido) e que esses contatos moleculares não ocorrem na orientação cabeça-cabeça (palíndromo), resultando em um dímero mais fraco. Portanto, a melhor predição para o modelo de baixa resolução sugere que o homodímero DBD-LBD adote uma conformação com os DBDs posicionados para a ligação a palíndromos invertidos e que os contatos intermoleculares entre os DBDs e os domínios D contribuam para a formação do homodímero.

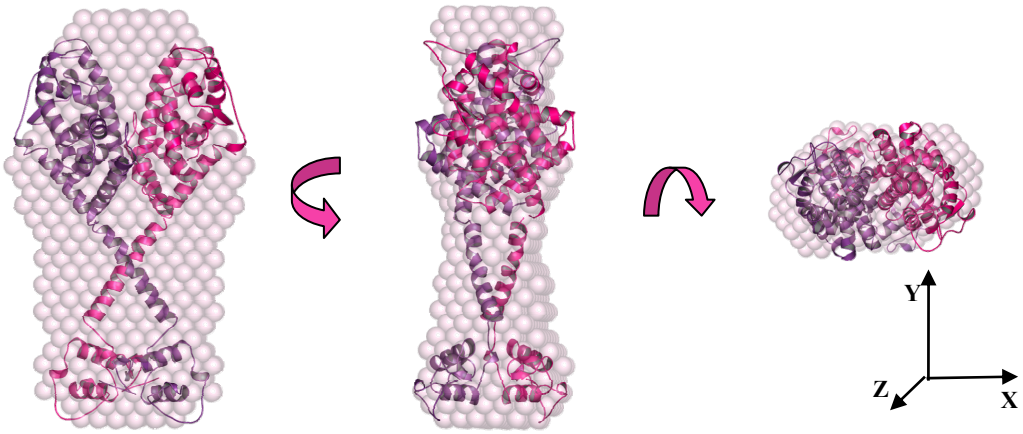


Figura 39- Envelopes dos dímeros de hTR β1 DBD-LBD derivados do calculo *ab initio*. Superposição da média de 20 modelos DAMs obtidos pelo DAMMIN e do modelo gerado a partir das estruturas obtidas por cristalografia de raios X de dois hTR β1 DBDs e dois hTR β1 LBDs. Os modelos foram rotacionados a 90° em torno do eixo y e x.

No envelope dos tetrâmeros do apo-TR o melhor ajuste para o posicionamento dos LBDs ocorrem no centro da molécula de forma que relembra os dados publicados para os tetrâmeros do RXR. Nesse modelo, os dois pares de LBDs estão empilhados e orientados em um ângulo de 180°, um em relação ao outro. Os pares de DBDs partem do cerne formado pelos LBDs em direções opostas, de tal forma que o tetrâmero predito relembre um cilíndro distorcido (**Fig. 40**). Assim como ocorre nos homodímeros do TR, os dois DBDs, que formam cada um dos pares do cilindro, se localizam nas extremidades em contato próximo de um com o outro. Esta organização difere das estruturas a baixas resoluções encontradas para o tetrâmero do RXR, o qual possui um formato em X com os DBDs bastante espaçados[140], e

representa uma evidência a mais que os DBDs podem interagir em contatos moleculares únicos.

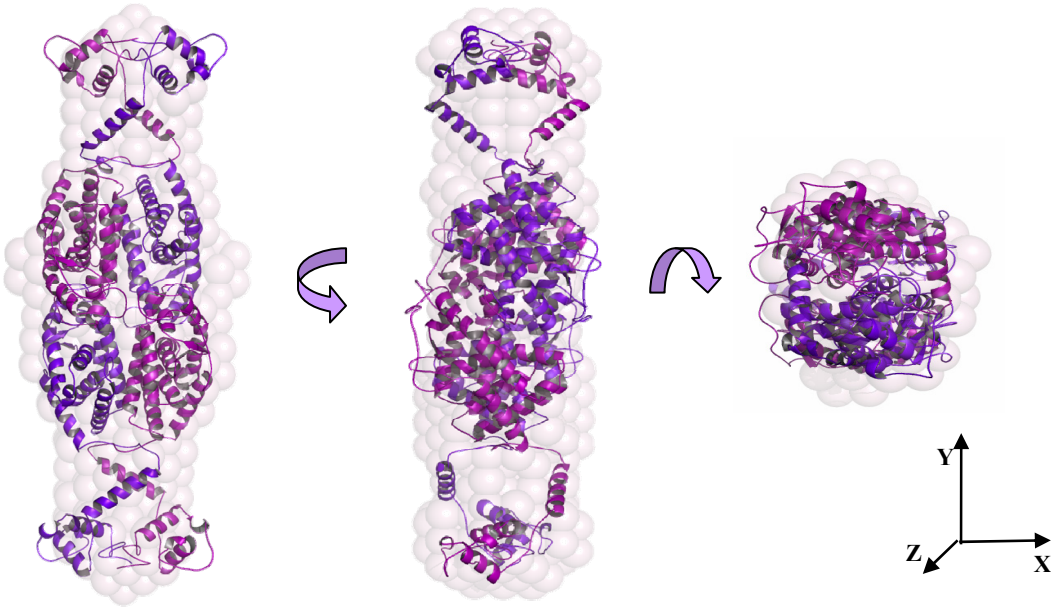


Figura 40- Envelopes dos tetrâmeros de hTR β1 DBD-LBD derivados de calculus *ab initio***.** Superposição da media de 10 DAMs obtidos pelo DAMMIN e domodelo gerado a partir das estruturas obtidas por raios X de quatro hTR β DBDs e quatro hTR β1 LBDs. Os modelos foram rotacionados a 90° em torno do eixo y e x.

5.2.1.2. O TR β1 DBD-LBD com o elemento responsivo F2.

Os experimentos de SAXS realizados para o TR β1 DBD-LBD, na presença do TRE F2 foram realizados em 3 concentrações de proteína, 3, 5 e 8 mg/mL. Para todas as medidas, os envelopes gerados confirmam a estrutura dimérica do receptor, quando ligado ao DNA. A curva do espalhamento do receptor está representada na **figura 41** e os parâmetros estruturais derivados do espalhamento estão representados na **Tabela 3.**

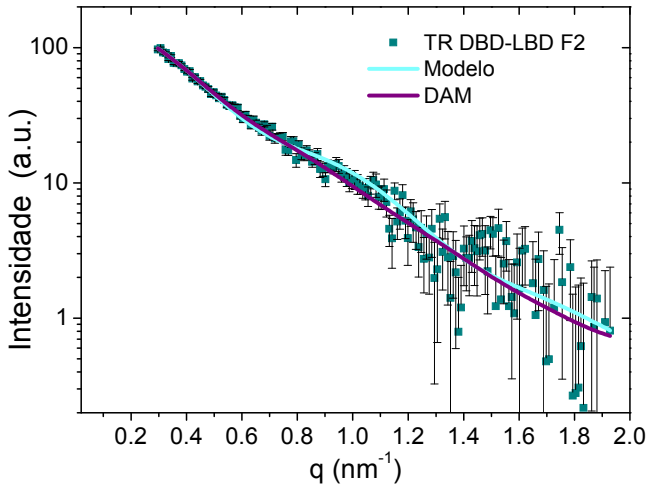


Figura 41- Curva experimental de espalhamento do TR β1 DBD-LBD complexado ao TRE F2. Intensidade de espalhamento LBD, normalizada por um fator de escala de intensidade, (log I) *versus q*. TR DBD-LBD F2 representa a curva experimental; DAM é a curva da intensidade de espalhamento calculado a partir do modelo DAMs, gerado pelo programa DAMMIN; e Modelo é a curva relativa ao espalhamento do modelo de alta resolução.

Os valores experimentais de D_{max} e Rg foram 13,5 nm e 4,25 nm, isso sugere que a proteína também possui uma forma alongada. Comparando-se esses dados aos resultados de SAXS dos dímeros do holo-TR β1, foi possível observar poucas diferenças. As curvas do TR β1 DBD-LBD com DNA apresentam um perfil de uma molécula um pouco maior (D_{max} e Rg para TR+T3 são 12 e 3,8 nm), porém dimérica e alongada. Os perfis das funções de distribuição de distâncias também foram típicos para moléculas alongadas e, quando comparado ao dímero do holo-TR β1, apresenta o perfil de uma molécula maior (**Fig. 42**).

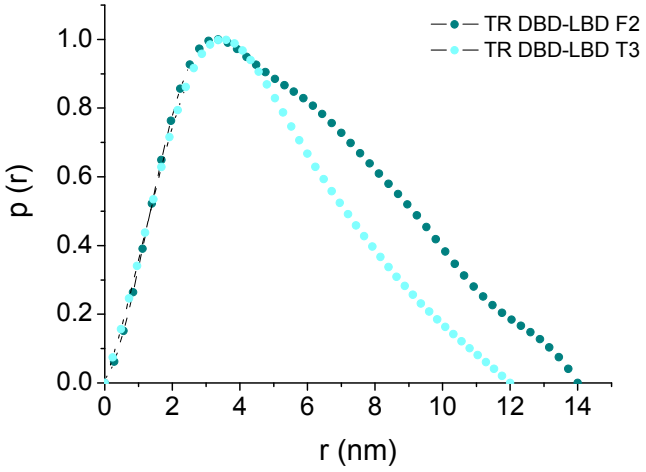


Figura 42 – Curvas de distribuição de distancias do o TR β1 DBD-LBD complexado ao elemento responsivo F2 e dos dímeros do holo-TR β1 DBD-LBD. Pode-se observar que o perfil da curva é típico de moléculas alongadas e que o holo-TR é menor que o TR com DNA.

O volume encontrado para o dímero foi calculado, em número de átomos DAM, em N_{DAM} = 6856, com um raio de empacotamento de r_a = 0,30 nm em uma esfera de diâmetro D_{max} = 13,50 nm. Foram executadas dez simulações *ab* initio independentes e, dessas, 154±16 átomos dummy foram atribuídas ao modelo final do dímero hTR β1 DBD-LBD com F2. Os envelopes globais da proteína foram determinados *ab initio*, de acordo com o que foi descrito para o apo- e holo- TR β1 DBD-LBD, resultando em formas semelhantes. O envelope do TR β1 DBD-LBD com F2 apresentou-se bastante parecido com o do dímero encontrado para o holo-TR β1 DBD-LBD, porém um pouco maior.

Para se fazer o modelo de alta resolução, os conjuntos de coordenadas dos domínios separados do hTRβ1 DBD e LBD foram obtidas do banco de dados de proteínas (PDB ID

2NLL[58] e 2H6W[63]). Os dímeros foram gerados pela imposição de simetria de ordem 2 no programa superpose do pacote CCP4[115]. O modelo de DNA foi gerado pelo programa 3DNA[150]. Os oligômeros foram ajustados manualmente, evitando-se impedimentos estéricos. As posições relativas dos domínios DBD foram encontradas pela sobreposição dos domínios do DBD do TR sobre a estrutura cristalográfica do ER DBD (PBD ID 1HCQ[151]), o qual possui a orientação de palíndromo, após isso, fez-se uma operação de translação nos domínios para chegar à orientação de palíndromo invertido do elemento responsivo do F2. Os modelos de alta resolução foram ajustados nos envelopes através do programa MASSHA. Rg, distâncias máximas intrapartículas (D_{max}), funções dos envelopes e curvas de espalhamento foram calculadas a partir das coordenadas atômicas através do programa CRYSOL, levando-se em conta a influência da camada de hidratação.

Tabela 3 - Parâmetros experimentais e calculados para os dados de SAXS

Parâmetro/ amostra	hTRβ-1 DBD LBD F2 dímero		
	Exp.[a]	Mod.[b]	DAM[c]
Dmax (nm)	13,5 ± 1,00	12,93	13,56
Rg (nm)	4,25 ± 0,40	3,85	3,97
Discrepância χ	-	1,19	1,07
Resolução (nm)	3,25	-	3,25

a Exp., calculado dos dados experimentais. *b* Mod., parâmetros dos modelos de dímeros. *c* DAM, parâmetros dos modelos de átomos dummys , após 10 modelos.

O melhor ajuste para o modelo do TR β1 DBD-LBD superposto sobre o envelope está evidenciado na **figura 43.** Os DBDs apresentam uma torção em relação aos LBDs, diferentemente do dímero do holo-TR β1, de maneira que o DNA fique rotacionado cerca de 90° em relação ao plano dos LBDs. Para o melhor ajuste ao modelo de dímero, os DBD foram posicionados ao longo dos DNA, isso faz com que o *hinge* (Domínio D) adote em uma conformação estendida, um de cada lado da molécula de F2. Essa orientação para o *hinge* promove um melhor espaçamento para rearranjos na proteína, para a ligação com os HREs.

Esses dados, apesar de fornecerem uma idéia da estrutura da proteína, ainda são preliminares e devem ser repetidos até que o envelope e as características do modelo sejam melhorados.

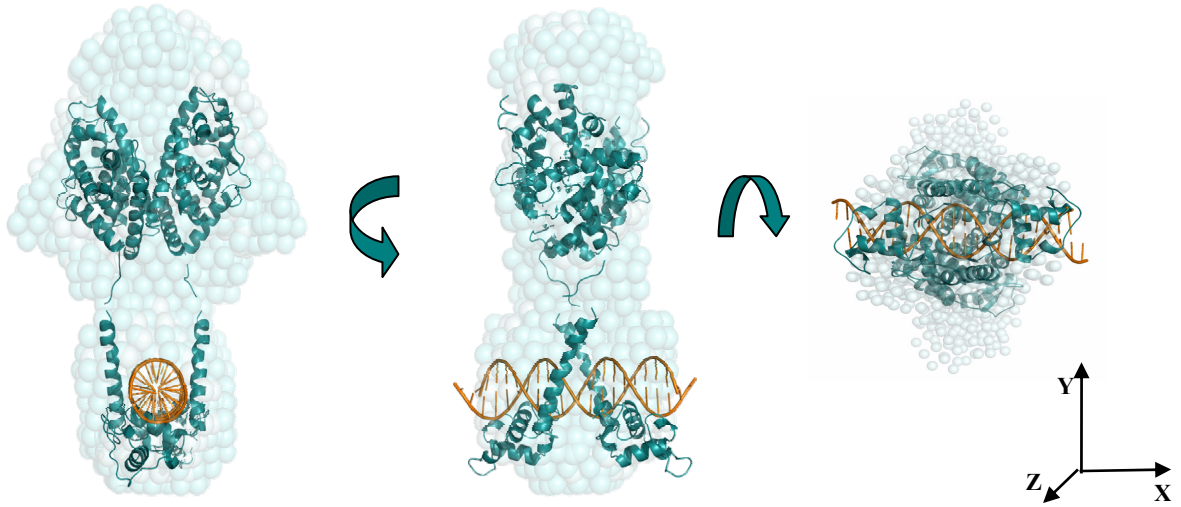


Figura 43 - Envelopes dos dímeros de hTR β1 DBD-LBD com F2 derivados de calculo *ab initio***.** Superposição da media de 10 DAMs obtidos pelo DAMMIN e das estruturas obtidas por raios-x de dois hTR β DBDs e dois hTR β1 LBDs. Os modelos foram rotacionados a 90° em torno do eixo y e x.

5.2.2. Espalhamento de raios-x a baixos ângulos do TR α1

5.2.2.1. O TR α1 DBD-LBD com e sem ligante.

O TR α1 DBD-LBD apresentou-se predominantemente dimérico, tanto na presença quanto na ausência de T3, confirmando os resultados obtidos por gel nativo e DLS (capítulo 4). Os experimentos de SAXS foram realizados a 3 e 8 mg/mL. As curvas do TR α1 DBD-LBD com e sem ligante praticamente não apresentaram diferenças, demonstrando que o ligante não deve provocar grandes mudanças estruturais que modifiquem o envelope da proteína (**Fig 45**).

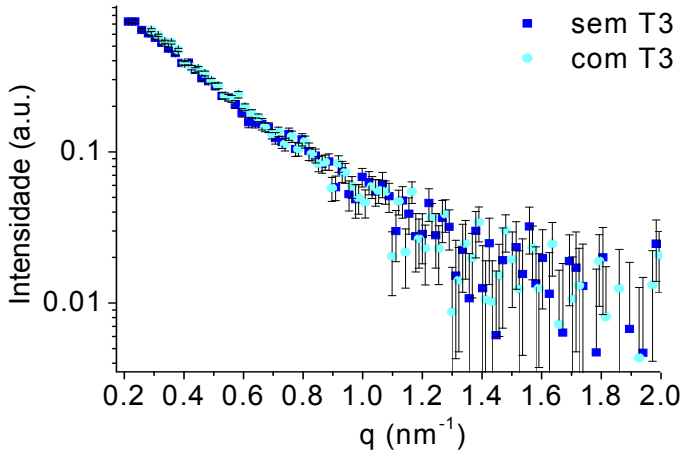


Figura 45 – Curvas da intensidade de espalhamento do TR α1 DBD-LBD na presença e ausência de T3 *versus* q, demonstrando as semelhanças entre o espalhamento da proteínas em duas preparações diferentes.

Dada a semelhança no padrão de espalhamento das duas preparações do TR α1, os melhores modelos foram calculados a partir da curva do TR α1 com ligante à 8 mg/mL, por apresentar melhores parâmetros estatísticos. A curva de espalhamento do receptor está apresentada na **figura 46** e os parâmetros estruturais derivados do espalhamento estão representados na **tabela 4**.

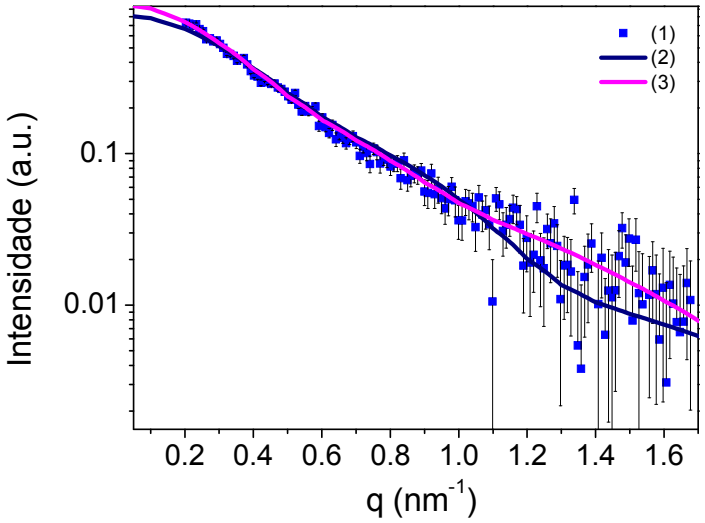


Figura 46- Curva experimental de espalhamento do TR α1 DBD-LBD com ligante. Intensidade de espalhamento (log I), normalizada por um fator de escala de intensidade, *versus q*. (*1*) representa a curva experimental; (2) é a curva da intensidade de espalhamento calculado a partir do modelo DAMs, gerado pelo programa DAMMIN; e (3) é a curva relativa ao espalhamento do modelo de alta resolução.

A determinação dos valores experimentais D_{max} e Rg resultou nos valores 13 nm e 4,2 nm para o TR α1 DBD-LBD ligado ou não ao T3, isso sugere que a proteína, em ambos os casos, é alongada. Esses dímeros possuem um formato alongado, assim como o TR β1 DBD-LBD, e isso pode ser confirmado através do perfil da função de distribuição de distâncias, típico para moléculas alongadas (**Fig. 47**).

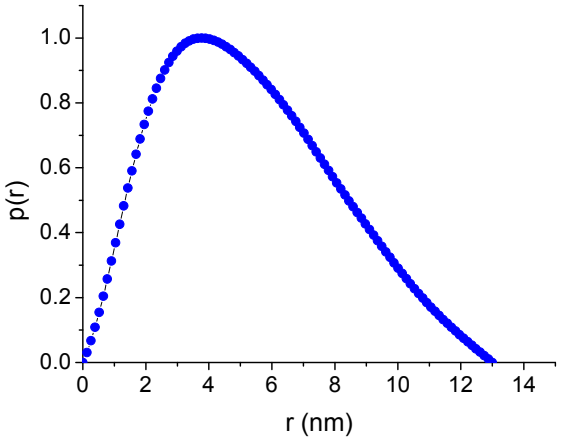


Figura 47 - Curva de distribuição de distâncias de hTR α1 DBD-LBD, a 8 mg/ml, na presença de ligante.

O volume do dímero, em número de átomos DAM, encontrado foi N_{DAM}=6339, com um raio de empacotamento r_a= 0,32 nm, em uma esfera de diâmetro de 13,0 nm. Para a geração dos modelos de baixa resolução, foram executadas vinte simulações *ab initio*, conforme já descrito no capítulo 3, o modelo final foi formado por N_{DAM}=162,3±14 átomos dummy. O modelo de alta resolução utilizado para o ajuste ao modelo médio do envelope gerado foi o mesmo utilizado para o TR β1, pois dada a resolução dos envelopes e a alta semelhança entre as estruturas do TR α e β, a utilização do modelo de baixa resolução é altamente ilustrativa acerca das posições e disposições dos domínios. Os ajustes de corpo rígido para o encaixe do modelo de alta resolução no envelope molecular foi realizado pelo programa MASSA e o programa CRYSOL foi utilizado para o cálculo dos parâmetros Rg e D_{MAX}.

Tabela 4 - Parâmetros experimentais e calculados para os dados de SAXS

Parâmetro/ amostra	hTRα-1 DBD LBD dímero		
	Exp.[a]	Mod.[b]	DAM[c]
Dmax (nm)	13,0 ± 1.00	13,3	12,1
Rg (nm)	4,2 ± 0,30	3,7	4,1
Discrepância χ	-	1,20	1,07
Resolução (nm)	3,8	-	3,8

a Exp., calculado dos dados experimentais. *b* Mod., parâmetros dos modelos de dímeros. *c* DAM, parâmetros dos modelos de átomos dummys, após 10 modelos.

Os envelopes do dímero do TR α1 DBD-LBD apresentam algumas diferenças, quando se compara ao TR β1 DBD-LBD. Os DBDs parecem estar mais móveis, e isso pode ser observado pelo maior volume na região do envelope em que estão dispostos e pelo espaçamento entre os DBDs. Além disso, para o melhor ajuste dos LBDs foi necessária uma torção desses em relação aos DBD, o que propõem um arranjo diferente dessa isoforma, deixando o envelope mais torcido, diferente do que ocorre com a isoforma β (**Fig. 48**).

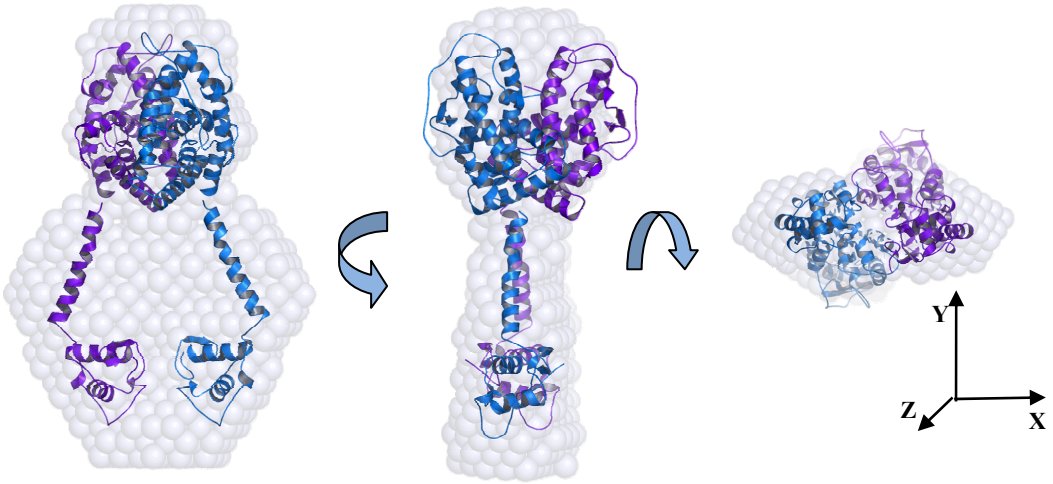


Figura 48- Envelopes dos dímeros de hTR α1 DBD-LBD derivados de calculo *ab initio***.** Superposição da média de 10 DAMs obtidos pelo DAMMIN e das estruturas obtidas por raios-x de dois hTR β DBDs e dois hTR β1 LBDs. Os modelos foram rotacionados a 90° em torno do eixo y e x.

5.2.2.2. O TR α1 completo com e sem ligante.

As medidas de SAXS do TR α completo demonstraram que a proteína encontra-se dimérica na presença e ausência do ligante T3. As curvas de espalhamento da proteína (**Fig. 49**) com e sem ligante apresentaram-se bem semelhantes, assim como acontece com a construção DBD-LBD dessa mesma isoforma. O TR apo apresentou uma melhor estatística nos dados e, portanto, os melhores modelos de envelopes foram gerados para essa preparação de proteína. Essas medidas foram realizadas para o TR α1 completo a 2,5 e 5 mg/mL.

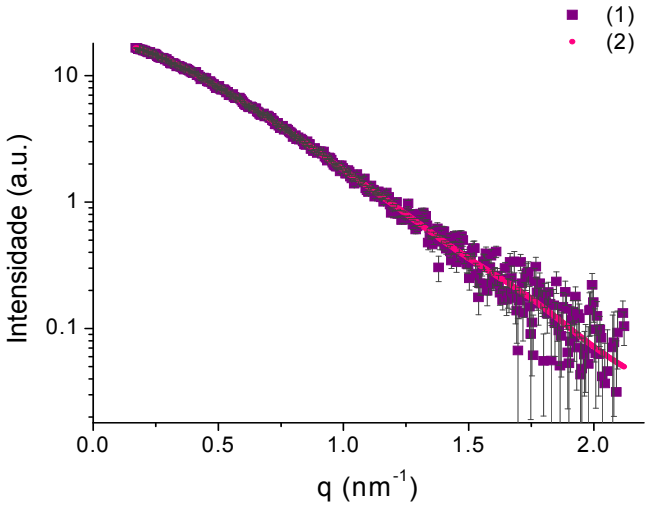


Figura 49- Curva experimental de espalhamento do TR α1 completo. Intensidade de espalhamento (log I), normalizada por um fator de escala de intensidade, *versus q*. (*1*) representa a curva experimental; (2) é a curva da intensidade de espalhamento calculado a partir do modelo DAMs, pelo programa DAMMIN.

Os cálculos dos parâmetros D_{MAX} e Rg resultaram nos seguintes valores 13,8 nm e 3,7 nm, indicando que o envelope, apesar de possuir um raio um pouco menor que o determinado

para o TR α1 DBD-LBD, é mais alongado, conforme foi determinado pelo perfil de distribuição de distâncias do TR α1 completo (**Fig 50**).

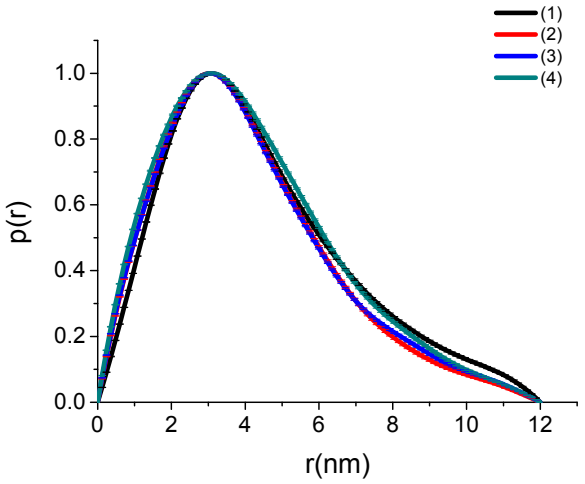


Figura 50 - Gráfico das distribuições de distâncias calculadas a partir dos dados de SAXS do TR α completo sem T3 a 5 e 2,5 mg/mL (1 e 2, respectivamente) e com ligante T3 a 5 e 2.5 mg/mL (3 e 4, respectivamente). O gráfico demonstra que não ocorrem modificações estruturais muito significativas entre as duas preparações da proteína (apo- e holo).

O volume calculado para o dímero N_{DAM} foi de 6459, com um r_a= 0,35 nm, em uma esfera de diâmetro de 14 nm. Para a geração dos modelos de baixa resolução, foram realizadas cinco simulações *ab initio*. O modelo final foi constituído por N_{DAM}=490 ±11 átomos dummy.

Como não existe nenhuma estrutura da região N-terminal dos receptores nucleares disponíveis, o modelo de alta resolução foi utilizado somente em caráter ilustrativo, para se confirmar o melhor posicionamento dos domínios LBD e DBD. Além disso, após esse ajuste foi possível detectar qual seria a posição relativa da região N-terminal no envelope do receptor. Esses também são resultados que deverão ser mais bem trabalhados, porém são importantes para possíveis comparações com outras construções e isoformas da proteína.

Tabela 5 - Parâmetros experimentais e calculados para os dados de SAXS

Parâmetro/ amostra	hTR α1 completo - dímero		
	Exp.[a]	Mod.[b]	DAM[c]
Dmax (nm)	13,85 ± 1,0	13,3	14,0
Rg (nm)	3,7 ± 0,30	3,9	4,2
Discrepância χ	-	1,65	1, 7
Resolução (nm)	3,1	-	3,1

a Exp., calculado dos dados experimentais. *b* Mod., parâmetros dos modelos de dímeros. *c* DAM, parâmetros dos modelos de átomos dummys, após 5 modelos.

A comparação do modelo gerado para o apo-TR α1 completo com os modelos de apo-TRα1 e β1 DBD-LBD demonstra que o TR completo apresenta-se mais alongado que o TR β1 DBD-LBD, sendo a forma mais globular o TR α1 DBD-LBD. As curvas de espalhamento e a p(r) demonstram que o apo-TR α1 completo apresenta-se um pouco maior que os apo-TRα1 e β1 DBD-LBD, com diâmetro máximo de 140 Å, contra 120 Å dos outros modelos (**Fig 51**).

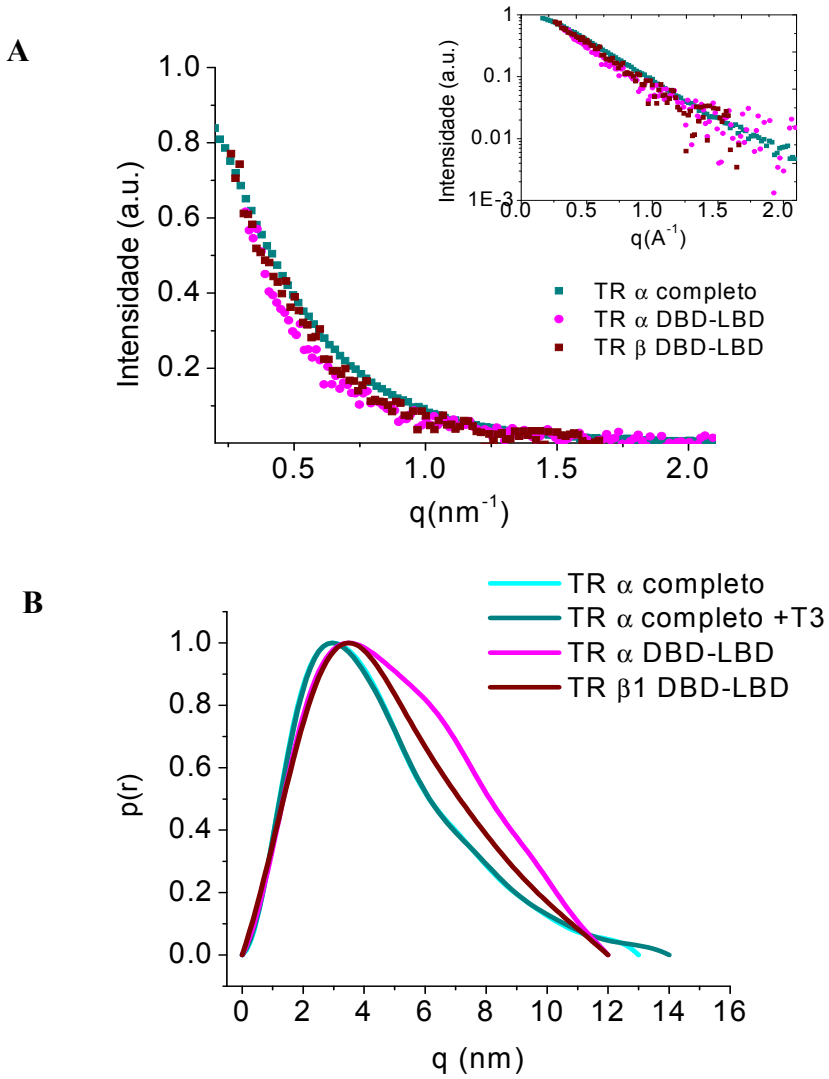


Figura 51 – A. Sobreposição das curvas de intensidade de espalhamento do TR α1 completo com e sem T3, TR α1 DBD-LBD e TR β1 DBD-LBD normalizadas, no detalhe temos o mesmo gráfico, no qual a intensidade de espalhamento está em escala logaritimica, ambas as curvas evidenciam as diferenças de espalhamento mesmo em valores de q baixos. **B.** Sobreposição das curvas de distribuição de distâncias – p(r) do TR α1 completo com e sem T3, TR α1 DBD-LBD e TR β1 DBD-LBD, evidenciando as diferenças estruturais encontradas para cada modelo gerado por SAXS.

O modelo médio construído para o TR α1 completo apresenta-se com um formato cilíndrico (prolato), mais alongado e bem mais estreito que as construções DBD-LBD. Isso talvez ocorra porque o domínio N-terminal, de alguma forma, contribua na formação dos

contatos entre os DBDs, mantendo-os mais próximos e, consequentemente, mantendo os *hinges* provavelmente em contato. Além disso, conforme observado na construção DBD-LBD do TR α1, na construção completa também ocorre uma pequena torção entre o plano dos DBDs e LBDs, porém, nesse caso, a torção é menos proeminente que no primeiro.

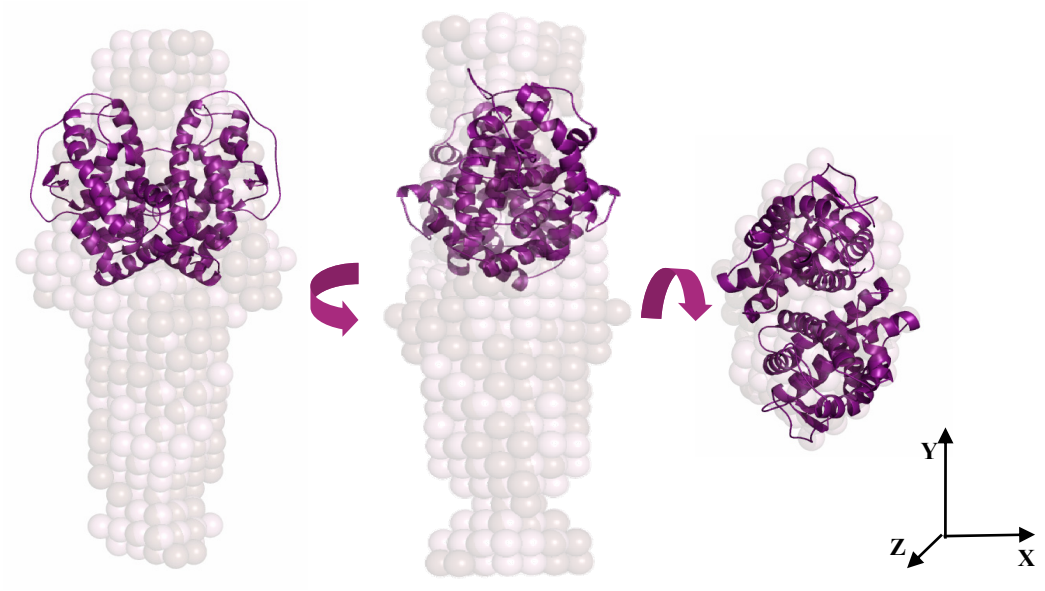


Figura 52- Modelo de baixa resolução no TR α1 completo, com a estrutura cristalográfica do domínio LBD ajustada ao modelo. O envelope se apresenta prolato, com uma ligeira torção entre a região onde se acomoda o LBD e a região do DBD. Os modelos foram rotacionados a 90° em torno do eixo y e x.

A comparação dos envelopes de todos os modelos gerados para TR1 DBD-LBD, TR α1 DBD-LBD e o TR α1 completo demonstra algumas diferenças. O TR α1 DBD-LBD é o mais globular de todos e apresenta seus DBDs em uma conformação bastante aberta, com os LBDs rotacionados em relação aos DBDs. O TR β1 DBD-LBD apresenta uma globularidade intermediária entre o TR α1 completo e DBD-LBD, com os DBDs em conformação ainda aberta, porém, mais fechado que no TR α1 DBD-LBD. É possível notar que o TR α1 completo é o mais alongado de todos os modelos. As regiões N-terminal de cada monômero da proteína (com aproximadamente 7 kDa) devem ocupar um pequeno espaço, demonstrando que estas, provavelmente, estão interagindo e forçando os DBDs, os quais nos outro modelos estão em uma conformação mais aberta, a se fecharem. Além disso, nota-se também uma torção dos domínios LBDs em relação aos DBDs, semelhante ao que ocorre no TR α1 DBD-LBD.

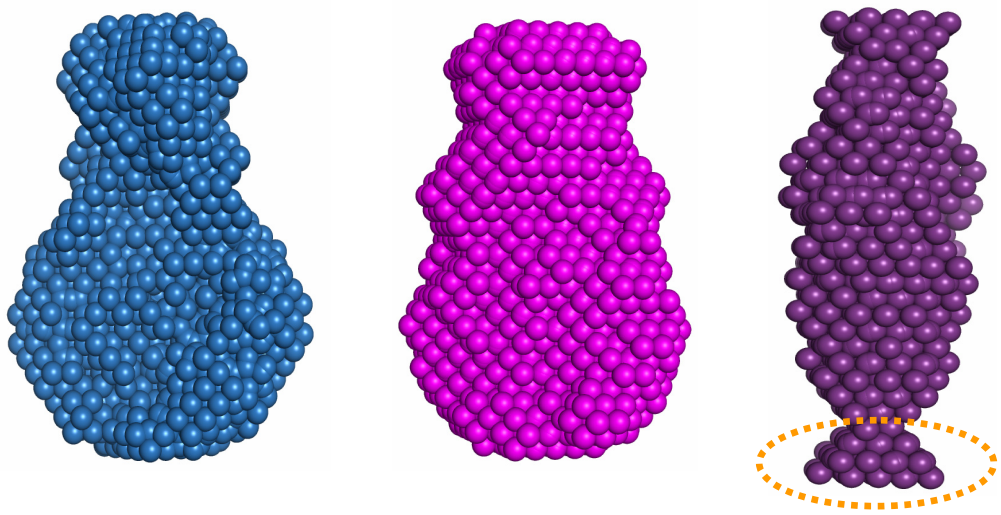


Figura 53 - Modelos gerados por SAXS para TR α DBD-LBD (azul), TR β DBD-LBD (rosa) e TRα completo (roxo), evidenciando as diferenças estruturais encontradas, é possível observar que no primeiro modelo os DBDs se encontram em uma conformação mais aberta; no segundo modelo, a conformação dos DBDs é intermediária e, no terceiro, fechada e mantida pelos N-terminais, que estão interagindo (linha pontilhada). Também se observa que a isoforma α apresenta uma torção dos LBDs em relação aos DBDs, o que não ocorre na isoforma β.

A sobreposição dos três modelos de dímeros (**Fig. 54**) evidencia bem a torção que ocorre na isoforma α e não ocorre na isoforma beta, além de ilustrar a localização do domínio N-terminal.

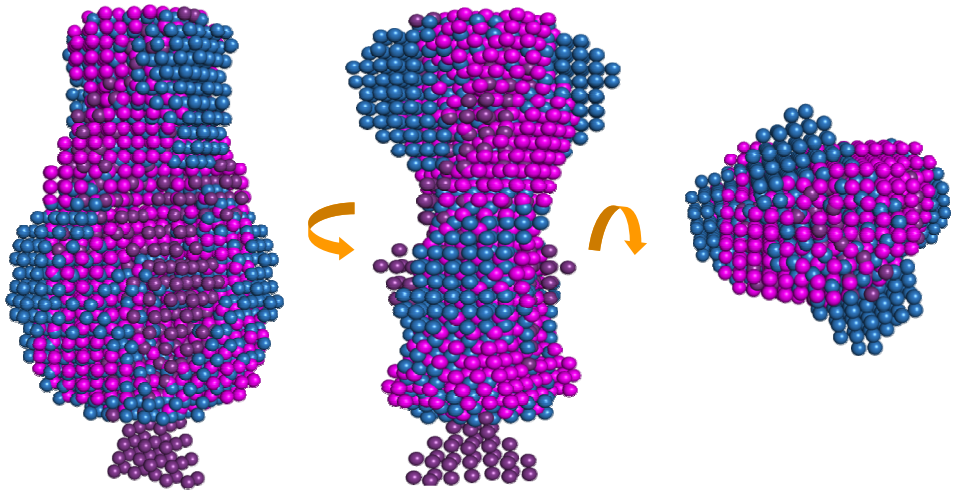


Figura 54 – Sobreposição dos modelos gerados por SAXS para TR α DBD-LBD (azul), TR β DBD-LBD (rosa) e TRα completo (roxo), evidenciando as diferenças estruturais encontradas e o formato mais alongado do TR completo.

5.3. Discussão dos resultados.

Nesses estudos foram apresentados os envelopes de baixa resolução de duas construções mais completas do TR, α1 DBD-LBD e β1 DBD-LBD, na presença e ausência do

ligante T3; além do envelope do receptor TRα1 completo, sugerindo o primeiro modelo do formato de um receptor nuclear completo.

A única isoforma que apresentou modificações em seus envelopes após a adição do ligante na amostra foi a β1, a qual apresenta um modelo de baixa resolução e raio de giro (Rg) característicos de tetrâmeros na ausência do hormônio, tanto em baixas como em altas concentrações de proteína (2 e 8 mg/mL). Após a adição do ligante, esses tetrâmeros parecem se dissociar em dímeros, independentemente da concentração de proteína utilizada nos experimentos de SAXS (2, 5 e 8 mg/mL), confirmando os estudos de oligomerização[128] apresentados no capítulo 4. Esses resultados foram escritos em forma de artigo cientifico e foram publicados em revista científica internacional[145] (Anexo1).

As estruturas em baixa resolução dos dímeros do TR β1 DBD-LBD apresenta-se em um formato achatado e pouco globular, sendo um pouco alongada. O ajuste do modelo de alta resolução sobre o envelope demonstra que os LBDs estão dispostos de acordo com a interface de dimerização predita para os RNs, os DBDs se encontram na outra extremidade do envelope e parecem estar dispostos em uma conformação em que estão interagindo. Esses domínios apresentam-se espaçados pelo domínio D, os quais devem estar em uma conformação de α-hélice estendida.

Os tetrâmeros apresentam-se menos achatados que os dímeros em um formato bastante cilíndrico ou prolato, indicando um maior contato entre os DBDs e os *hinges*. Apesar de serem formados por um dímero de dímeros, o diâmetro máximo dos tetrâmeros não corresponde ao dobro do tamanho do dímero. O melhor ajuste das estruturas de alta resolução ao envelope molecular indica que os domínios D devem estar em uma conformação menos estendida, o que faz com que ocorra uma leve aproximação entre o DBD e o LBD. Também foi verificado que a interface de tetramerização, proposta com base nos tetrâmeros do RXR, também se faz presente nos modelos do TR β1.

A adição de elementos responsivos de DNA também causam a dissociação dos dímeros do TR β1 DBD-LBD. O envelope gerado para os dímeros TR β1 DBD-LBD com o TER F2, apesar de ainda ser preliminar, sugere um formato de dímero pouco menos globular que o do holo-TRβ1 e mais alongado. A orientação dos DBDs no DNA faz com que ocorram uma torção no envelope, fazendo com que os DBDs fiquem a 90° do plano que contém os LBDs.

Quando se compara a isoforma α1 à isoforma β1, em relação à resposta ao ligante, esses estudos demonstraram que não existe modificações no envelope. O TR α1 DBD-LBD e o TR α1 completo se comportam como dímeros em solução, tanto na presença quanto na ausência de ligantes (capítulo 4) e o envelope de ambas as preparações é praticamente idêntico. Os envelopes dos dímeros do TR α1 DBD-LBD se apresentam com um formato mais globular e achatado. Também foi verificado que o plano que contém os DBDs possui uma orientação perpendicular ao plano dos LBDs. O ajuste do modelo de alta resolução aponta para uma disposição mais aberta dos DBDs, os quais podem interagir com diversos arranjos de elementos responsivos, o que pode sugerir uma maior mobilidade desses domínios.

A adição do domínio N-terminal na construção TR α1 DBD-LBD modifica bastante a estrutura de baixa resolução do TR α1. O envelope do TR α1 completo apresenta-se bastante cilíndrico, com os DBDs e os *hinges* bastante próximos. O papel do N-terminal parece ser o de estabilizar possíveis contatos entre os DBDs, resultando em uma estrutura em que os DBDs possuem um menor grau de liberdade de rotação, o que pode contribuir na distinção exata entre diferentes elementos responsivos.

A comparação entre os dímeros do TR α1 e β1 com os dímeros do RXR demonstram poucas diferenças estruturais, como as torções que ocorrem no envelope do TR α1. A comparação entre o posicionamento dos domínios demonstra que os LBDs se encontram dimerizados pelas hélices H10/11 e os DBDs se encontram relativamente afastados do cerne

do receptor. A adição do N-terminal no TRα1 resulta em um envelope mais cilíndrico que o encontrado para o RXR. Os tetrâmeros do TR, apesar de cilíndricos e alongados, diferem dos tetrâmeros do RXR pela posição dos domínios DBDs, os quais no TR se encontram próximos do cerne protéico, formado pelos LBDs e, no RXR se encontram distantes dos LBDs em um formato de X.

Por fim, as evidências da importância fisiológica dos dímeros e tetrâmeros do TR são limitadas, essas estruturas permitem algumas predições sobre a possível função desses oligômeros. Enquanto o TR heterodimeriza com o RXR nas células, existem indicações que os homodímeros do TR regulem a repressão transcricional em TREs positivos e a ativação transcricional dependente de ligante em elementos como palíndromos invertidos e DR-4[2, 91, 152].

Os DBDs e o *hinge* podem exercer contatos específicos no homodímero, os quais podem supor regra fisiológica putativa para essas espécies oligoméricas. A similaridade estrutural aparente entre os tetrâmeros do RXR e TR sugerem que essas espécies podem satisfazer funções parecidas[103, 134, 135, 142, 146, 153, 154, 155]. Foi proposto que a formação tetramérica do RXR atua como um mecanismo de auto-silenciamento[103, 134, 142, 153] e mutações no RXRα podem inibir a formação de tetrâmeros conduzindo à atividade constitutiva[135, 154].

É sabido que os apo-TRs formam complexos com correpressores e o requerimento de um segundo mecanismo de auto-silenciamento não é obvio. Também foi proposto que a formação dos tetrâmeros de RXR permite interações com elementos responsivos não usuais[154, 156] e, como os TREs nativos são considerados frequentemente complexos[157, 158], seria interessante especular que os tetrâmeros do TR β1 poderiam modular a transcrição em variantes não usuais de TREs. Além disso, a ligação cooperativa e a correlação sinergística da ativação da transcrição em elementos responsivos contendo quatro meio-sítios também foram relatadas para os receptores de estrógeno[159], progesterona[160] e glucocorticóides[161]. Maiores investigações deveriam ser realizadas para a definição da função dos tetrâmeros do TR. No

entanto, o fato que os TR β formam tetrâmeros indica que os RXRs não são os únicos com essa capacidade e poderia indicar que outros RNs poderiam formar tetrâmeros em condições apropriadas.

Capítulo 6 – Estudos da Afinidade do TR aos Elementos Responsivos ao Hormônio

6.1. Introdução.

Conforme citado no capítulo introdutório, os receptores tireoidianos atuam como reguladores transcricionais, reprimindo ou ativando a transcrição, dependendo da presença de seu ligante T3. Na ausência de ligantes, o TR pode reprimir fortemente a transcrição em diversos promotores[162, 163], como o do elemento silenciador de lisozima de galinha e os promotores do hormônio de crescimento, da enzima málica e do hormônio estimulador da

tireóide, entre outros[91, 164]. Dessa forma o TR recruta correpressores, os quais podem ativar a transcrição basal, em vez de reprimí-la, em genes que são negativamente regulados pelos hormônios tireoidianos. Na presença do ligante, esse efeito repressivo é aliviado e a transcrição passa a ser significantemente estimulada, após o recrutamento dos coativadores. Como resultado, uma vasta gama de atividade de níveis transcricionais pode ser alcançada[43].

Os efeitos do TR na regulação gênica são iniciados com a ligação do receptor às regiões específicas do DNA (TREs), que contém os meio-sítios AGGTCA dispostos em várias orientações[7]. Geralmente, os TREs mais comuns possuem dois meio-sítios orientados como repetições diretas e espaçados por quatro pares de base (DR-4), ou em orientações palindrômicas sem espaçamento (TERpal ou IP-0) e, até mesmo, como palíndromos invertidos, espaçados por seis pares de base (F2) [62, 165, 166, 167]. Os elementos palindrômicos são considerados os mais comuns para a ligação com TR[163], também foi descrito que os homodímeros de TR se ligam com alta afinidade aos palíndromos invertidos[36] e que as repetições diretas são preferenciais para heterodímeros TR-RXR[164]. Alguns ensaios de transativação celular demonstraram que os homodímeros do TR podem atuar como potentes repressores, suas preferência de ligação ao DNA seguem a ordem F2> IP-4>IP-9>DR-4[164].

Estudos realizados através de gel *shift* das interações proteína-DNA demonstraram que a adição de T3 aos homodímeros do TR promove sua dissociação, favorecendo a formação de heterodímeros[62]. Em contraste, outros estudos revelaram que o T3 aumentou a interação dos homodímero do TR em elementos palindrômicos e diminuiu essa interação em palíndromos invertidos[79]. Isso significa que o ligante pode induzir a repressão ou ativação do TR, dependendo da seqüência do TRE em que será ligado[91]. Alguns promotores são positivamente regulados pelo T3, como o de lisozima de galinha (F2); enquanto outros são regulados negativamente, como a cadeia pesada da miosina β em coelhos[43]. As modificações conformacionais na estrutura do TR, após a ligação do ligante, pode prevenir a ligação de

homodímeros do TR a alguns tipos de DNAs[164]. Dessa forma, o T3 pode modificar o balanço entre homo e heterodímeros ligados ao DNA[62].

Os homodímeros de TR ligam-se com alta afinidade a palíndromos invertidos com meio-sítios espaçados por 4, 5 ou 6 pares de base. Um efeito cooperativo bastante forte é observado para a ligação de homodímeros do TR em palíndromos invertidos (F2), mas não para DR-4. Essa cooperatividade também foi observada para a ligação de heterodímeros TR-RXR com todos os TREs[164].

Os detalhes sobre a ligação de homodímeros do TR a diversos TREs ainda são desconhecidos, os únicos valores de constantes de dissociação (K_D) para a ligação TR-TREs foram determinados em experimentos de saturação utilizando-se gel *shift*, no qual o TR β completo com e sem ligante foi avaliado. Os fatores de retardação de cada amostra foram analisados em termos de um gráfico de Scatchard e os K_{Ds} foram estimados para a ligação do TR nos promotores EM-1 (miosina embrionária – meio-sítio), EM1pal (similar ao F2), TREpal e Vit A (vitamina A), com os valores de 0,81 nM e 0,75 nM, 10,1 nm e 7,3 nM, 0,27 nm e 0,1 nm, e 0,76 nm e 0,92 nM, respectivamente, para o TR sem e com ligante[79].

Nesse capítulo, serão descritos os estudos investigativos sobre a ligação de diferentes construções do TR β1 (DBD e DBD-LBD) e do TR α 1 completo à diversas construções de HREs (F2, TREpal, DR-4, DR-1). Os ensaios feitos com o TR β foram realizados com a finalidade de se estabelecer a contribuição de cada um dos domínios no processo de ligação ao DNA, além de se estudar se a presença de íons divalentes interfere no processo de ligação ao DNA. Os estudos do TR α1 foram realizados para, além da determinação das constantes de dissociação, avaliar as modificações nessas constantes após a adição do ligante na amostra.

6.2. Resultados

6.2.1. Estudos de ligação do TR β1 DBD-LBD e TR β1 DBD a diferentes HREs

Para a avaliação da diferença na especificidade de ligação do TR β1 aos elementos responsivos foram realizados ensaios de ligação proteína-TRE, através de medidas de

anisotropia de fluorescência, utilizando-se oligonucleotideos marcados com fluoresceína. Essa abordagem agrega diversas vantagens quando comparada a outros métodos físico-químicos como, por exemplo, ensaios de migração em gel (*gel shift*), ultracentrifugação analítica e ressonância plasmônica, pois permite medidas diretas de eventos em solução sem a interferência de co-aditivos ou matrizes.

A anisotropia, nesse caso, é uma medida direta do raio hidrodinâmico global do DNA, através da fluoresceína, a qual contribui com eventos locais de despolarização através da movimentação de sua cauda de seis carbonos. Apesar dessa contribuição, a ligação do TR ao DNA marcado com fluoresceína induz à diminuição da despolarização da fluorescência, a qual se reflete no aumento do volume hidrodinâmico do complexo formado e, além disso, ao aumento progressivo nos valores de anisotropia de fluorescência.

Nesse trabalho buscou-se informações sobre diversos fatores na ligação TR-TREs, como a utilização de duas construções da proteína (TR DBD e TR DBD-LBD), de diferentes elementos responsivos e o uso de cátions magnésio, que atuam como cofatores na ligação proteína-DNA. Em todos os ensaios isotérmicos realizados, os dados foram analisados empregando-se dois diferentes modelos: o modelo *thigh-binding* não-cooperativo e o modelo livre de Hill, baseado em análises cooperativas de interação. Para todas as análises as duas abordagens foram utilizadas e resultaram em valores similares, com um coeficiente aparente de Hill (n) próximo de 1 (**Tabela 6** e **7**), indicando que a ligação do TR aos TREs apresentam um comportamento não-cooperativo para todas as variáveis analisadas.

Os resultados sumarizados na **tabela 6** demonstram que a ligação do TR DBD aos HREs apresenta alta afinidade para os elementos F2, TERpal e DR-4 (K_{Ds} 32±15 nM, 61±24 nM e 76±42 nM), visto que as curvas de anisotropia de fluorescência desses três elementos responsivos quase se sobrepõem (**Fig. 55A**). Somente o DR-1 foi significantemente discriminado pelo TR DBD, apresentando valores de afinidade aproximadamente uma ordem

de magnitude menor, resultando em um valor de constante de dissociação de 329,5±41 nM (**Tab. 6, Fig. 55**).

Tabela 6 – afinidade de ligação TR DBD aos HREs

	TR DBD sem $MgCl_2$ (nM)		TR DBD com $MgCl_2$ (nM)	
TRE	K_D	Hill "n"	K_D	Hill "n"
F2	32,1±15,2	1±0,3	28,15±5,3	1±0,1
PAL	61,8±24,06	1±0,3	19,2±7,4	1±0,2
DR-4	73,6±42,5	1±0,3	9,3±3,7	1±0,4
DR-1	329,5±41,5	1±0,2	298,3±56,4	1±0,4

Tabela 7 – afiinidade de ligação TR DBD-LBD aos HREs

	TR DBD-LBD sem $MgCl_2$ (nM)		TR DBD-LBD com $MgCl_2$ (nM)	
TRE	K_D	Hill "n"	K_D	Hill "n"
F2	12,5±7,5	1±0,5	2,78±0,30*	1±0,1
PAL	77,8±22,1	1±0,2	80,77±14,5	1±0,1
DR-4	64,5±16,05	1±0,2	110,60±19,08	1±0,1
DR-1	142,8±21,3	1±0,1	106,3±53,5	1±0,4

*Valor de Kd aparente

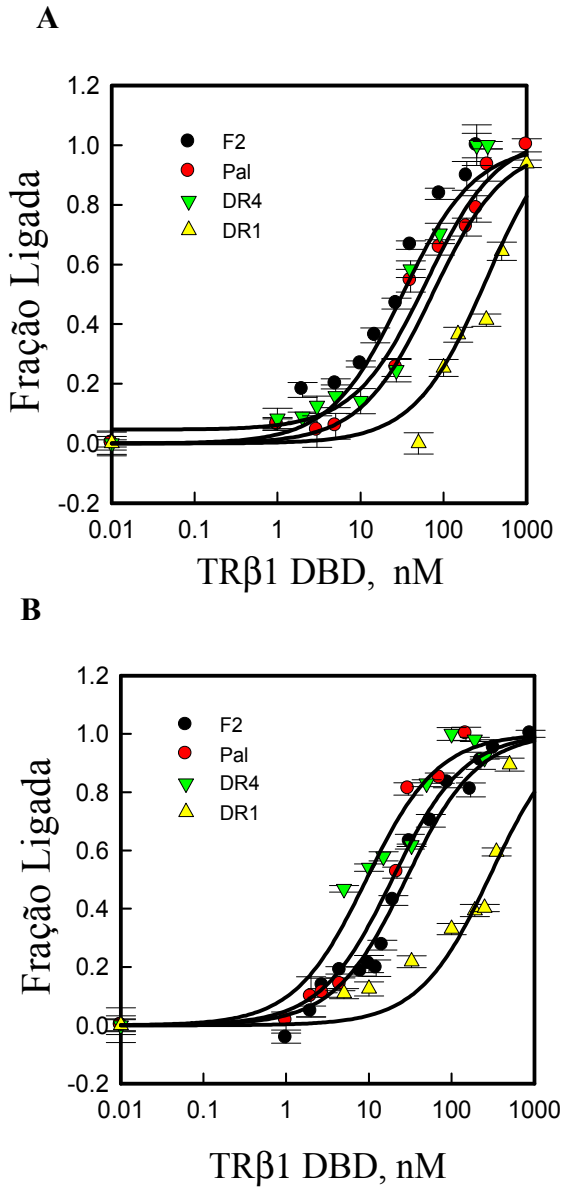


Figura 55 – Curvas de anisotropia de fluorescência da ligação TR DBD com diferentes HREs, F2, PAL, DR-4 e DR-1, na ausência (**A**) e presença (**B**) de 1mM $MgCl_2$.

A ligação do TR DBD-LBD ao DNA apresenta maior afinidade aos elementos responsivos F2, TER pal e DR-4 que para a repetição direta espaçada por um nucleotídeo (DR-1) (**Tab.7, Fig. 56**). O arranjo do HRE em F2 demonstra a maior afinidade para o TR DBD-LBD, com um K_D 12.5±7 nM, e o DR-1 apresentou o menor valor de afinidade (K_D 142±21 nM), os elementos TER pal e DR-4 apresentaram valores similares de constante de dissociação, 77±22 nM e 64±16 nM, respectivamente (**Tab. 7**, **Fig. 56**). Esses dados indicam que o LBD pode ser responsável, não somente pelo reconhecimento ao hormônio, mas

também que pode estar envolvido no reconhecimento ao DNA, o que indica uma regra crucial na função regulatória do TR.

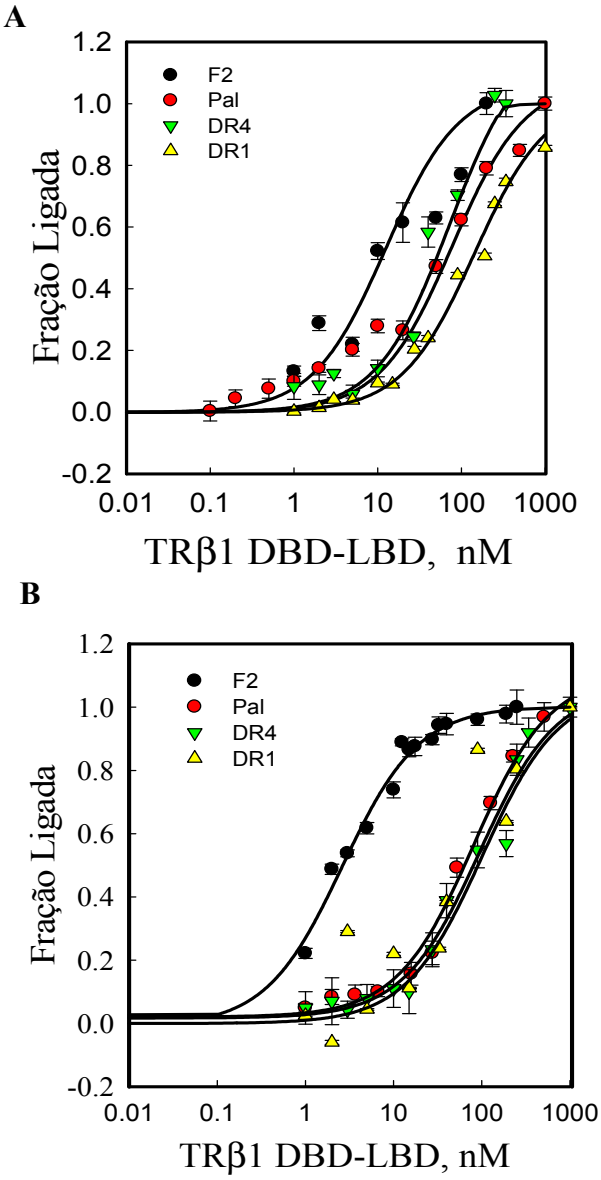


Figura 56 – Curvas de anisotropia de fluorescência da ligação TR DBD-LBD com diferentes HREs, F2, PAL, DR-4 e DR-1, na ausência (**A**) e presença (**B**) de 1mM $MgCl_2$.

A ligação dos DBDs sozinhos é mais fraca nos elementos palindrômicos. Na ausência do cloreto de magnésio, isso talvez ocorra, primeiramente, porque o cloreto de magnésio diminui ligações inespecíficas entre DNA e proteína, e porque os domínios LBDs coordenam a dimerização, direcionando o receptor na ligação com o DNA. Os domínios LBDs parecem auxiliar no posicionamento dos DBDs, além de facilitar a estabilidade da ligação ao DNA. Os íons magnésio também causam uma grande mudança na ligação TR-HRE, aumentando a afinidade pelos elementos específicos ao TR. Ou seja, a presença do domínio LBD e os íons

magnésio aumentam a especificidade na ligação, coordenando melhor proteína e DNA nesse processo.

Os efeitos do $MgCl_2$ na ligação TR-TREs são mostrados nas **figuras 55B e 56B**. A ligação do TR DBD-LBD com o HRE F2 não sofre modificação com a presença de magnésio, para o TREpal, essa afinidade é somente um pouco melhorada. Por outro lado, para os elementos em repetições diretas, as afinidades diminuem em torno de 1,5 a 5 vezes na presença dos íons magnésio. A construção TR DBD apresenta um aumento de 3 e 7 vezes, respectivamente, nas ligações aos elementos TREpal e DR-4 quando $MgCl_2$ é adicionado a solução.

6.2.1.1. A influência da força iônica na ligação TR-DNA

A constante de dissociação para a interação do TR DBD-LBD com o elemento F2 resultou em um valor de mesma magnitude da concentração de DNA utilizada no ensaio. Nesse caso, o uso do modelo de *thigh binding* para o ajuste das curvas de ligação poderia refletir em erros analíticos. Por esse motivo, optou-se por outra abordagem para a avaliação da constante de dissociação do complexo TR DBD-LBD:F2, baseado no decréscimo de afinidade através do aumento da força iônica[121, 168, 169].

A ligação do TR DBD-LBD ao DNA ocorre em alta afinidade quando a concentração salina do tampão da amostra é baixa. Altas concentrações salinas promovem um deslocamento nas curvas de ligação, com um decréscimo progressivo na afinidade através da blindagem de íons envolvidos nos contatos eletrostáticos do complexo formado entre o TR e o DNA. A **figura 57** demonstra a ligação do TR DBD-LBD no elemento F2, na presença de magnésio em diferentes forças iônicas, onde se pode observar um aumento no K_D de 2,78 nM (em 50 mM NaCl, **Fig. 56**), para 130 nM (em 300 mM NaCl) (**Fig. 57**).

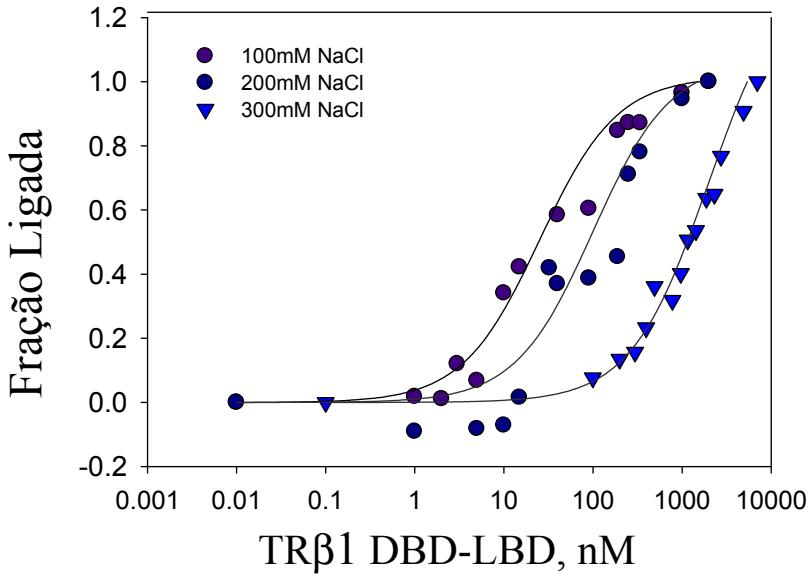


Figura 57 – Curvas de anisotropia de fluorescência da ligação TR DBD-LBD com F2 em 100, 200 e 300 mM NaCl, demonstrando o deslocamento da afinidade à medida que a concentração salina é aumentada.

Cátions divalentes, em especial o magnésio, exercem uma regra importante nos eventos de ligação aos ácidos nucléicos, modulando a afinidade e especificidade em diferentes sistemas[169]. Para a avaliação da importância do Mg^{2+} na interação do TR aos HREs, os experimentos de ligação do TR aos HREs foram realizados na presença e ausência de $MgCl_2$. O K_D encontrado para o TR DBD-LBD ligado ao F2, na presença de $MgCl_2$, apresentou um valor menor que a concentração de DNA usada no ensaio (Kd = 2.78 nM, [DNA] = 10 nM), por conta desse valor, o K_D encontrado é considerado um K_D aparente.

Baseado nas influências do NaCl na ligação do TR ao DNA e na constante aparente encontrada para a ligação TR DBD-LBD em F2, na presença de $MgCl_2$, outro experimento foi necessário para se calcular o real valor do K_D entre TR DBD-LBD e F2. Neste experimento foram realizadas titulações de isotermas do TR DBD-LBD + F2, variando-se a concentração de NaCl de 100 a 300 mM. As constantes de dissociação foram calculadas para cada curva e colocadas em um gráfico de dependência logarítmica das constantes de dissociação em função da concentração de sal. Esse procedimento permitiu que o valor de K_D entre o TR DBD-LBD ligado ao F2, em 50 mM NaCl, fosse extrapolado por uma regressão linear (**Figura 58**).

Através dessa extrapolação, a real constante de dissociação entre TR DBD-LBD:F2 encontrada foi 15,4±2 nM, similar à constante encontrada para a mesma construção na ausência de magnésio (12,5 nM). Esse resultado pode indicar que a presença do $MgCl_2$ não interfere no processo de ligação do TR DBD-LBD ao F2 (**Tab. 7, Fig. 56B**).

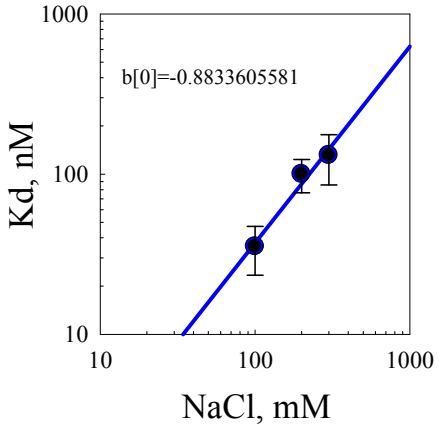


Figura 58 – Gráfico logarítimico das constantes de dissociação do TR-DBD-LBD ligado ao F2 em diferentes concentrações de NaCl.

6.2.1.2. A estequiometria de ligação TR-DNA

Os ensaios de eletroforese nativa demonstram que o TR se liga aos diferentes elementos responsivos como dímeros. As diferenças entre as intensidades das bandas são causadas pelas diferentes afinidades a cada tipo de TRE usado neste experimento (F2, TREpal, DR-1 e DR-4). Conforme revelado, em altas concentrações (acima de 40µM), o TR comporta-se como tetrâmeros em solução na ausência de seu ligante cognato, T3[127]. A adição do T3 induz à dissociação dos tetrâmeros em dímeros para a ativação do TR. Esse processo poderia habilitar a proteína a se ligar ao DNA como homodímeros, ou preferencialmente, como heterodímeros com o RXR [128, 146].

O gel nativo apresentou o mesmo comportamento previamente observado (**Fig. 59**). Na ausência do T3, o TR DBD-LBD aparece em uma banda mais alta, com um raio hidrodinâmico calculado de 4,1 nm, correspondente a tetrâmeros. Quando um dos quatro HREs, utilizados nesse trabalho, foi adicionado à proteína, observou-se um perfil de migração diferente, com as bandas em uma posição mais baixa, compatível com a migração de dímeros

(Rh-3,6 nm). Esse padrão de migração demonstra que os tetrâmeros também se dissociam na presença de DNA, indicando que o evento de ligação pode estar acoplado a um rearranjo de subunidades.

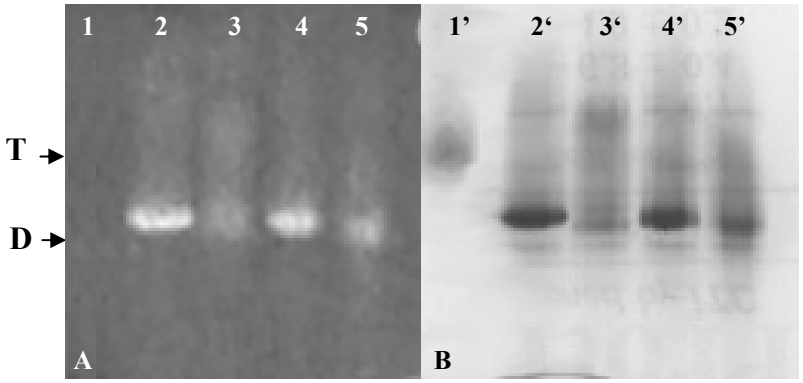


Figura 59 - Gel nativo do TR DBD-LBD na ausência e presença de 4 diferentes elementos responsivos, F2, TRE PAL, DR-4 e DR-1. O gel foi corado com brometo de etidio (**A**) e, posteriormente com Coomassie (**B**), para que se pudesse visualizar o DNA e a proteína. As canaletas do gel correspondem a 1 e 1', TR DBD-LBD sem DNA, tetrâmero; 2 e 2', TR DBD-LBD com F2; 3 e 3', com TRE PAL; 4 e 4', com DR-4; 5 e 5', com DR-1. Pode-se notar que a ligação dos 3 primeiros DNAs são melhores que o último, DR-1. **D**. Dímeros, **T**. Tetrâmeros.

Esses dados foram confirmados através de experimentos de estequiometria de fluorescência, conduzidos por medidas de anisotropia do DNA marcado com fluoresceína e excesso do mesmo DNA não marcado. Os resultados revelam que o TR DBD-LBD e o TR DBD ligam-se a qualquer HRE utilizado nesse estudo (F2, TREpal, DR-4 e DR-1) como dímeros.

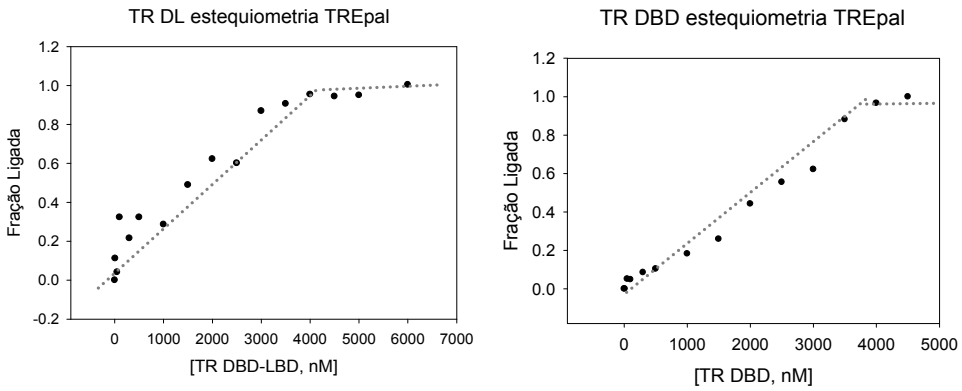


Figura 60- Curvas estequiométricas de associação TR DBD-LBD e TR DBD ao elemento responsivo TREpal, as retas pontilhadas foram adicionadas para demonstrar onde se localizam os pontos de inflexão das curvas, os quais estão em torno de 4μM, o que representa duas vezes a concentração de DNA utilizado no experimento.

6.2.1.3. Ensaios de interação TR-TR

Para esse experimento houve a necessidade de se marcar a proteína com a sonda fluoresceína. A marcação ocorreu em duas horas e uma cromatografia através de uma coluna de *desalting* foi realizada para a separação da proteína marcada e o excesso de sonda.

Em baixas concentrações (escala nano molar), o TR DBD-LBD apresenta-se em um balanço delicado entre monômeros e dímeros (**Fig 61**). Os dímeros são observados em baixas concentrações de proteína (K_D encontrado pela média de quatro curvas diferentes foi 190,9±46 nM). Considerando-se que os ensaios de anisotropia de ligação do TR DBD-LBD ao DNA foram realizados em uma concentração entre 1 a 1000 nM, pode-se afirmar a predominância do TR DBD-LBD na forma dimérica quando ocorre a ligação ao DNA.

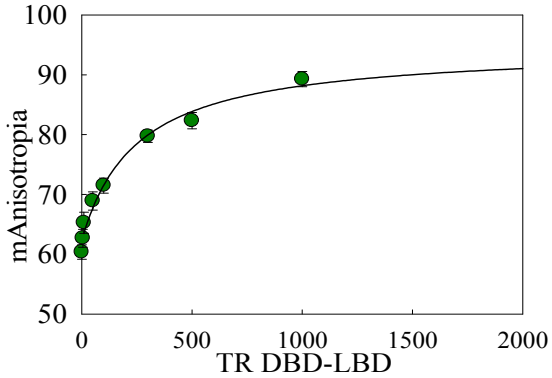


Figura 61 – Curva de associação TR-TR por anisotropia de fluorescência. Pode-se notar um platô bem definido, o qual pelos experimentos realizados em solução acredita-se que seja um equilíbrio entre M→D.

Alguns ensaios de mobilidade por eletroforese (EMSA) demonstraram que o TR β completo apresentou a capacidade de ligação às seqüências palindrômicas (similar a F2) e DR-4 como homodímeros, e que a adição do T3 induz à sua dissociação para a formação de heterodímeros com o RXR[79]. Adicionalmente, as medidas dos coeficientes de Hill apresentaram valores próximos a um, o que é um indicativo de um evento de ligação direto de dímeros livres ou monômeros independentes que se acoplam para a dimerização. A presença dos tetrâmeros em solução parece ocorrer em pequenas quantidades quando relacionadas à concentração de proteína total. Além disso, os tetrâmeros podem estar silenciados nas medidas dos eventos de ligação, e por isso não possuem relevância nos resultados apresentados.

6.2.1.4. Medidas de interações inespecíficas entre TR e DNA

Para avaliar a especificidade da ligação do TR DBD e DBD-LBD aos HREs foram realizados ensaios de ligação entre o TR e uma seqüência de DNA não específica, aleatória,

sem a presença de qualquer seqüência similar ao motivo AGGTCA. Os resultados demonstram que a associação do TR DBD-LBD e do TR DBD somente ocorre em altas concentrações de proteína, acima de 1,5 µM, provando que a interação entre o TR e os HREs são específicas (**Fig. 62**), apesar das diferenças entre os elementos responsivos e os efeitos dos íons magnésio.

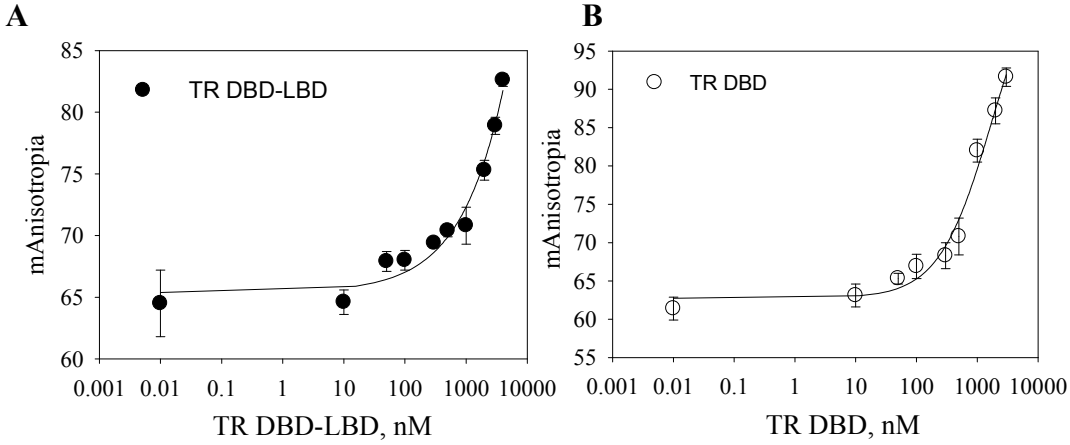


Figura 62- Perfil de associação dos complexos formados entre o TR DBD-LBD (**A**) e TR DBD (**B**) e a seqüência aleatória de DNA, a qual não contém o motivo AGGTCA, presença de $MgCl_2$.

6.2.1.5. A dissociação dos complexos TR-DNA

Os resultados demonstram que a titulação de sal nos complexos TR DBD-LBD:HREs apresentou um perfil de dissociação similar para os quatro HREs, na presença e ausência de $MgCl_2$, o que pode ser visualizado através da sobreposição das curvas de dissociação dos complexos (**Fig. 63**).

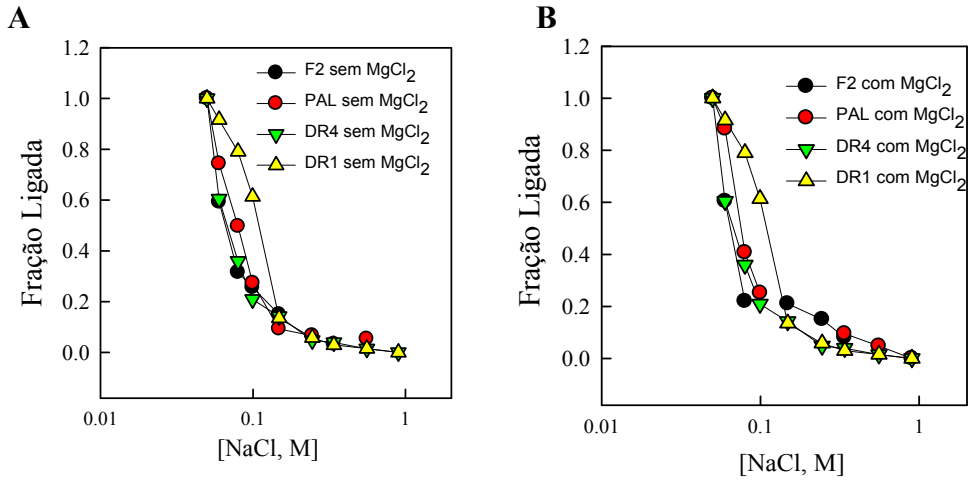


Figura 63 - Perfil de dissociação dos complexos formados entre o TR DBD-LBD e os diferentes elementos responsivos utilizados nos experimentos – F2, TREpal, DR-4 e DR-1, na ausência (**A**) e ausência (**B**) de $MgCl_2$.

O único elemento responsivo que difere um pouco do padrão de dissociação foi o DR-1, o qual apresenta a menor afinidade ao TR DBD-LBD. Esse padrão semelhante de dissociação indica que os elementos responsivos F2, TERpal e DR-4 apresentam um número semelhante de contatos iônicos na ligação ao TR DBD-LBD. O complexo formado pelo TR DBD-LBD e o elemento DR-1, porém apresenta um número de contatos iônicos diferenciado dos demais, o que poderia ser explicado pela conformação diferente da proteína nesse elemento responsivo, o qual possui uma pequena distancia entre os meio-sítios.

A dissociação dos complexos formados com o TR DBD apresenta um perfil mais diferenciado que a construção DBD-LBD. Nesses experimentos, na ausência de magnésio, os perfis são similares para F2, DR-4 e TREpal, e o elemento DR-1, o único com valores de constantes de dissociação mais diferenciados, também apresenta-se diferente dos demais HREs. A presença do $MgCl_2$ resulta em um perfil de dissociação bastante diferente. O elemento TREpal parece ser o que possui o menor número de contatos iônicos entre a proteína e o DNA. O F2 possui um número de contatos intermediário, enquanto DR-4 e DR-1 demonstram maior número de contatos iônicos (**Fig. 64**). Esses resultados sugerem que algumas diferenças encontradas nas constantes de dissociação entre a preparação da proteína com e sem magnésio podem ocorrer devido às interações inespecíficas que ocorrem entre o DNA e a proteína, e a influencia desses cátions pode diminuir esse tipo de interação.

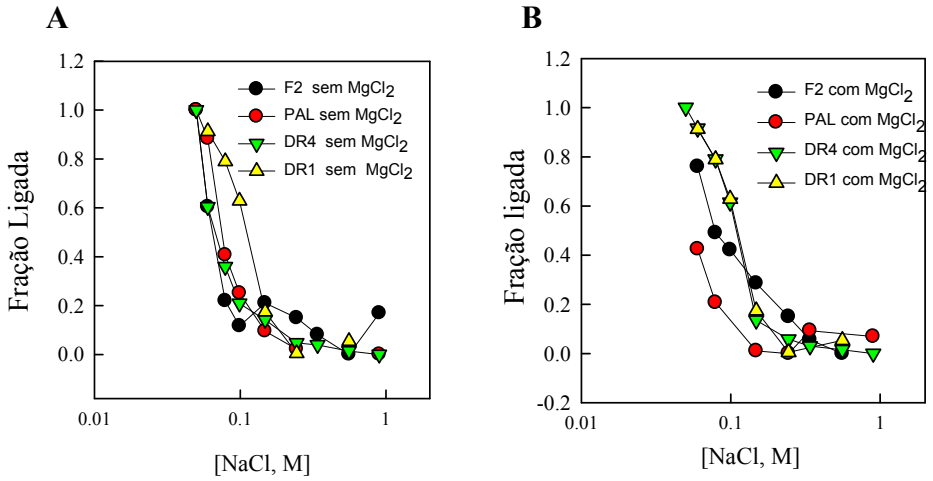


Figura 64 - Perfil de dissociação dos complexos formados entre o TR DBD e os diferentes elementos responsivos utilizados nos experimentos – F2, TREpal, DR-4 e DR-1, na ausência (**A**) e ausência (**B**) de $MgCl_2$.

6.2.2. TR alfa completo com e sem T3

Esses experimentos foram realizados para a avaliação da ligação do receptor completo TR α1 aos diferentes HREs (F2, TREpal, DR-4 e DR-1) e, além disso, para a verificação da influência do ligante nesse processo. Para tanto, as mesmas medidas de afinidade realizadas com o TR β1 DBD-LBD foram executadas para o TR α1 completo, na presença e ausência do ligante T3 (**Tab. 8**). Todas as curvas foram realizadas na ausência de magnésio.

Tabela 8 – afinidade de ligação TR α 1 completo aos HREs

	TR α completo com T3 (nM)		TR α completo sem T3 (nM)	
TRE	K_D	Hill "n"	K_D	Hill "n"
F2	296,0±29	1,5±0,2	361,6±47	0,79±0,06
PAL	352,4±10,2	1,7±0,08	811,8±42	1,6±0,1
DR-4	300,9±22,1	1,7±0,19	767,2±63	1,7±0,16
DR-1	261,7±15	1,5±0,13	769±39	1,65±0,1

Os resultados demonstram que, primeiramente, o TR α1 competo apresentou valores de K_D bem maiores que o TR β1 DBD-LBD, indicando que pode haver uma diferença de afinidade de ligação ao DNA entre essas isoformas. Mais ainda, foi possível observar que o TR α1 completo liga-se muito melhor ao elemento F2, quando comparado aos demais HREs, os quais possuem valores de afinidades semelhantes, não havendo muita discriminação de preferência de ligação entre eles. Também foi verificado que a ligação TR α1 completo-DNA ocorre de maneira cooperativa para todos os DNAs testados, exceto para o elemento F2, na ausência do ligante, que se apresenta anti-cooperativa ($n<1$), ou seja, a ligação do primeiro monômero interfere negativamente na ligação do segundo, o que pode significar que, nesse caso, a ligação deve ocorrer preferencialmente com monômeros do TR. Por fim, foi possível constatar que e a ligação proteína-DNA também ocorre com a proteína em sua forma dimérica.

A presença do ligante modifica o padrão de afinidade descrito anteriormente (**Fig. 65**). Após a adição do T3, a afinidade ao F2 se mantém parecida à do receptor na ausência do ligante. Porém, os outros HREs (TREpal, DR-4 e DR-1) apresentaram valores de afinidades cerca de 2 vezes menores que que os valores apresentados para o apo-TR, indicando uma melhora em todos os valores de afinidade, exceto para F2 que se mantém, e também uma queda na discriminação entre os elementos responsivos.

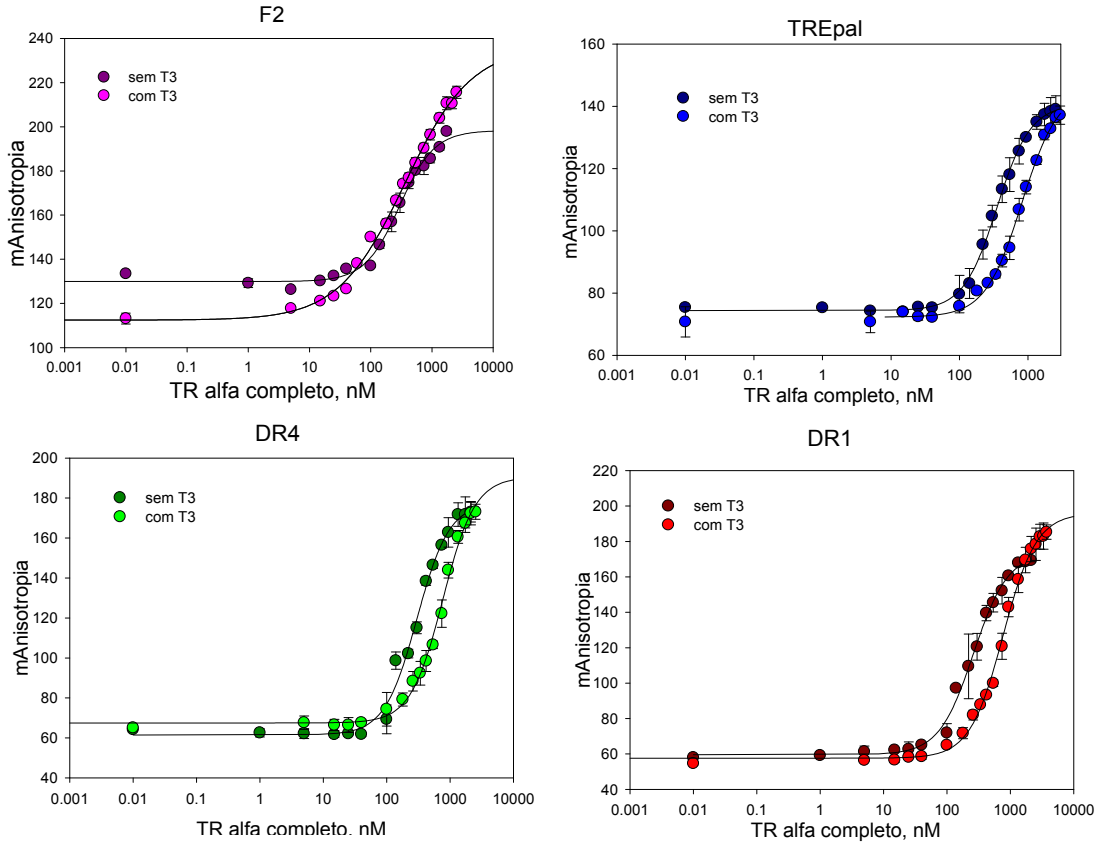


Figura 65 - Curvas de afinidade do TR α1 completo aos diferentes HREs- F2, TREpal, DR-4 e D-1, na presença e ausência de T3.

Esses resultados indicam que o TR α1, além de possuir constantes de afinidade muito maiores que as obtidas para o TR β1 DBD-LBD, ou seja, menor afinidade aos elementos responsivos; somente apresenta diferenciação para o F2, entre os elementos responsivos estudados. A adição do ligante exerce uma grade mudança no padrão de associação do TR α1 completo ao DNA, fazendo-o não amis diferenciar entre os HRs e reduzindo os valores de constantes para Pal, DR-4 e DR-1.

O grande aumento nos valores de constante de dissociação para o TR completo, em relação às demais construções, poderia ser explicado pela presença do domínio amino-terminal, o qual, interagindo com o DNA, proporcionaria melhor conformação à proteína, dificultando a sua ligação às seqüências que não fossem consenso, tornando a ligação aos HREs mais específica. Além disso, também se poderia especular que a ligação do TR α1 ocorre com menor afinidade que o TR β1, e que este, por ser mais amplamente distribuído entre os tecidos, é ativado mais facilmente em termos de ligação ao DNA.

Quando se adicionou $MgCl_2$ ao apo-TR α1 completo, o padrão de associação verificado foi bastante diferente (**Tabela 9**). Nesse caso, pôde-se observar que a associação do TR α1 completo aos HREs seguem uma ordem de afinidade em que F2 é o elemento preferencial, seguido por TREpal, DR-4 e por fim, com menor afinidade, o DR-1. Além disso, os valores de constante apresentados para o TR α1 com magnésio são bem menores que para o TR α 1 sem magnésio para os elementos palindrômicos, ao contrário do que ocorre com as repetições diretas.

Tabela 9 – Constantes de dissociação para TR α1 completo, na presença de MgCl2

TR α1 completo com $MgCl_2$		
HRE	K_D	n
F2	142,7±42,7	1,2±0,4
PAL	475,5±36,1	1,8±0,5
DR4	957,1±10,4	2,3±0,4
DR1	1363,2±55,7	1,4±0,2

A adição de $MgCl_2$ provocou alterações significativas na afinidade de ligação do TR a todos os HREs (**Tabela 9**). Para o F2 e TER pal, houve uma queda de, aproximadamente, duas vezes no valor de K_D, conseqüentemente, a afinidade para esses elementos aumentou na mesma proporção. Para o DR-4 e DR-1, o efeito da adição de $MgCl_2$ modificou muito os

valores de K_D em cerca de 1,5 a 2 vezes, respectivamente, para DR-4 e DR-1. Dessa forma, manteve-se um gradiente crescente de valor de constante de dissociação, na ordem: F2 < TREpal < DR-4 < DR-1.

Com base nesses resultados, pode-se afirmar que interações inespecíficas estão muito presentes na ligação entre o TR e o DNA, além disso, a presença do $MgCl_2$ deve ser fundamental para inibir esse tipo de interação e facilitar a discriminação entre o TR e os diferentes elementos responsivos que se ligam a ele.

6.3. Discussão dos Resultados.

O TR nas células existe somente em sua construção completa, diferentemente de muitas proteínas regulatórias, as quais podem ser encontradas *in vivo* em construções truncadas. Entretanto, a expressão e purificação do TR β1 recombinante não é um processo trivial e, por isso, optou-se por estudar as contribuições individuais de cada domínio dessas isoformas do TR no reconhecimento ao DNA. A construção do TR α1 apresenta uma maior produtividade e estabilidade nos processos de purificação e expressão, com isso foi possível estudar como ocorre o reconhecimento de um receptor completo aos HREs.

O TR está envolvido em diversos processos biológicos, os quais são finamente regulados pela ligação e reconhecimento ao DNA, acoplado a modulação do ligante[7, 13, 162, 170, 171]. Apesar de muitos trabalhos na literatura discutirem sobre elementos responsivos preferenciais e a importância da modulação por correguladores, nenhum deles apresentou um estudo detalhado sobre todos os HREs preferenciais e não-preferenciais.

Nos estudos realizados com o TR β1 foi possível verificar a contribuição dos domínios DBD e LBD para a ligação a quatro HREs. Primeiramente, foi observado que a construção TR β1 DBD-LBD é mais seletiva que a do TR β1 DBD, visto que o primeiro diferencia melhor entre os elementos responsivos. A afinidade do TR β1 DBD-LBD aos HREs segue a seguinte ordem de preferência: F2 < TREpal ≈ DR-4 < DR-1. Entretanto o TR β1 DBD segue

a mesma ordem, porém os valores entre os K_{Ds} F2, TREpal e DR-4 possui valores semelhantes, sendo o K_D para DR-1 o mais destoante. Isso significa que a presença do LBD, o qual possui a interface de dimerização do receptor, pode auxiliar no direcionamento e posicionamento correto para a ligação dos homodímeros ao DNA, o que facilitaria a estabilidade do complexo formado entre TR-DNA. A construção que contém somente o DBD poderia estar ligando ao DNA como monômeros livres. A ligação do DBD ao DR-1 poderia ser prejudicada pelo fato desta construção conter uma parte do *hinge*, a qual, pelo pequeno distanciamento entre os meio-sítios, sofreria impedimentos estéricos no posicionamento dos dois domínios ao DNA, o que atrapalharia a ligação.

A comparação ente as construções DBD e DBD-LBD, em um gráfico de correlação (**Fig. 66**) demonstra que o TR β1 DBD apresenta pequenas diferenças nos valores de K_D entre F2, TREpal e DR-4, somente o DR-1 apresenta um valor diferente de afinidade. Para o TR β1 DBD-LBD os elementos mais diferenciados são do F2 e DR-1, com o TREpal e DR-4 apresentando-se similares. Esses resultados demonstram que a seletividade aos elementos responsivos aumenta à medida que a proteína se aproxima de seu tamanho completo. Estudos realizados com o ER completo e DBD também apresentam diferenças no perfil de ligação das duas construções ao DNA[172]. Esses fatos contribuem para reforçar a idéia de que determinadas conformações, presentes em construções mais completas da proteína, contribuem na especificidade de ligação ao DNA.

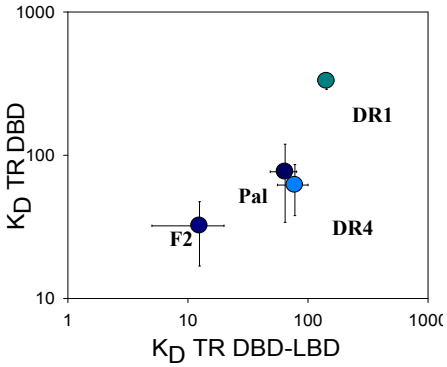


Figura 66 – Gráfico de correlação entre as constantes de afinidade obtidas para o TR β1 DBD e LBD, correlacionando as diferenças de afinidade para cada construção.

Outra constatação desse trabalho é a preferência da ligação do TR β1 a elementos palindrômicos, como F2 e TREpal. Alguns estudos já relataram que o TR possui a capacidade de se ligar a elementos palindrômicos, palíndromos invertidos e a repetições diretas espaçadas por 4 nucleotídeos e que a orientação entre os monômeros nesse tipo de interação revelam o estado de atividade da proteína.

O TREpal confere pouca especificidade hormonal ao receptor, pois pode ser reconhecido por um grande número de outros RNs. O HRE mais comumente descrito para homodímeros do TR e heterodímeros TR-RXR tem sido o F2 e o DR-4, respectivamente. Nas seqüências em arranjos de repetições diretas, o espaçamento entre os dois motivos AGGTCA não pode ser puramente randômico, visto que o TR reconhece os nucleotídeos a 3´ e possui uma forte preferência para o DR-4 e pouca afinidade para o DR-1. Nos palíndromos invertidos os dois motivos apresentam uma orientação cabeça-cabeça, com a necessidade de um espaçamento de 6 nucleotídeos[58, 130, 163, 173]. Um artigo recente demonstra que homodímeros e monômeros do TR β podem mediar as respostas do T3 em F2 e TREpal, além disso esse trabalho também revela a preferência em DR-4 quando o receptor está em seu estado ativo e que a ligação dos homodímeros ao DNA é preferencial para o TR na ausência de ligantes, atuando como repressores da transcrição[174].

Os estudos realizados com o TR α1 completo apresentaram muitas diferenças no perfil de ligação ao DNA, quando comparado aos estudos realizados com o TR β1. Além do TR α1 completo apresentar valores de K_{Ds} muito maiores que os obtidos para o TR β1, na ausência do cloreto de magnésio, foi observado que somente há discriminação para o F2, entre os quatro DNAs utilizados nos experimentos. As afinidades para TREpal, D-4 e DR-1 apresentam-se próximas. Porém, a adição do ligante T3 modifica todo esse perfil, fazendo com que o TR α1 completo se ligue maior afinidades próximas para os quatro HREs, F2, TREpal, DR-4 e DR-1. Esses resultados demonstram que o TR α1 possui uma preferência real ao F2 e a adição do ligante, apesar de aumentar a finidade para os outros HREs, não

demosntra discriminação entre nenhum deles. Também foi constatado que a ligação do TR α1 completo aos HREs é cooperativa para todos os elementos responsivos, na ausência de presença do T3. A ausência do ligante promove uma modificação dessa cooperatividade somente para o F2, o qual passa a se ligar ao DNA de maneira anti-cooperativa (n<1). Essa anticooperatividade pode estar relacionada ao evento de dissociação dos dímeros, no DNA, refletindo resultados descritos na literatura[79], o que poderia significar a preferência da ligação dos monômeros do TR α1 em F2.

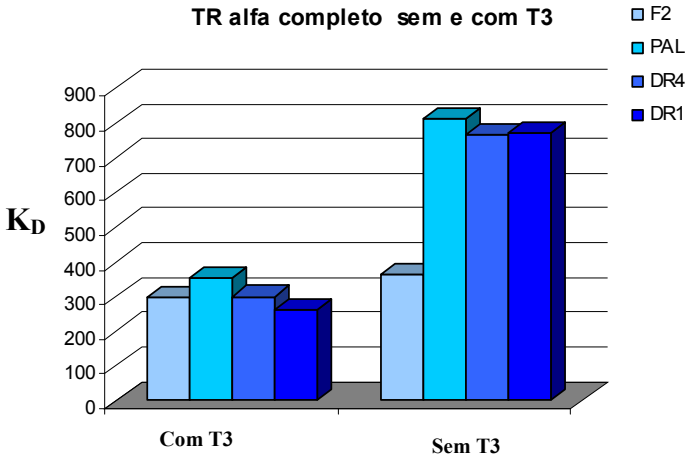


Figura 67 – Gráfico das constantes de dissociação do TR α1 completo sem e com o ligante, T3, para os diferentes elementos responsivos utilizados nos experimentos de anisotropia de fluorescência.

Os íons magnésio promovem efeitos drásticos na ligação entre proteínas e DNA. Nas condições dos experimentos realizados nesse estudo esses íons parecem aumentar fortemente a ligação do TR a seqüências específicas de DNA (F2 e DR-4). É sabido que cátions Mg^{2+} aumentam a especificidade de ligação entre proteína e DNA através das pontes intermoleculares formadas entre os grupamentos fosfatos do DNA e aminoácidos carregados das proteínas, além disso, o magnésio causa a coordenação dos grupos PO_4^{-3}, promovendo a desidratação do DNA[169].

Foi verificado que a adição de $MgCl_2$ nas amostras resultou em grandes modificações nas constantes de afinidade obtidas para o TR β1. Na construção do TR β1 DBD foi verificado que a preferência de ligação aos HREs seguiu a seguinte ordem: DR-4 < TREpa l≈ F2 <<< DR-1. Os valores encontrados para F2, TREpal e DR-4 foram bastante próximos e os

valores dos K_{Ds} para F2 e DR-1 praticamente não foram modificados após a adição de magnésio. Esses resultados demonstram a diminuição de interações inespecíficas para os elementos DR-4 e TREpal e, mais ainda, que F2, descrito ser preferencial para o TR, praticamente não apresentou interações inespecíficas na ausência de Mg^2.

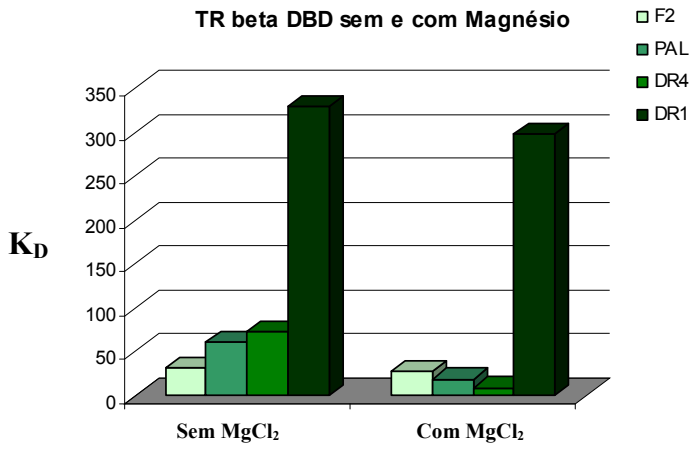


Figura 68 – Gráfico das constantes de dissociação do TR β1 DBD sem e com o cloreto de magnésio, para os diferentes elementos responsivos utilizados nos experimentos de anisotropia de fluorescência.

A construção TR β1 DBD-LBD também apresentou modificações em seu comportamento após a adição do $MgCl_2$, porém essas mudanças nas afinidades foram observadas somente para os elementos em repetições diretas. Os elementos palindrômicos praticamente mantiveram suas afinidades, demonstrando que essas interações são específicas e demonstrando a preferência do TR β1 aos elementos palindrômicos. A mudança nas afinidades observada para DR-1 e DR-4, pode se explicada pela presença da interface de dimerização nessa construção.

Conforme descrito, a interface de dimerização presente no LBD promove um arranjo diferenciado dos monômeros do TR, dificultando a ligação aos elementos responsivos em repetições diretas. O DR-4 tem sido descrito como um elemento preferencial para a ligação de heterodímeros TR-RXR com alta afinidade e a ligação dos homodímeros a esses elementos ocorre com afinidades intermediárias[174], visto que a interface de dimerização do receptor não é respeitada nesse arranjo. Em suma, pode-se atribuir essa mudança de afinidade ao arranjo

preferencial da proteína ao DNA e à diminuição de interações inespecificas após a adição do cátion Mg^{2+}.

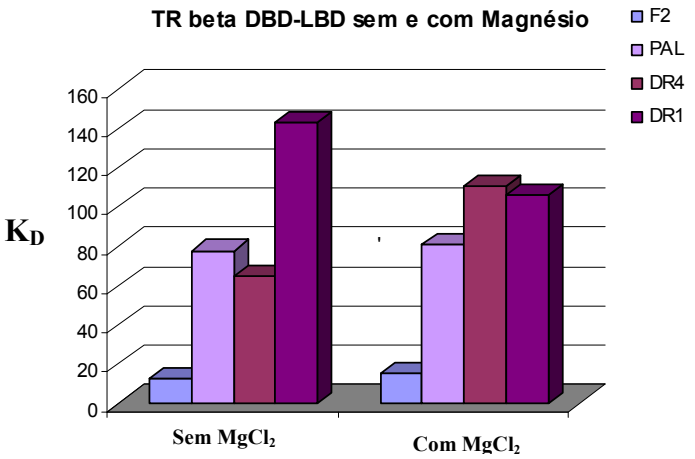


Figura 69 – Gráfico das constantes de dissociação do TR β1 DBD-LBD sem e com o cloreto de magnésio, para os diferentes elementos responsivos utilizados nos experimentos de anisotropia de fluorescência.

O TR α1 completo também apresenta mudanças em suas afinidades após a adição do cloreto de magnésio. A principal mudança observada nesse sistema foi a redução da constante de dissociação para os elementos palindrômicos, F2 e Pal, de 1 a 2 vezes após a adição do íon, e o aumento das constantes para os outros elementos, DR-4 e DR-1. Além da modificação nos valores de constantes, também foi observado que uma ordem de preferência de ligação passou a se estabelecida com a adição de Mg^{2+}, na qual a afinidade ao elemento F2 passou a ser evidenciada, sendo seguida pelos elementos TREpal, DR-4 e, por fim, pelo DR-1. Com isso, o perfil de afinidade aos HREs se mantém para ambas as isoformas, com a preferência pelos elementos palindrômicos, seguidos pelo DR-4 e DR-1.

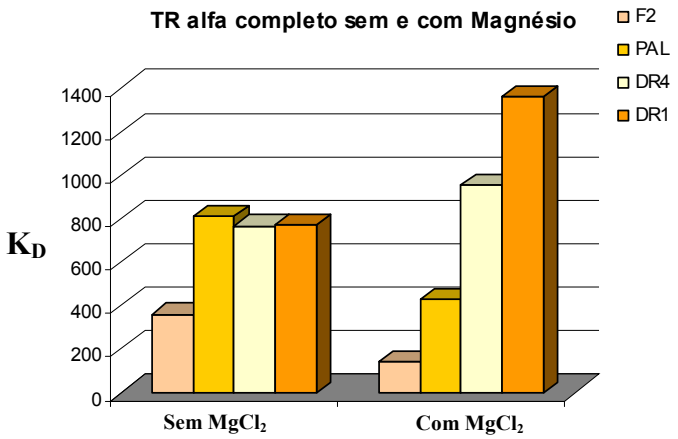


Figura 70 – Gráfico das constantes de dissociação do TR α1 completo sem e com o cloreto de magnésio, para os diferentes elementos responsivos utilizados nos experimentos de anisotropia de fluorescência.

Por fim pode-se especular que a influência desse íon contribui para a especificidade o TR às diversas seqüências de DNA estudadas e essa contribuição pode ocorrer pela redução de interações inespecíficas entre a proteína e o DNA e também pelo melhor alinhamento e arranjo do DNA. Proteínas que se ligam ao DNA possuem um grande número de cadeias laterais catiônicas, as quais se ligam às cadeias aniônicas dos grupos fosfatos presentes no DNA, através de pontes salinas[175]. Portanto, a concentração salina do tampão no qual essa interação está ocorrendo pode modificar o equilíbrio entre grupos aniônicos e catiônicos. A estrutura cristalográfica do TR DBD contém uma face inteira do dímero TR-RXR, a qual interage com o DNA, composta principalmente de cadeias laterais carregadas positivamente. As hélices de reconhecimento dos DBDs ligam-se ao sulco maior do DNA fazendo contatos diretos com os grupos fosfatos do esqueleto do DNA, determinando a especificidade de ligação de cada RNs a cada HRE[65].

Em termos de ligação TR-DNA pode-se dizer que todas as curvas paresentaram perfis parecidos e que as diferenças nas especificidades de diferentes formas do TR foram confirmadas com esse estudo, para a ligação a todos os DNAs utilizados nos experimentos. Este trabalho foi o primeiro a demonstrar a ligação de diferentes construções e isoformas do TR em diferentes HREs, em termos de constantes de dissociação. Esses resultados abrem novos horizontes para o melhor entendimento dos mecanismos de funcionamento dos receptores nucleares.

Capítulo 7 – Estudos da Dinâmica da Ligação do Hormônio por Espectrometria de Massas

7.1. Introdução.

As mudanças conformacionais induzidas pelo ligante, provocadas no domínio de ligação ao ligante na superfamília dos receptores nucleares têm sido investigadas por diversos estudos[67, 75, 176, 177, 178]. Os LBDs dos RNs possuem uma estrutura altamente conservada para muitos receptores (RXR, RAR, TR), a qual geralmente é composta por 12 α-hélices e 3 a 4 fitas-β[38, 49, 61, 63, 65, 72, 176, 179]. Essas estruturas revelam que os LBDs dos RNs compartilham uma arquitetura similar, principalmente quando se trata do bolsão de ligação ao ligante[38]. A

comparação entre as estruturas do apo- e holo-RNs demonstra que a presença do ligante induz a um arranjo conformacional mais compacto e, além disso, que este se encontra geralmente completamente enterrado no interior do domínio[38, 49, 61, 65, 75, 176, 177]. Após o posicionamento do ligante no interior do sítio de ligação, forças eletrostáticas induzem a uma mudança conformacional, com o reposicionamento das hélices 11, 12 (H11 e H12) e do *loop* H11-H12[38, 49, 61, 72]. A H12 do holo-receptor é usualmente empacotada sobre o corpo do LBD, entretanto, algumas estruturas resolvidas para o ER e o RAR demonstram que a H12 pode adotar diferentes conformações, o que sugere sua mobilidade [176, 177]. Até o momento, nenhuma estrutura do TR na ausência de ligantes foi obtida e a conformação da H12 do apo-TR ainda é desconhecida. As estruturas resolvidas para o holo-TR com diferentes ligantes também apresentam uma arquitetura comum para esse receptor[65, 72, 179].

A técnica biofísica de troca H/D tem sido considerada bastante poderosa para a delimitação de mudanças na dinâmica de proteínas induzidas por diversos fatores. Ela pode ser utilizada para a determinação de taxas de troca rápida para hidrogênios-amida presentes na superfície de proteínas, o que pode ser importante para estudos de oligomerização[180, 181]. Diversos estudos de desenovelamento de proteínas, agregação, interação proteína–proteína têm sido realizados através dessa técnica e apresentam resultados bastante interessantes[182]. Proteções contra esse tipo de troca podem significar mudanças conformacionais na proteína, o que causa alteração na exposição de determinados resíduos ao solvente, podendo ser interpretado como modificações nas estruturas terciária e secundária[182]. Além disso, as taxas rápidas de troca podem resultar na baixa estabilidade da macromolécula[180].

Na tentativa de se entender mais sobre a dinâmica do apo- e holo-TR β1 LBD em solução e para uma melhor compreensão sobre as modificações estruturais que ocorrem no receptor, após a adição de ligantes, foram realizados experimentos de troca de hidrogênio por deutério (H/D ex), monitorados por espectrometria de massas. Nesses estudos, as regiões mais flexíveis são mais penetráveis pelo solvente, o que pode ser refletido por uma troca rápida

entre H/D, além disso, trocas rápidas entre hidrogênio e deutério podem refletir sobre a estabilidade e a estruturação da proteína[181].

O grau em que os grupamentos amida das cadeias laterais são expostos ao solvente revela muito sobre seu ambiente[183]. Mudanças conformacionais induzidas pela ligação de um ligante podem causar variações na exposição dos grupos amida e essas variações podem ser determinadas através de medidas da taxa de troca dos hidrogênios das amidas pelos deutérios presentes no solvente[182]. Portanto, análises de troca H/D permite que modificações nas estruturas de proteínas sejam observadas antes e após qualquer evento que modifique a conformação proteica. Essa técnica, acoplada à proteólise com enzimas específicas e à espectrometria de massas tem sido considerada uma nova e sofisticada metodologia para a análise dinâmica de estrutura de proteínas[184]. A utilização da digestão proteolítica permite a localização de mudanças conformacionais específicas na estrutura proteica[183].

Alguns estudos utilizando essa técnica têm demonstrado a utilidade desse sistema para a diferenciação de perturbações estruturais no LBD de alguns receptores nucleares. As mudanças conformacionais do PPARγ, induzidas após a ligação de agonistas totais e parciais[124] e os estudos de dinâmica de modificações estruturais que ocorrem em homodímeros do RXR, também após a adição do ligante[183], aumentaram o conhecimento acerca das propriedades dessas moléculas em solução. Além disso, a comparação desses resultados com as estruturas cristalográficas desses receptores tem acrescentado muito no conhecimento sobre os mecanismos de transdução de sinais dos RNs.

As medidas de espectrometria de massas após as trocas H/D para o TR β1 LBD com e sem ligante foram realizadas na tentativa de se observar modificações estruturais que ocorrem após a ligação do ligante. Os resultados apresentados confirmam que o ligante promove modificações conformacionais sensíveis a estrutura do LBD. O comportamento do apo-TR demonstrou que este se apresenta mais móvel e em menor grau de estruturação que o holo-TR, principalmente na cavidade do ligante.

7.2. Resultados.

A massa predita para o TR β1 LBD (AAs 209-461), através do programa *MS digest*[126] (http://prospector.ucsf.edu/prospector) foi calculada em 27.335 Da. A deconvolução dos espectros puros da proteína inteira resultou em dois picos (**Fig. 71**), sendo o maior deles correspondente a espécies monoméricas, com uma massa medida de 28.046±18 Da, e o pico menor, referente aos dímeros do TR, o qual apresentou uma massa de 55.990±35 Da. Esses resultados concordam com estudos prévios de cromatografia por exclusão de tamanho (gel filtração) e de gel nativo do TR, os quais afirmam que esse domínio do TR apresenta-se como uma mistura de monômeros e dímeros em solução (Capítulo 4).

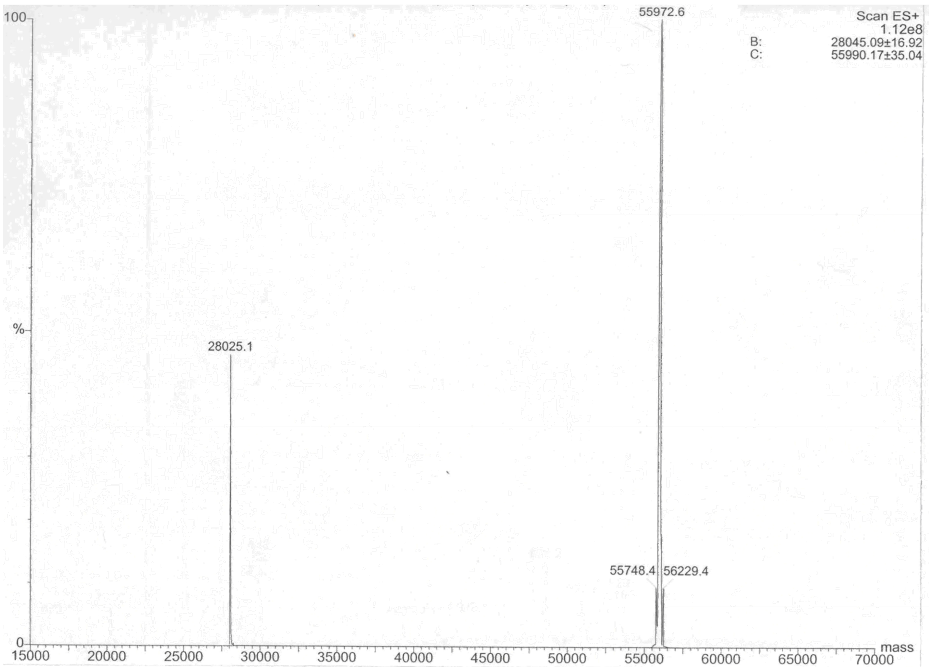


Figura 71 - Espectro de massa do TRβ1 LBD, com dois picos, o menor é referente aos monômeros (massa medida 28.045 Da) e o maior, referente aos dímeros (massa medida 59.990 Da).

Cada subunidade do TRβ1 LBD apresentou um total de 180 hidrogênios dos grupos amida que efetuaram trocas com deutério. O total de incorporação nos sítios amida aumentou com o tempo de deuteração em cada uma das amostras (apo- e holo-TR). A troca com deutério ocorreu em aproximadamente 80% do apo-TR e em 65,92% do holo-TR, nos 480 minutos do ensaio. Uma diferença de massa de 12-24 Da foi observada entre oTR apo e holo, o que representa 15% da incorporação de deutérios (F**ig.72**).

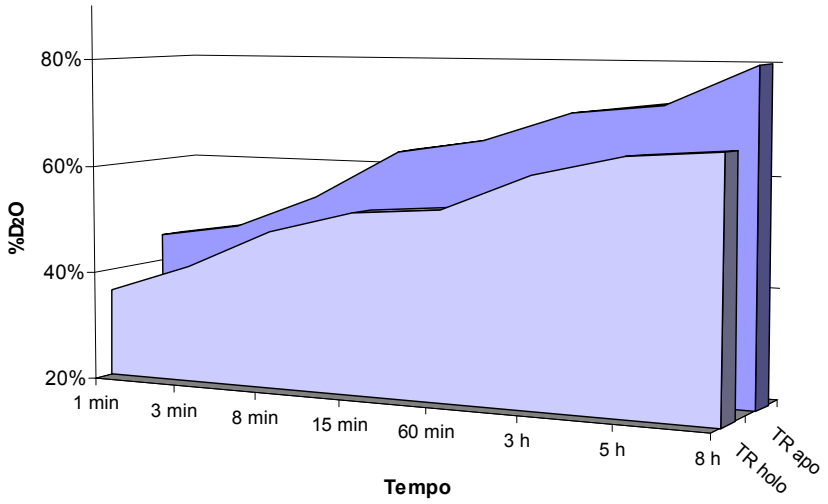


Figura 72 – Número de deutérios incorporados pelo TR LBD, em cada tempo de deuteração da proteína inteira, na ausência (azul escuro) e presença de ligante (azul claro). A troca de deutério da holo proteína foi menor que os níveis de incorporação do apo-TR, o que sugere proteção do ligante nas trocas H/D .

As condições da proteólise com a pepsina geraram 60 peptídeos, cobrindo 94,9% da seqüência de aminoácidos do TR β1 LBD; dos quais, 30 foram utilizados para análise da trocas H/D, o que cobriu 92,1% da seqüência global da proteína (**Fig. 73**).

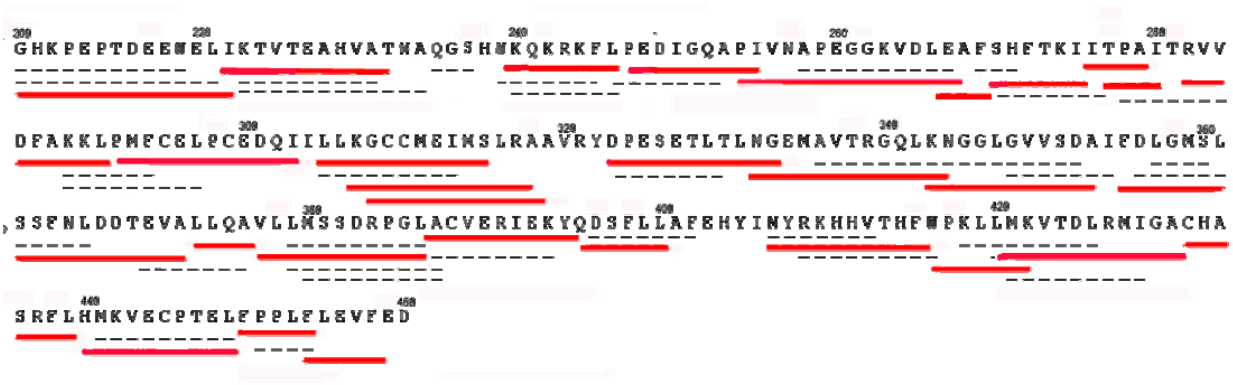


Figura 73 - Seqüência da proteína analisada por massa e os peptídeos gerados por sua digestão (linhas pretas e vermelhas). As linhas vermelhas representam os peptídeos que foram utilizados na análise de deuteração da proteína.

Os peptídeos pépticos tiveram suas massas analisadas em todos os tempos de incorporação de deutério, para a marcação dos níveis de troca de deutério em toda a cadeia principal da proteína. Essas medidas foram realizadas tanto para a proteína com ligante, quanto sem ligante. Esses resultados foram usados para localização das regiões onde a incorporação foi maior ou menor, nas duas formas da proteína, para posterior comparação.

No tempo global do experimento o receptor se apresentou mais protegido após a adição do ligante (**Fig. 74**), sendo a única exceção, o peptídeo composto pelos aminoácidos

281-290 (C-terminal da H3), região que comporta o sítio de ligação a correpressores. Isso pode significar um maior grau de estruturação dessa região que ocorre na proteína, na ausência do ligante.

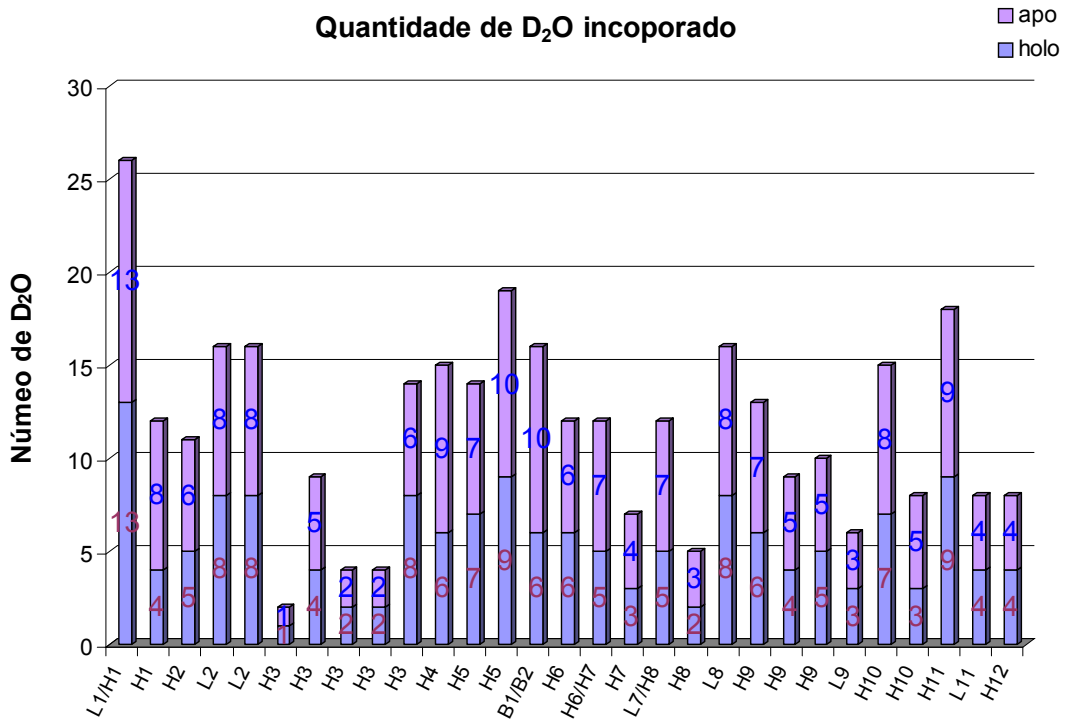


Figura 74 - Número de deutérios incorporados para cada peptídeo na presença (barras azuis) e ausência (barras rosa) do ligante.

Os níveis de incorporação de deutério do apo-TR, em função do tempo de incorporação estão ilustrados na **figura 75A**. Nessa figura, os peptídeos mais dinâmicos e móveis, que apresentam troca rápida, estão representados em vermelho, enquanto as regiões de troca lenta, ou seja, os peptídeos menos dinâmicos, estão representados em azul.

Regiões de troca lenta, e por isso de menor mobilidade, onde as trocas com deutério foram menores que 50%, incluíram porção N-terminal da hélice 3 (H3), fita β4 (S4), hélice 7 (H7) e o loop H10-11. Regiões de mobilidade intermediária, com trocas entre 50 e 80%, são formadas por H3, *loop* H3-4, H4, H5, H6, fita β3 (S3), H8, H9 e H11. E, finalmente, as regiões mais dinâmicas da proteína, com mais de 80% de incorporação, são compostas pelos *loops* H0-1, H1-2, H2-3, H9-10, H10-11 e H11-12, H1, H2, fita β1 (S1), fita β2 (S2), N-terminal da H10, N-terminal da H11 e H12.

No primeiro tempo de incorporação de D_2O (1minuto) os fragmentos da H5, H6 e H9 se apresentam com taxas de incorporação baixas, a H10 apresenta incorporação intermediaria. Esse comportamento é explicado pelo fato de que essas hélices compõem o cerne da proteína e, portanto, menos expostas ao solvente. As regiões de maior mobilidade encontradas nesses experimentos foram H1, C-terminal da H11 e H12, as quais estão localizadas nas regiões mais externas da proteína. Esses dados representam a alta mobilidade do apo-TR em solução, o qual se apresenta majoritariamente com taxas de trocas intermediárias em todos os tempos de incubação com deutério.

O holo-TR LBD apresentou-se mais estável e estruturado que o apo-TR, ou seja, com menor mobilidade. As mudanças conformacionais no TR após a ligação do ligante promoveram um decréscimo de, aproximadamente, 10-15% na incorporação de deutério (**Fig. 75B**). As regiões identificadas como de trocas intermediárias para a proteína, na ausência do ligante, não demonstraram muitas mudanças após a adição do ligante. Somente H1, S2, S3, S4, H7 e H8 tiveram seu comportamento modificado após a ligação do ligante, e passaram a ser classificadas como de baixa mobilidade, demonstrando que o ligante de protegeu essas regiões. Esses fragmentos estão localizados próximos aos contatos do ligante e, por isso, estão mais protegidos, apresentando uma dinâmica menor.

Os fragmentos da H2, loop H1-2, loop H2-3, H3, H4, H5, H6 e H9 foram mantidos com taxas intermediárias de trocas H/D, indicando nenhuma modificação estrutural após a formação do complexo proteína-ligante em algumas porções da proteína. A maior mobilidade registrada para a proteína ligada ao T3 foi localizada nas regiões da proteína compostas pelo loop H0-1, n-terminal da H1, S1, c-terminal da H6, S2, c-terminal H11, loop H11-12 e H12, as quais estão muito expostas ao solvente.

A

```
                α1                    α2  β1                        α3
210       220       230       240       250       260       270
    GHKPEPTDEEWELIKTVTEAHVATNAQGSHWKQKRKFLPEDIGQAPIVNAPEGGKVDLEAFSHF
t1  GHKPEPTDEEWELIKTVTEAHVATNAQGSHWKQKRKFLPEDIGQAPIVNAPEGGKVDLEAFSHF
t2  GHKPEPTDEEWELIKTVTEAHVATNAQGSHWKQKRKFLPEDIGQAPIVNAPEGGKVDLEAFSHF
t3  GHKPEPTDEEWELIKTVTEAHVATNAQGSHWKQKRKFLPEDIGQAPIVNAPEGGKVDLEAFSHF
t4  GHKPEPTDEEWELIKTVTEAHVATNAQGSHWKQKRKFLPEDIGQAPIVNAPEGGKVDLEAFSHF
t5  GHKPEPTDEEWELIKTVTEAHVATNAQGSHWKQKRKFLPEDIGQAPIVNAPEGGKVDLEAFSHF
t6  GHKPEPTDEEWELIKTVTEAHVATNAQGSHWKQKRKFLPEDIGQAPIVNAPEGGKVDLEAFSHF
t7  GHKPEPTDEEWELIKTVTEAHVATNAQGSHWKQKRKFLPEDIGQAPIVNAPEGGKVDLEAFSHF
t8  GHKPEPTDEEWELIKTVTEAHVATNAQGSHWKQKRKFLPEDIGQAPIVNAPEGGKVDLEAFSHF

        α3          α4        α5        α6        β2        β3    β4
            280       290       300       310       320       330
    TKIITPAITRVVDFAKKLPMFCELPCEDQIILLKGCCMEIMSLRAAVRYDPESETLTLNGEMAV
t1  TKIITPAITRVVDFAKKLPMFCELPCEDQIILLKGCCMEIMSLRAAVRYDPESETLTLNGEMAV
t2  TKIITPAITRVVDFAKKLPMFCELPCEDQIILLKGCCMEIMSLRAAVRYDPESETLTLNGEMAV
t3  TKIITPAITRVVDFAKKLPMFCELPCEDQIILLKGCCMEIMSLRAAVRYDPESETLTLNGEMAV
t4  TKIITPAITRVVDFAKKLPMFCELPCEDQIILLKGCCMEIMSLRAAVRYDPESETLTLNGEMAV
t5  TKIITPAITRVVDFAKKLPMFCELPCEDQIILLKGCCMEIMSLRAAVRYDPESETLTLNGEMAV
t6  TKIITPAITRVVDFAKKLPMFCELPCEDQIILLKGCCMEIMSLRAAVRYDPESETLTLNGEMAV
t7  TKIITPAITRVVDFAKKLPMFCELPCEDQIILLKGCCMEIMSLRAAVRYDPESETLTLNGEMAV
t8  TKIITPAITRVVDFAKKLPMFCELPCEDQIILLKGCCMEIMSLRAAVRYDPESETLTLNGEMAV

β4  α7          α8                α9                α10
        340       350       360       370       380       390       400
    TRGQLKNGGLGVVSDAIFDLGMSLSSFNLDDTEVALLQAVLLMSSDRPGLACVERIEKYQDSFL
t1  TRGQLKNGGLGVVSDAIFDLGMSLSSFNLDDTEVALLQAVLLMSSDRPGLACVERIEKYQDSFL
t2  TRGQLKNGGLGVVSDAIFDLGMSLSSFNLDDTEVALLQAVLLMSSDRPGLACVERIEKYQDSFL
t3  TRGQLKNGGLGVVSDAIFDLGMSLSSFNLDDTEVALLQAVLLMSSDRPGLACVERIEKYQDSFL
t4  TRGQLKNGGLGVVSDAIFDLGMSLSSFNLDDTEVALLQAVLLMSSDRPGLACVERIEKYQDSFL
t5  TRGQLKNGGLGVVSDAIFDLGMSLSSFNLDDTEVALLQAVLLMSSDRPGLACVERIEKYQDSFL
t6  TRGQLKNGGLGVVSDAIFDLGMSLSSFNLDDTEVALLQAVLLMSSDRPGLACVERIEKYQDSFL
t7  TRGQLKNGGLGVVSDAIFDLGMSLSSFNLDDTEVALLQAVLLMSSDRPGLACVERIEKYQDSFL
t8  TRGQLKNGGLGVVSDAIFDLGMSLSSFNLDDTEVALLQAVLLMSSDRPGLACVERIEKYQDSFL

    α10                α11                α12
            410       420       430       440       450       460
    LAFEHYINYRKHHVTHFWPKLLMKVTDLRMIGACHASRFLHMKVECPTELFPPLFLEVFED   461
t1  LAFEHYINYRKHHVTHFWPKLLMKVTDLRMIGACHASRFLHMKVECPTELFPPLFLEVFED
t2  LAFEHYINYRKHHVTHFWPKLLMKVTDLRMIGACHASRFLHMKVECPTELFPPLFLEVFED
t3  LAFEHYINYRKHHVTHFWPKLLMKVTDLRMIGACHASRFLHMKVECPTELFPPLFLEVFED
t4  LAFEHYINYRKHHVTHFWPKLLMKVTDLRMIGACHASRFLHMKVECPTELFPPLFLEVFED
t5  LAFEHYINYRKHHVTHFWPKLLMKVTDLRMIGACHASRFLHMKVECPTELFPPLFLEVFED
t6  LAFEHYINYRKHHVTHFWPKLLMKVTDLRMIGACHASRFLHMKVECPTELFPPLFLEVFED
t7  LAFEHYINYRKHHVTHFWPKLLMKVTDLRMIGACHASRFLHMKVECPTELFPPLFLEVFED
t8  LAFEHYINYRKHHVTHFWPKLLMKVTDLRMIGACHASRFLHMKVECPTELFPPLFLEVFED
```

85 – 100%
84 – 70 %
69 – 50 %
49 – 35 %
34 – 25 %
24 – 15 %
14 – 0 %

B

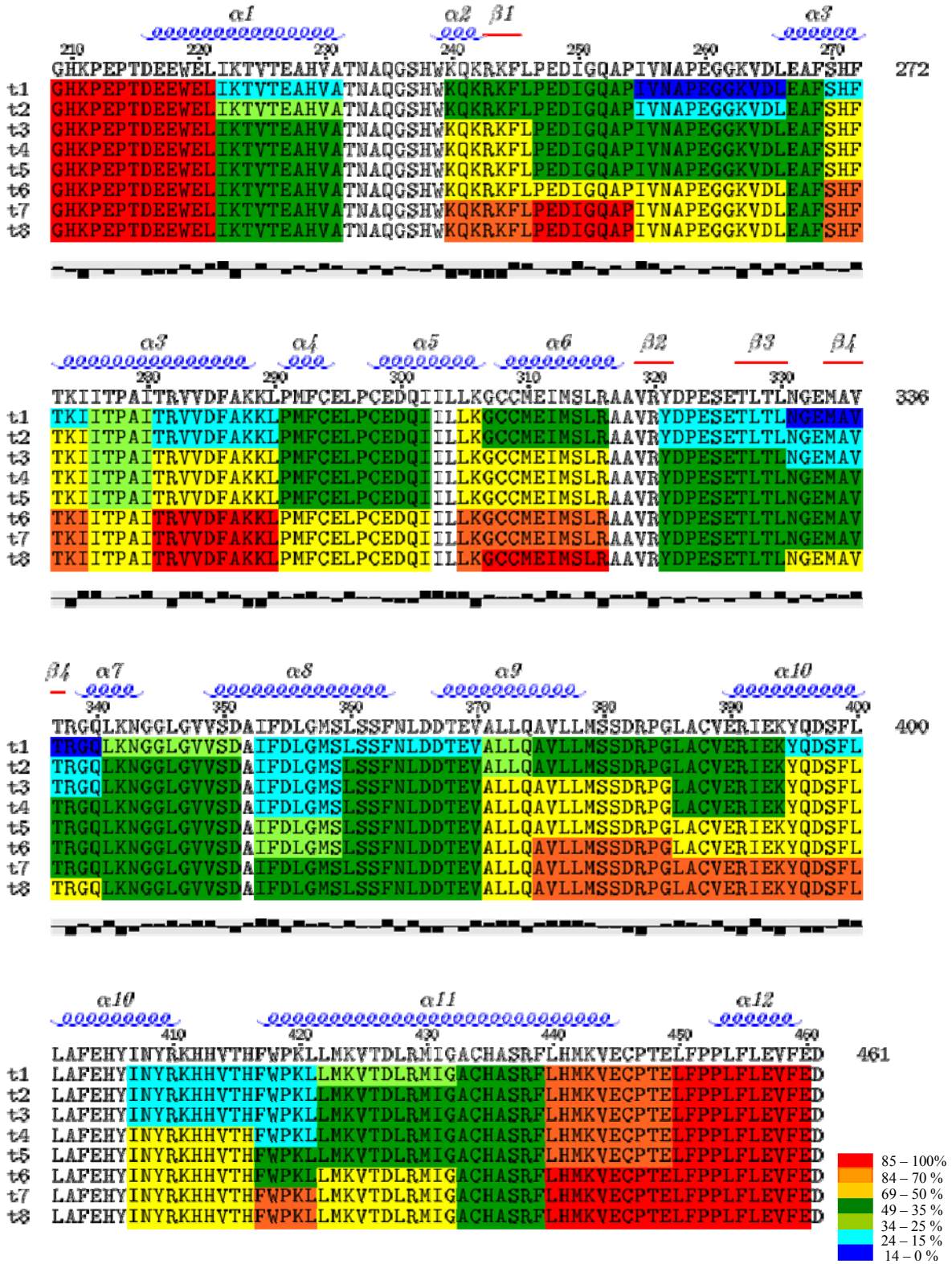


Figura 75 – Alinhamento da seqüência do TR LBD em cada tempo do experimento (t1 a t8 - 1, 3, 8, 15, 60, 180, 300 e 480 minutos). As trocas H/D para apo- e holo- TR estão representadas por **A** e **B,** respectivamente. As taxas de deutério incorporado estão representadas na figura pelas cores: vermelho demonstra incorporação maior que 85%; laranja, de 85 a 70%; amarelo, entre 70 e 50%; verde escuro, entre 50 e 35%; verde claro, entre 35 e 25%; e azul, abaixo de 15%. A estrutura secundaria foi determinada pelo programa DSSP e está representada por α1 - α12 para α-hélices e β1 - β4, para fitas. A última linha representa a hidrofobicidade de cada resíduo.

As diferenças no padrão de incorporação de deutério entre apo- e holo-TR são claras entre as duas formas do TR (**Tab. 10**). O apo-TR é bastante flexível, com taxas de troca que variam entre 45 a 80%, de 1 a 480 minutos de exposição ao D_2O. O complexo TR-T3 se apresentou mais estável e com uma estrutura mais rígida, com taxas de troca variando entre 36 a 66%, para todo o tempo do experimento.

Tabela 10 - diferenças no padrão de incorporação de deutério.

Estrutura[a]	Resíduos[b]		Carga[c]	Apo TR (%)[d]	Holo TR (%)[e]	Apo – Holo[f] (%)
H0-H1/H1	209	222	1	100	100	0
H1	223	233	1	88,8	44,4	44,4
H1-H2	234	241	1	100	83,3	16,6
S1/H2	241	248	1	100	100	0
H2-H3	248	257	1	66,6	66,6	0
H2-H3	255	268	1	50	50	0
H3	268	271	1	100	80	20
H3	271	277	1	66,6	66,6	0
H3	277	281	1	66,6	66,6	0
H3	278	282	1	66,6	88,8	-22,2
H3	282	292	1	81,8	54,5	27,2
H4/H5	302	314	1	77,7	77,7	0
H5/H6	306	316	1	100	90	10
H5/H6	307	318	1	76,98	46,1	30,7
S3	322	333	1	60	60	0
S4/H7	331	342	1	70	50	20
H7/H8	342	352	1	66,6	50	16,6
H8	354	360	1	70	50	20
H8/H9	361	371	1	100	66,6	33,3
H9	372	376	1	80	80	0
H9/H0-H10	376	386	1	87,5	75	12,5
H10	387	396	1	100	80	20
H10	396	402	1	55,5	55,5	0
H10/H10-H11	408	418	1	75	75	0
H11	418	423	1	80	70	10
H11	423	434	1	83,3	50	33,3
H11	434	441	1	100	100	0
H11/H11-H12	441	451	1	100	100	0
H12	451	456	1	100	100	0
H12	455	460	1	100	100	0

[a] localização dos peptídeos na estrutura [b] número de resíduos no inicio e fim do peptídeo. [c] carga do peptídeo. [d] porcentagem de incorporação de deutério para apo-TR. [e] porcentagem de incorporação de deutério para holo-TR. [f] diferenças na incorporação de deutério entre apo- e holo-TR. H1 a H12, são as hélices-α e S1-S4, são as fitas-β; os *loops* estão representados por H1-H2, H2-H3, e assim por diante

As maiores mudanças conformacionais entre os peptídeos da proteína ligada e não ligada ao T3 estão claramente evidenciadas pelas diferenças significativas na troca H/D após a exposição ao deutério, em condições experimentais idênticas (**Fig. 76**). As maiores diferenças estão relacionadas à presença do ligante, o qual obstrui estericamente o sítio ativo, impedindo o acesso ao solvente e enrijecendo a estrutura protéica. A região que apresentou maior grau de proteção contra troca H/D, antes da ligação do ligante é o peptídeo formado pelo C-terminal de H3 (AAs 281-290)

Em geral pode se observar que as diferenças na incorporação entre apo- e holo-TR (% D_2O em apoTR - % D_2O em holoTR) refletem valores positivos (**Tab. 10**) indicando maior proteção na presença do ligante. A única exceção a essa regra é representada pelo peptídeo 281-290, que se apresenta protegido antes da adição do ligante e perde essa proteção após a adição do mesmo, o que se reflete nos valores negativos da tabela. Esse peptídeo está localizado na região de interação com o correpressor, provavelmente mais estruturado na ausência do ligante. A adição do T3 deve promover modificações estruturais nessa região, deixando-a mais exposta ao solvente.

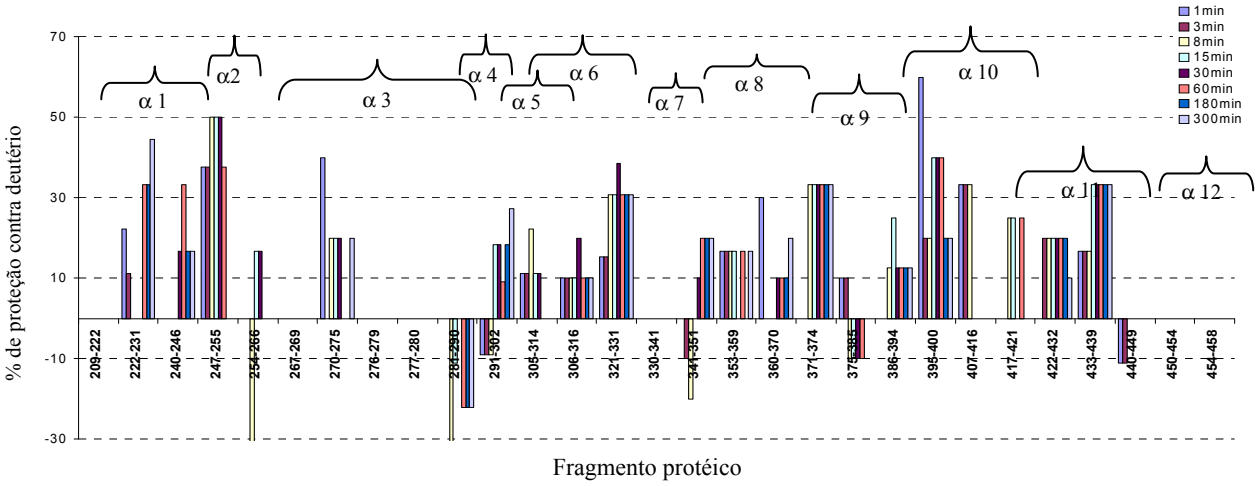


Figura 76 - Gráfico da diferença de incorporação de deutério entre apo- e holo-TR. Este gráfico demonstra as diferenças de incorporação para cada peptídeo, em cada tempo de exposição. α 1-12 representam as posições das α-hélices.

As regiões N- e C-terminal, as quais incluem o *loop* H0-H1 e o N-terminal da H1 (AAs 209-222), H11, *loop* H11-H12 e H12 (AAs 434-460), demonstraram ser as mais

móveis, com as maiores taxas de troca. Esses segmentos estão altamente expostos ao solvente, com a incorporação de deutério variando de 92% a 100% nos primeiros cinco minutos do ensaio (**Fig. 76**). A presença do hormônio não afetou essa região, as quais também apresentaram altas taxas de troca H/D.

O apo- e holo-TR, quando são comparados em termos do tempo total do experimento, apresentaram o mesmo comportamento nas regiões que compreende os peptídeos que compõem o *loop* H0-H1, H1(AA 209 -222), S1(AA 241 – 248), H2 (AA 248-257), *loop* H2-H3 (AA 255-268), N-terminal da H3 (AA 271-281), H4 e N-terminal de H5 (AA 302 – 314), S3 (AA 322-333), C-terminal da H10 e o *loop* H10-H11(AA 396 – 418), C-terminal da H11 (AA 434-441) , *loop* H11- H12 e H12 (AA 441 – 460). Isso indica que o ligante pode não influenciar as partes mais externas da proteína, ou que as mudanças ocorram principalmente nos primeiros minutos do experimento. No tempo global do experimento (300 min.) existe a tendência das taxas de troca se igualarem pela alta exposição ao solvente contendo D_2O. Apesar de algumas dessas regiões, como H3, S3, H11 e H12, conterem resíduos que fazem contatos com o ligante, todas elas estão expostas ao solvente.

As maiores movimentações na estrutura protéica encontradas após a formação do complexo TR-T3, nos tempos iniciais do ensaio, foram localizadas nas hélices 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11 e as fitas-β 3 e 4. As hélices 5, 6 e 9 compõem o cerne da estrutura em sanduíche da proteína, nessa região a grande distinção no ganho de deutério se deve ao fato de que a adição do ligante promove um enrijecimento desses peptídeos e a ausência do mesmo deixa a estrutura mais móvel. Porém, a parte da proteína que apresenta a maior diferença na assimilação de deutério, após a ligação do T3 (44%), é a hélice 1. Ainda não se sabe se esta região interage diretamente com o ligante, porém a ligação do T3 pode induzir a mudanças conformacionais que protejam essa região; e, além disso, existem indícios de que a *hinge* (H0) apresenta grandes mudanças conformacionais após a ligação do ligante, o que pode induzir a movimentações da H1.

As estruturas cristalográficas dos domínios de ligação ao ligante dos receptores nucleares (RNs) têm esclarecido regras estruturais da ligação hormônio-proteína. As estruturas do TR ligado a diversos ligantes demonstram que eles geralmente se encontram enterrados na estrutura do receptor, tornando a proteína mais compacta.

O padrão de troca H/D para o TR LBD demonstra diferenças relevantes entre o TR complexado ao ligante o TR livre, as principais diferenças estão localizados justamente na região de ligação ao ligante, o que corrobora com as interações e mudanças conformacionais propostas pelas estruturas cristalográficas. As diferenças nos padrões de troca H/D são mais evidenciadas quando a estrutura do TR é colorida de acordo com a diferença de incorporação de deutério entre apo- e holo-TR (**Fig. 77**).

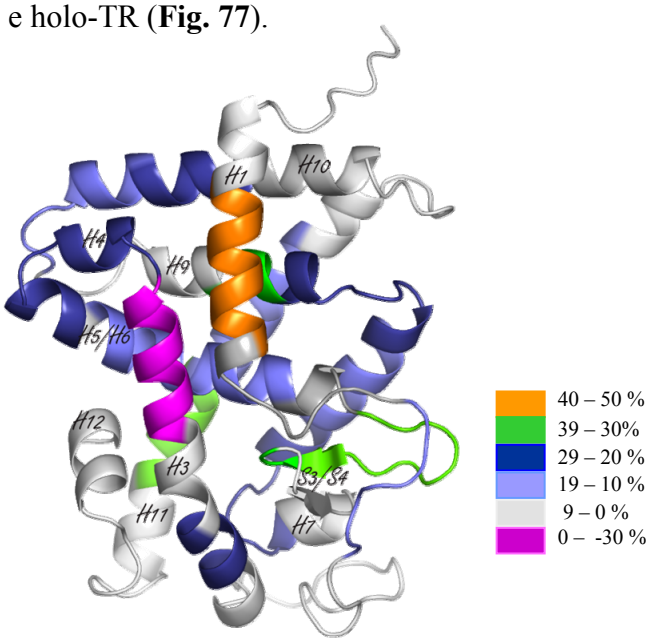


Figura 77 – Estrutura do TR β LBD colorida de acordo com as diferenças na tomada de deutério entre apo- e holo-TR. O gradiente de cores indica como as duas formas das proteínas se comportam de maneira diferente. A parte em rosa indica que TR+T3 apresentou uma mobilidade que variou de 0 a 30% a mais que o apo-TR. As demais cores indicam as regiões do apo-TR que apresentam maior mobilidade, com variação de 0 a 50%.

A proteção da estrutura contra a troca H/D, gerada pelo ligante, foi mais evidenciada nos peptídeos que contem resíduos que possuem contatos diretos com o ligante. Estes estão localizados na H3 (F269, T273, I276, T277 e I280), H6 (M310, E311, S314 e A317), S3 (N331), H7/H8 (G345, L346, F354), H11 (A436, L440 e K443) e H12 (F459). Quando se observa a incorporação de deutério para cada tempo do experimento, é possível observar que para H3 a proteção ocorre de maneira muito rápida no primeiro minuto de ensaio

(principalmente para os resíduos 271 a 277); nos outros períodos, as taxas entre apo- e holo-TR se tornam similares. As hélices 6, 7 e 8 demonstraram grande diferença na tomada de deutério quando se compara apo- e holo-TR. O N-terminal e o meio da H6 apresentam quase 10% de diferença entre cada situação, já o C-terminal do fragmento apresenta a maior diferença de incorporação encontrada. Para as hélices 7/8, a diferença de trocas H/D alcança quase 20% para apo- e holo-proteína; na fita β S3, essa diferença alcança 30% na comparação. Um caso curioso é a incorporação observada nas hélices 11 e 12; as quais, segundo esses resultados, são muito expostas ao solvente nas duas situações (proteína ligada e não ligada ao T3), não apresentando nenhuma diferença de incorporação.

A **figura 78** representa a estrutura do TR β LBD complexado ao T3 e em sua forma apo (PDB ID 2H6W) colorido de acordo com a porcentagem de incorporação de deutério em cada ponto do experimento (T1 – 1min, T2 – 3min, T3 – 8min, T4 – 15 min, T5 – 60min, T6 – 180min, T7 – 300min, T8 – 480min.). Observamos que entre o T1 e T6 as mudanças na tomada de deutério entre TR+T3 e TR são bastante grandes o que não ocorre nos últimos tempos do experimento, onde as diferenças são bem menores. Também é possível verificar nessa figura que a região do sítio ativo é a mais significativa em termos de diferenças nos padrões de troca H/D. O padrão de cores apresentado no sítio ativo da proteína vai do azul ao amarelo (taxas baixas a intermediárias) para a proteína ligada ao T3; para o apo-TR, este vai do amarelo ao vermelho, apresentando taxas intermediárias a altas.

A dependência do tempo na tomada de deutério para apo- e holo-TR indicam que 15 peptídeos apresentam nenhuma mudança na incorporação de D_2O. Desses peptídeos, somente H3 e H12 fazem contato com o ligante, mas são muito expostos ao solvente. A maior parte destes peptídeos apresentam uma diferença inicial nas trocas H/D entre apo e holo-TR maior que 30% (N-terminal da H1, H3, H5, H6, H10 e H11). A maior diferença na tomada de deutério foi observada nos primeiros 15 minutos de exposição ao deutério, indicando uma troca muito rápida. Em muitos casos, para o holo-TR, as taxas de troca foram reduzidas pela

proteção do ligante, mas em 300 minutos o número de hidrogênios trocados começa a ser semelhante em ambos os casos.

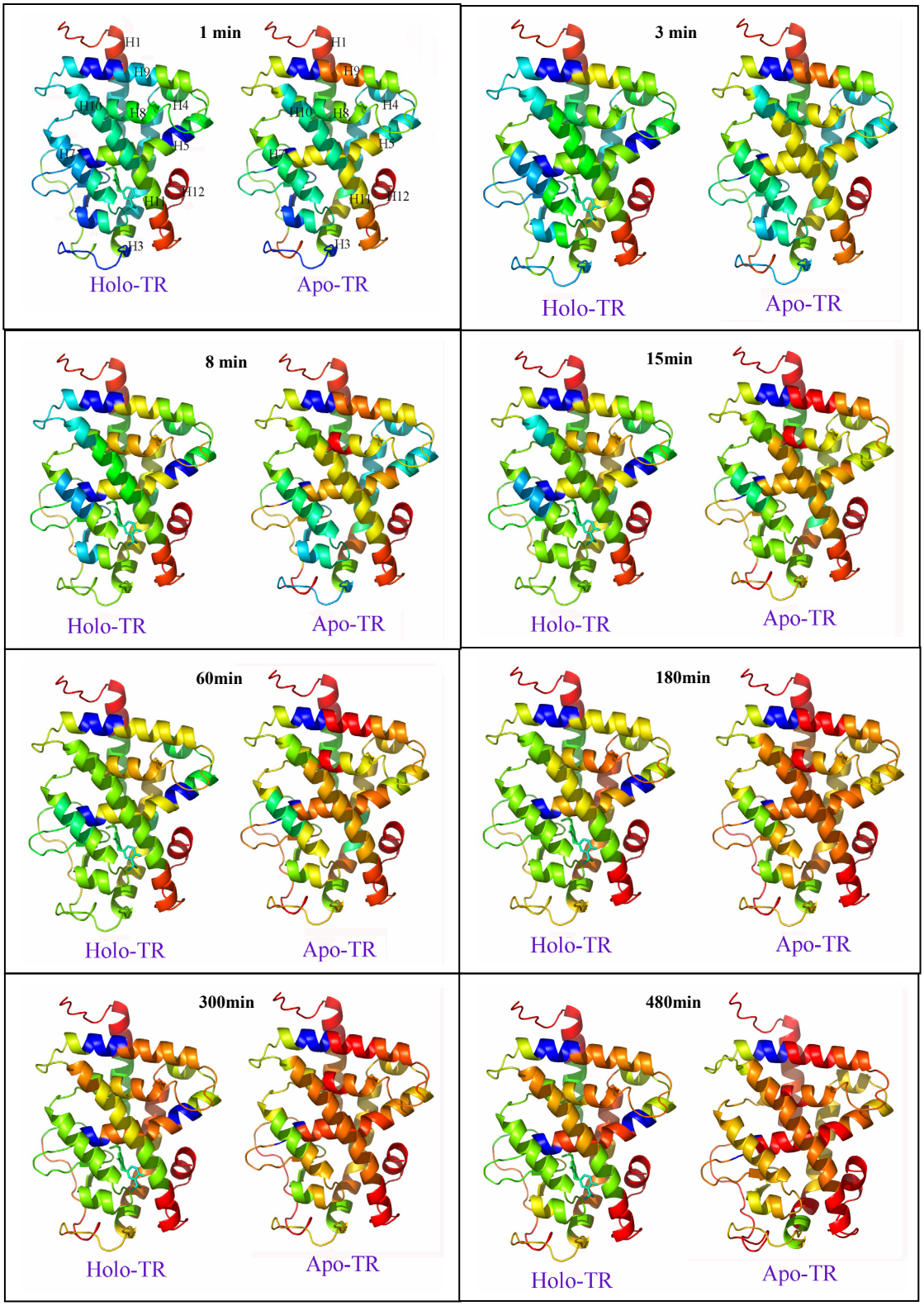


Figura 78 – Holo- e apo-TR coloridos de acordo com a incorporação de deutério de cada peptídeo, nos 8 tempos do experimento (1min, 3min, 8min, 15 min, 60min, 180min, 300min, 480min.). O degradê de cores, do azul ao vermelho, representado nas figuras, indicam baixas a altas taxas de incorporação de deutério.

Esses fatos confirmam que holo-RNs são mais compactos que apo-RNs. A proteção do ligante contra trocas de D_2O é mais evidente nos resíduos que fazem contato com o ligante (H3, H6, H8 e S3). Além disso, a troca H/D é mais evidente nos resíduos que compõem o corpo da proteína (H5, H6, H9 e H10). A troca H/D em TR também revela que o C-terminal da H1 e o *loop* H1-2 são afetados pela presença do ligante, indicando uma mudança conformacional nessas regiões após a ligação do ligante. Entretanto, um resultado curioso é observado pela H11 e H12, as quais fazem contatos com o ligante, mas demonstram muito pouca (H11) ou nenhuma (H12) proteção após a ligação do T3, talvez isso ocorra porque essas hélices são muito expostas ao solvente.

A comparação entre os fatores de temperatura (fator-B) da estrutura cristalográfica do holo-TR (PDB ID 2H6W) e os dados obtidos para a troca de H/D apresentaram padrões similares entre os resíduos que apresentaram alta e baixa mobilidade (F**ig. 79**). O gráfico que compara a incorporação de D_2O e os fatores de temperatura médios para cada peptídeo demonstra um padrão similar de mobilidade.

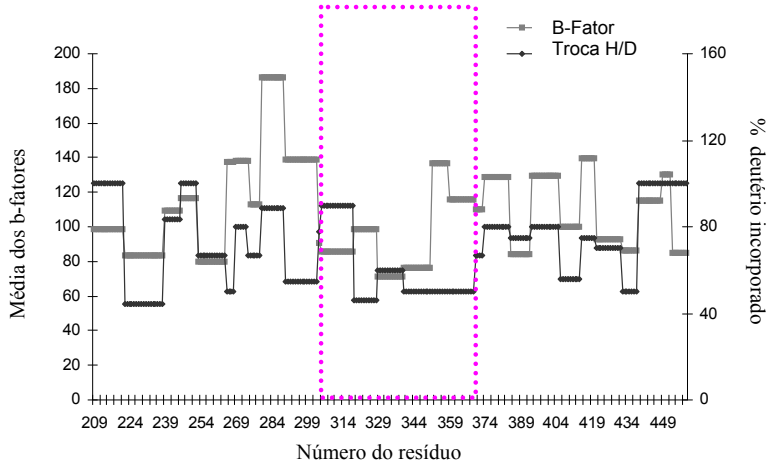


Figura 79 – Comparação entre os fatores de temperatura obtidos do cristal do TR β1 LBD (2H6W), em cinza claro, com a taxa de incorporação de deutério, cinza escuro, para cada peptídeo estudado. No quadro em rosa tem-se a região onde o padrão de mobilidade é diferenciado para as duas medidas.

Cerca de 70% dos resíduos apresentam valores correspondentes entre fatores de temperatura e incorporação de deutério. Somente 27% dos resíduos, os quais compreendem a região formada pelos peptídeos que formam H6, H7, S2, S3, S4 e N-terminal de H8, não apresentaram similaridade entre os valores de incorporação de deutério e os fatores de

temperatura. Dado que os valores dos fatores de temperatura representam uma indicação de mobilidade de cada resíduo, essa comparação foi importante para demonstrar a veracidade dos resultados. As diferenças encontradas podem estar relacionadas a contatos cristalinos entre resíduos vizinhos no cristal, levando-se em conta que os experimentos de troca H/D foram realizados em solução, alguns desses contatos podem estar mais soltos, ou até, inexistentes.

7.3. Discussão dos Resultados

Os resultados apresentados confirmam que o holo-TR apresenta-se mais compacto que o apo-TR, em termos de acessibilidade ao solvente[38]. A proteção contra a troca com deutério presente no solvente é mais evidente nos resíduos que fazem contato com o ligante (N-terminal de H3, H6, H8 e S3), além disso, a troca H/D é menor nos resíduos que compõem o cerne da proteína (H5, H6, H9 e H10). Esses experimentos também demonstram que o C-terminal da H1 e o *loop* H1-H2 são afetados pela presença do ligante, indicando mudanças conformacionais após a ligação do T3. Entretanto, as hélices 11 e 12, que também fazem contato com o ligante, demonstraram pouca (H11) ou nenhuma proteção (H12) após a adição do ligante, apresentando alta mobilidade e exposição ao solvente, o que pode ser explicado por sua localização externa.

A dependência temporal na tomada de deutério entre o receptor, ligado ou não ao T3, indica que, aproximadamente, 15 peptídeos não apresentaram grandes modificações na incorporação de deutério, sendo eles compostos principalmente por *loops* bastante expostos e pela H12. As maiores diferenças nas taxas de troca entre apo e holo TR foram observadas nos primeiros 15 minutos do ensaio, indicando uma cinética rápida da proteína, a qual interage fortemente com o solvente. Na maioria dos casos, após as cinco horas de trocas H/D, as taxas de incorporação entre apo e holo receptor foram muito similares (**Fig. 80**).

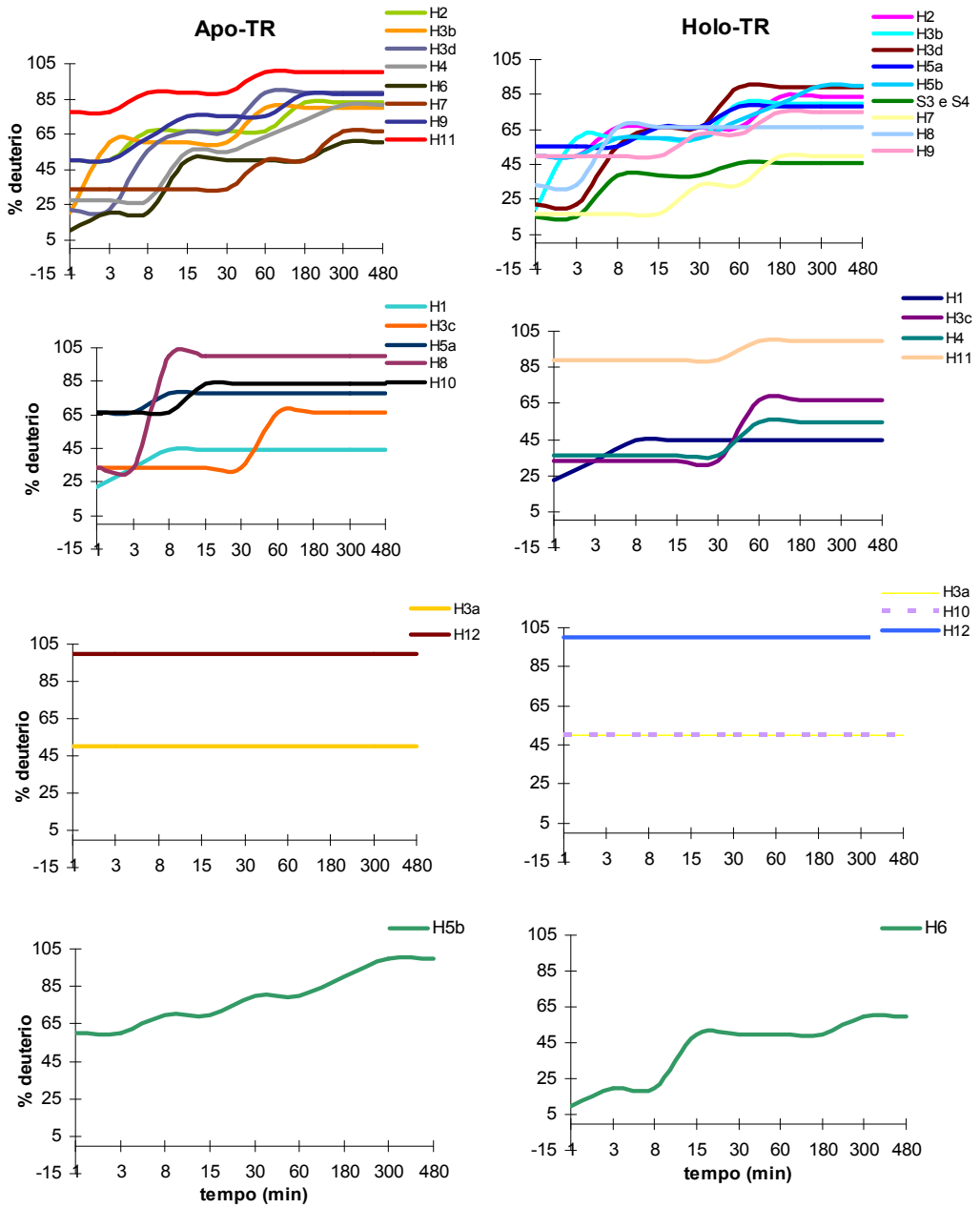


Figura 80 - Cinética de incorporação de deutério, nos diferentes tempos do experimento para cada peptídeo correspondente às hélices H1, H2, H3 (a, b e c, são o N-terminal, o meio e o C-terminal da H3), H4, H5 (a e b são o N-terminal e o c-terminal), H6, H7, H8, H9, H10, H11 e H12 e as fitas-β S3 e S4. Com esses gráficos é possível observar as diferenças na tomada de D_20 para apo- e holo-TR.

A baixa flexibilidade do C-terminal de H3 na ausência do ligante pode ser causada por uma maior estruturação dessa região ou por contatos adicionais entre os aminoácidos da proteína, porém como a estrutura do apo-TR é desconhecida não se pode afirmar a causa dessa proteção. Poderia se especular que essa proteção é causada por uma interação adicional entre a H12 e a H3. A estrutura cristalográfica do ER complexado com um agonista parcial, raloxifeno apresenta esse tipo de interação entre a H12 e o sítio do coativador[176]. Nessa

estrutura a H12 interage com um sulco formado entre H3, H4 e H5, em uma orientação antagonista. Esse posicionamento antagonista poderia ser uma explicação razoável para a proteção observada na H3 do TR, na ausência do T3. Outro estudo com ER revelou que a H12 compete com peptídeos correpressores por essa mesma região[186]. Essas interações explicariam uma nova maneira de regulação do TR na ausência de seu ligante cognato. Entretanto, não foi verificada proteção em H4 e H5 e nem, mesmo em H12, que justificaria essa interação. Baseados nessas premissas foram realizados estudos de troca de H/D para um mutante do TR, desprovido da H12 (TR F451x), porém a mesma proteção foi observada o que levou ao descarte dessa hipótese.

Os experimentos de troca H/D realizados com os receptores PPAR e RXR[183, 185] propuseram que as principais diferenças encontradas nesses RNs foram detectadas em H3, H5, H7 e H11, para o RXR e H3, H5, H6, H7, H11 e H12 para o PPAR. Os dados apresentados para o TR concordam com esses estudos, entretanto, o TR também parece ser mais afetado pelo solvente e menos compacto que essas proteínas, pois apresenta taxas de trocas maiores e regiões mais flexíveis que RXR e PPAR, como H1, *loop* H1-H2, S4, H8, H9 e H10. As hélices 11 e 12 também se apresentaram com alta flexibilidade na comparação entre os estudos.

O RXR também apresentou uma alta proteção na região que compreende a interface de dimerização[183] (H9, H10 e H11). Para o TR, essa região apresentou taxas de troca que vão de intermediárias a rápidas, indicando pouca proteção nessa região, com isso, se conclui que os dímeros formados pelo LBD do TR devem ser mais instáveis que os de RXR.

A alta mobilidade da H12 é contraria ao mecanismo de ratoeira proposto, o qual sugere uma transconformação do LBD induzida pelo ligante[38, 187, 188]. De acordo com essa proposta, o ligante é atraído pela cavidade hidrofóbica, induzindo um reposicionamento da H11. Esse mecanismo faz com que a H12 se desloque, movimentando a H3, e trazendo o Ω-*loop* para próximo da H12[38, 187]. Talvez esse mecanismo também ocorra para o TR no

ambiente celular e a presença do coativador seja crucial para a estabilização deste novo posicionamento da H12.

Estudos de dinâmica molecular do TR LBD demonstraram que existem dois principais caminhos de dissociação do ligante[71, 187, 188]. Uma dessas rotas de dissociação envolve o deslocamento da H12 para longe do LBD, permitindo o escape do ligante através de uma abertura formada entre H3 e H12[71, 188]. O outro caminho envolve uma região bastante móvel do LBD, a qual compreende H3, o *loop* entre H1 e H2 próximo das fitas-β S3 e S4 [71, 188]. Os dados de troca H/D para o TR LBD revelam que essa região possui uma mobilidade considerada de média a alta, na presença do ligante, com o aumento do tempo de exposição de D_2O. Essa região apresentou de 42% a 83% de incorporação para o *loop* H1-H2, 20 a 88% para H3, 88% a 100% para H12 e 10 a 60 % para as fitas-β. Com esses resultados seria possível especular que talvez essa mobilidade seja resultado de possíveis dissociações do ligante do sítio do receptor. Com base nessa idéia, o caminho 1 seria o preferencial para o escape do ligante, o que pode ser explicado pela grande mobilidade de H3 e H12, e o outro caminho também seria uma alternativa para a saída do ligante do sítio do receptor. Esses resultados também estão de acordo com as simulações de dinâmica molecular, que indicam o primeiro caminho como sendo preferencial e o segundo, uma alternativa[71, 183]. Em suma, os resultados obtidos para o TR permitem não somente predições sobre a dinâmica e estabilidade do receptor na presença e ausência do T3, mas também podem contribuir com estudos de rotas de dissociação do ligante.

Capítulo 8 – Conclusões e Perspectivas do Trabalho

8.1. Conclusões dos Resultados.

Esse trabalho permitiu a descoberta de novos conhecimentos sobre os receptores dos hormônios tireoidianos, os quais proporcionaram avanços no entendimento dos mecanismos de ação deste receptor. Os resultados apresentados discorrem sobre a utilização de diferentes técnicas biofísicas e bioquímicas para o estudo do TR, apresentando como essa macromolécula se comporta em termos de estados de oligomerização e ligação ao DNA.

Além disso, eles também apresentaram modelos estruturais de baixa resolução do receptor em diferentes estados e quais são as principais movimentações que ocorrem na estrutura do domínio de ligação ao ligante após a adição do hormônio T3 à proteína.

A partir dos estudos de oligomerização (capítulo 4) pode-se concluir que o TR é capaz de formar oligômeros em solução. Os tetrâmeros foram encontrados somente para o TR β1 DBD-LBD, mas não para o TR α1 DBD-LBD ou TR α1 completo. Mais ainda, quando esses estudos foram realizados com construções menores da isoforma β1 do receptor, os tetrâmeros também não foram identificados. Outra importante descoberta realizada nesse trabalho foi a constatação que a presença do ligante induz à dissociação dos tetrâmeros do TR β1 DBD-LBD em dímeros, provavelmente, para a ativação do receptor. Além do mais, foi observado que, para a isoforma α1, a presença do ligante não alterou o estado oligomérico do receptor.

A análise de todos esses dados resulta no melhor entendimento do comportamento do TR em solução. Primeiramente, pode-se concluir que a formação de tetrâmeros também ocorre com o TR e não somente com o RXR, conforme descrito na literatura. Além disso, a tetramerização demonstrou ser um evento isoforma-específico para o TR, o que pode resultar em formas de regulação diferentes e específicas para o TR α e o TR β. Finalmente, também foi descoberto que a capacidade de tetramerização do TR β1 ocorre somente em construções que contenham os domínios de ligação ao ligante e de ligação ao DNA, dado que somente o domínio LBD não apresentou essa capacidade.

Os resultados do espalhamento de raios-X a baixos ângulos (capítulo 5) permitiram que fossem gerados modelos de baixa resolução das duas isoformas do receptor em construções contendo, no mínimo os domínios LBD e DBD, além de um dos receptores completos, em diferentes situações: com e sem ligante e na presença do HRE F2. Com isso, foi possível, pela primeira vez, se propor modelos estruturais de construções maiores do receptor e, com a ajuda das estruturas cristalográficas dos domínios separados do TR, foi possível se estabelecer modelos de alta resolução do TR, os quais foram gerados com base

nos envelopes medidos. Esses dados apresentam um grande avanço em termos de estudos estruturais do TR, visto que, até o presente momento, não existem estruturas cristalográficas contendo mais de um domínio do TR. Com base nesses resultados, torna-se possível o melhor entendimento sobre as disposições desses domínios em uma estrutura mais completa do receptor, além da possibilidade de inferências sobre possíveis interações que possam ocorrer entre os domínios.

Os resultados de SAXS também confirmam os resultados apresentados nos estudos de oligomerização e as diferenças que ocorrem entre as isoformas. Além disso, é possível observar poucas diferenças estruturais entre os modelos gerados, dentro dos limites de resolução dos modelos. A principal diferença observada foi a maior mobilidade dos DBDs nos dímeros do TR α1, os quais se apresentam mais abertos que os DBDs dos dímeros do TR β1. Os tetrâmeros do TR β1 apresentam-se mais estruturados, com os DBDs possivelmente interagindo entre si. Essa interação entre os DBDs também pode ser extrapolada para o dímero do TR α1 completo, dado o pequeno distanciamento existente na região em que esses domínios se localizariam no envelope, a qual provavelmente pode ser um resultado da presença da região amino terminal. Além dessas conclusões, foi possível observar que o TR α1 parece apresentar uma torção entre o plano que contém os LBDs e o plano que contém os DBDs, o que não é observado no envelope do TR β1, o qual se apresenta mais achatado.

Os estudos de anisotropia de fluorescência da ligação do TR a quatro diferentes elementos responsivos de DNA (capítulo 6) permitiram que, pela primira vez, fossem apresentadas constantes de dissociação do TR aos HREs, as quais resultaram em análises de seletividade do receptor aos diferentes arranjos de DNA nos quais o TR se liga. Além disso, foi constatado que a presença do LBD auxilia no aumento da seletividade do receptor aos HREs, talvez pela presença da interface de dimerização a qual fornece um melhor posicionamento do TR a determinados HREs. A preferência do TR β1 aos HREs seguiu a

seguinte ordem de preferência: F2>TREpal≈ DR-4>DR-1, o TR α1 completo apresentou uma outra ordem de preferência: F2>>TREpal≈DR-4≈DR-1.

Outra constatação foi de que a presença do cloreto de magnésio influencia na seletividade do receptor aos diferentes elementos responsivos, impedindo que interações inespecíficas ocorram e coordenando melhor os grupos fosfatos do DNA, para que ocorra uma ligação mais específica. A adição do ligante, nos experimento realizados com o TR α1 completo, demonstrou que essa isoforma apresenta uma afinidade mais alta para F2, porém a ligação passou de cooperativa, para anti-cooperativa, indicando uma possível preferência de monômeros na ligação do F2, na presença do T3.

Por fim, os experimentos de troca de hidrogênio por deutério, monitorados por espectrometria de massas (capítulo 7), revelam que o LBD do TR apresenta-se bastante exposto ao solvente e que a adição do T3 promove a compactação do receptor em termos de acessibilidade ao solvente. Os experimentos demonstraram que as regiões que fazem contato com o ligante (H3, H6, S3 e S4) se apresentam protegidas do solvente após a adição do ligante, porém, a H12 não apresentou diferenças quanto à acessibilidade ao solvente, o que pode significar que talvez a presença do coativador seja necessária para a estabilização e proteção dessa hélice.

Os peptídeos que compõem o cerne protéico não apresentaram modificações nas trocas H/D, demonstrando que o ligante não promove modificações conformacionais nestas regiões. Outra constatação foi que as trocas H/D ocorrem de maneira bastante rápida, geralmente nos primeiros minutos do ensaio e que, após esse tempo existe a tendência das trocas se igualarem nas duas preparações da proteína. Além disso, também foi verificado que existe uma proteção no peptídeo formador da parte C-terminal da H3 na ausência do ligante, indicando que esta região pode estar mais estruturada e compactada, na ausência do ligante, e que a adição do mesmo pode promover mudanças conformacionais nesta região, deixando-a mais flexível.

Esses resultados apresentam novas informações sobre o comportamento dos TRs, as quais podem modificar ou acrescentar fatos a alguns modelos de funcionamento já propostos para esse receptor. Os principais resultados apresentados nesse estudo foram publicados em revistas científicas indexadas internacionalmente (Anexo 1), ou estão sumarizadas em manuscritos, os quais estão em fase de correção e deverão ser submetidos para posterior publicação. O melhor entendimento sobre o conhecimento dos mecanismos de ação dos receptores nucleares tem sido muito procurado para a proposição de regras para seu controle, o que pode resultar no combate a diversas patologias em que estão envolvidos. É importante ressaltar que estas são metas com imediato impacto na procura racional de agonistas ou antagonistas hormonais e se insere dentro de uma perspectiva de promoção do desenvolvimento científico-tecnológico na área de receptores nucleares com vínculos estreitos aos interesses da indústria farmacêutica, da medicina e do setor produtivo.

8.2. Perspectivas

Apesar dos resultados apresentados nesse trabalho possuírem forte impacto e sugerirem a proposição de novos modelos funcionais e estruturais do TR, muito ainda deve ser feito no campo desses receptores para que o entendimento profundo de seus modos de ação seja alcançado.

Novos estudos estruturais buscando-se a resolução de estruturas do receptor em sua forma apo, ou complexados com antagonistas, ou em busca de uma estrutura mais completa do receptor seriam de extrema importância para o entendimento estrutural do receptor e para a proposição de novas moléculas que possam atuar como agonistas e antagonistas do TR.

Além disso, estudos de complexação desses receptores a moléculas correguladoras e ao DNA poderiam ampliar o conhecimento sobre os mecanismos de regulação da transcrição de determinados genes e fornecer detalhes finos sobre a interação que ocorrem nesses complexos. Estudos que foquem a formação de heterodímeros do TR com outros receptores

nucleares e sua ligação a diferentes HREs que sejam compostos por promotores estruturais também ampliariam muito o entendimento de como essas moléculas estão envolvidas na regulação da transdução de sinais que ocorrem nos receptores nucleares.

Muito ainda deve ser feito para o exato conhecimento dos mecanismos de atuação dessas macromoléculas, as quais estão envolvidas em processos vitais e altamente complexos de diversos organismos, porém estas são metas de impactos imediatos para a integração de várias informações obtidas até o momento sobre a regulação dos receptores nucleares, com isso pode-se avançar um pouco mais no conhecimento das funções dos receptores nucleares e na forma que esses se complexam a outras proteínas para a ativação ou repressão da transcrição de genes-alvos.

Capítulo 9 – Referências

1. NELSON, D.L., COX, M.M. *Lehninger-Principles of biochemistry*. 4ed. New York: Sarvier, 2005, p.420-468.

2. LAUDET V., GRONEMEYER H. *The nuclear receptors Facts book.* 2ed. London: Academic Press, 1995, p.1-109.

3. LAZAR, M.A. Mechanism of action of hormones that act on nuclear receptors. LARSEN, P. R. *et al* In *Williams textbook of endocrinology.* Philadelphia: W.B. Saunders Co., 2003, p. 35–44.

4. EGEA, P.F. *et al.,* Crystal structure of the human RXRalpha ligand-binding domain bound to its natural ligand: 9-cis retinoic acid. *EMBO J.* v. 19, p. 2592-2601, 2000.

5. GIGUERE, V. *et al.,* Identification of a new class of steroid hormone receptors. *Nature* v. 331, p.91–94, 1988.

6. GIGUERE, V. Orphan Nuclear Receptors: From Gene to Function. *Endocrine Reviews*. v. 20, p. 689-725, 1999.

7. EVANS, R. M. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* v. 240, p. 889−895, 1988.

8. DIAS, S. M. G. Estudos estruturais dos receptores nucleares humanos dos hormônios tireoidianos isoforma β1 (hTRβ1) e do ácido retinóico 9-cis isoforma α (hRXRα).2004. 278 p. Tese de doutorado (doutorado em ciências - fisica aplicada - área de concentração física biomolecular) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2004.

9. MAGLICH, *et al.*, Comparison of complete nuclear receptor sets from the human, Caenorhabditis elegans and Drosophila genomes. *Genome Biol.2.* v. 8, p.299-303, 2001.

10. RIBEIRO, R.C.J. *et al.,*. The molecular biology of thryroid hormone action. *Annals New York Academy of Sciences*. v. 758. p. 366-389, 1995.

11. ESCRIVA, H., DELAUNAY, F., LAUDET, V. Ligand binding and nuclear receptor evolution. *Bioessays.* v. 22, n.8, p.717-27, 2000.

12. VANACKER, J.M. *et al.,* Transcriptional activities of the orphan nuclear receptor ERR alpha (estrogen receptor-related receptor-alpha). *Mol. Endocrinol.* v.13, n.5, p.764-73, 1999.

13. ARANDA, A., PASCUAL, A. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiological Reviews.* v. 81, n.3, p.1270-1295, 2001.

14. KLIEWER, S.A., LEHMANN, J.M., WILLSON T.M. Orphan nuclear receptors: shifting endocrinology into reverse. *Science.* v.284, p.757-60, 1999.

15. MANGELSDORF, D.J. *et al.* Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway. *Nature*. v. 345, p.224-229, 1990.

16. KELLER, H. *et al.,* Fatty acids and retinoids control lipid metabolism through the activation of PPAR/retinoid-X-receptor heterodimers. *Proc. Natl. Acad. Sc.* v. 90, p.2160-2164, 1993.

17. LEHMANN, J.M. *et al.* Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defynes a new hormone response pathway. *J. Biol. Chem.* v. 272, p. 3137-31340, 1997.

18. KLIEWER, S.A. *et al.* Expression of the Pregnane X Receptor in Mice Antagonizes the Cholic Acid–Mediated Changes in Plasma Lipoprotein. *Profile Cell*. v. 92, p.73-82, 1998.

19. FORMAN, B.M. *et al.* Androstane metabolites bind to and deactivate the nuclear receptor CAR-β. *Nature.* v. 395, p.612-615, 1998.

20. PARKS, D.J. *et al.,* Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor. *Science*. v. 284, p.1365-1368, 1999.

21. KRUST, A. *et al.* The chicken oestrogen receptor sequence: homology with v-erbA and the human oestrogen and glucocorticoid receptors. *EMBO J.* v. 5, p. 891-897, 1986.

22. MOORE, J.T., COLLINS, J.L., PEARCE, K.H. The nuclear receptor superfamily and drug discovery. *Chem.Med.Chem.* v. 1, p. 504-523, 2006.

23. SHAO, D., LAZAR, M.A. Modulating nuclear receptor function: may the phos be with you. *J. Clin Invest* v. 103, p. 1617-1618, 1999.

24. REICHARDT, H.M. *et al.* DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival. *Cell* v. 93, p. 531-541, 1998.

25. KRAICHELY, D.M., Nakai, Y.D., MacDonald, P.M. Identification of an autonomous transactivation domain in helix H3 of the vitamin D receptor. *J. Cel. Biochem*. v. 75, p. 82-92, 1999.

26. BERMAN, H.M., HENRICK, K., NAKAMURA, H. Announcing the worldwide Protein Data Bank. *Nature Struct. Biol.* v. 10, n. 12, p. 980-981, 2003.

27. CHEN Z.P. *et al.,* Pure and functionally homogeneous recombinant retinoid X receptor. *J Biol Chem.* v. 14, n. 269. p. 25770-25776, 1994.

28. HORLEIN, A.J. *et al.* Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature*. v. 377, n. 6548, p. 397-404, 1995.

29. HEERY, D.M., KALKHOVEN, E., HOARE, S. A signature motif in transcriptional co-ativators mediates binding to nuclear receptor. *Nature*. v. 387, n. 6634, p.733-736, 1997.

30. JEYAKUMAR, M., TANEN, M.R., BAGCHI, M.K. Analysis of the functional role of steroid receptor coativator-1 in ligand-induced transativation by thyroid hormone receptor co-repressor. *Curr Biol.* v. 5, n. 7, p. 747-757, 1997.

31. GLASS, C.K., ROSE, D.W., ROSENFELD, M.G. Nuclear receptor coativatiors. *Curr. Opin. Cell. Biol.* v. 9, n. 2, p. 222-232, 1997.

32. FENG, W. *et al.,* Hormone-dependent coactivator binding to a hydrophobic cleft on nuclear receptors. *Science*. v. 280, p. 1747–1749, 1998.

33. RIBEIRO, R.C., KUSHNER, P.J., BAXTER, J.D. The nuclear hormone receptor gene superfamily. *Annu. Rev. Med.* v. 46, p.443-53, 1995.

34. MORAS, D., GRONEMEYER, H. The nuclear receptor ligand binding domain: structure and function. *Curr Opin Cell Biol.* v. 10, n. 3, p. 384-391, 1998.

35. WEBSTER, J.C., CIDOLOWSKI, J.A. Mechanism of glucocorticoid-receptor-mediated repression of gene expression. *Trends endocrinol. metab.* v. 10, p. 396-402, 1999.

36. UMESONO, K. *et al.,* Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid and vitamin D3 receptors . *Cell* v. 65, n. 7, p. 1255-66, 1991.

37. GRONEMEYER, H., GUSTAFSSON, J-K, LAUDET, V. Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nature.* v. 3, p. 950-965, 2004.

38. WURTZ, J-M. *et al.,* A canonical structure for the ligand binding domain of nuclear receptors. *Nat. Struc. Biol.* v. 3, n. 1, p. 87-94, 1996.

39. WU, Y., KOENIG, R. J. Gene regulation by thyroid hormone. *Trends Edocrinol. Metabol*. v. 11, n.6, p. 207-211, 2000.

40. GLASS, C. K. ROSENFELD, M. G. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev.* v.14, p. 121–141, 2000.

41. BOURGUET, W., GERMAIN, P., GRONEMEYER, H. Nuclear receptor ligand-binding domains: 3D structures, molecular interactions and pharmacological implications. *Trends Pharmacol. Sci.* v. 21, p. 381–388, 2000.

42. WEBB, P. *et al.,* Design of thyroid hormone receptor antagonists from first principles. J *Steroid. Biochem. Mol. Biol*., v. 83, p. 59-73, 2003.

43. YEN, P.M. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Rev.* v. 81, p. 1097-1142, 2001.

44. LAZAR, M. A., CHIN, W.W. Nuclear thyroid hormone receptors. *J Clin Invest.* v. 86, n.6, p. 1777–1782, 1990.

45. SPURR, N.K. *et al.,* Regulation of Gene Expression by Thyrold Hormone. *EMBO J.* v. 3, p.159-163, 1984.

46. WEINBERGER, C. *et al.,* The c-erb gene encodes a thyroid hormone receptor. *Nature.* v. 324, p. 641-646, 1986.

47. DRABKIN, H. *et al.* Localization of human ERBA2 to the 3p22→ 3p24. Region of chromosome 3 and variable deletion in small cell lung cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* v. 85. p. 9258-9262, 1988.

48. APRILETTI, J.W., RIBEIRO, R.C.J., WAGNER, R.L. Molecular and structural biology of thyroid hormone rceptors. *Clin Exp Pharmacol P*., v. 25, p.S2-S11, 1998.

49. WAGNER, R.L. *et al.,* A structural role for hormone in the thyroid hormone receptor. *Nature.* v. 14. n. 378. p.690-697, 1995.

50. IZUMO, S., MAHDAVI, V. Thyroid hormone receptor alpha isoforms generated by alternative splicing differentially activate myosin HC gene transcription. *Nature*. v. 334, p. 539-542, 1988.

51. THOMPSON, C.C. *et al.,* Identification of a novel thyroid hormone receptor expressed in the mammalian central nervous system. *Science.* v. 237, p 1610-1614, 1987.

52. NAKAI, A. *et al.,* Characterization of a thyroid hormone receptor expressed in human kidney and other tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci*. v. 85, p. 2781-2785, 1988.

53. FORREST, D. *et al.,* Distinct functions for thyroid hormone receptors α and ß in brain development indicated by differential expression of receptor genes. *EMBO J.* p. 10, p. 269-275, 1991.

54. SEVERNE, Y. *et al.,* Metal binding "Finger" structures in the glucocorticoid receptor defined by sitedirected mutagenesis. *EMBO J.* v. 7, p. 2503–2508, 1988.

55. YEN, P.M. *et al.,* Studies on the repression of basal transcription (silencing) by artificial and natural thyroid hormone receptor-b mutants. *Endocrinol.* v.136, p. 2845–2851, 1995.

56. NELSON, C.C., HENDY, S.C., ROMANIUK, P.J. Relationship between P-box amino acid sequence and DNA binding specificity of the thyroid hormone receptor. The effects of sequences flanking halfsites in thyroid hormone response elements. *J. Biol. Chem*. v. 270, p. 16988–16999, 1995.

57. RIBEIRO, R.C. *et al.,* X-ray crystallographic and functional studies of thyroid hormone receptor. *J Steroid Biochem. Mol. Biol*. v. 65, p.133-141, 1998b.

58. RASTINEJAD, F., EVANS, M., SIGLER, P.B. Structural determinants of nuclear receptor assembly on DNA direct repeats. *Nature* v. 375. p. 203 – 211, 1995.

59. LUISI, B.F., SCHWABE, J.W., FREEDMAN, L.P. The steroid/nuclear receptors: from three-dimensional structure to complex function. *Vitam Horm*. v. 49. p. 1–47, 1994.

60. RASTINEJAD, F. *et al.* Structural determinants of nuclear receptor assembly on DNA direct repeats. *Nature*. v. 375. p. 203-211, 1995.

61. RENAULD, J.P. *et al.* Crystal structure of the RAR-gamma ligand-binding domain bound to all-trans retinoic acid. *Nature.* v. 14. n. 378. p. 681-689, 1995.

62. RIBEIRO, R.C.J., *et al.,* Mechanisms of Thyroid Hormone Action: Insights from X-ray Crystallographic and Functional Studies. *Recent. Prog. Horm Res*. v. 53, p.351-94, 1998a.

63. NASCIMENTO, A.S. *et al.* Structural rearrangements in the thyroid hormone receptor hinge domain and their putative role in the receptor function. *J. Mol. Biol*. v. 360. p. 586–598, 2006.

64. BOURGET, W. *et al.,* Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RAR-α. *Nature.* v. 375. p. 377-382, 1995 a.

65. BOURGUET, W. *et al.,* Purification, functional characterization, and crystallization of the ligand binding domain of the retinoid X receptor. *Protein Expr Purif.* v. 6. n. 5. p.604-608, 1995b.

66. NOLTE, R.T. *et al.,* Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Nature.* v.10. n. 395. p.137-143, 1998.

67. BRZOZOWSKI, A.M. *et al.,*. Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature*. v. 16. n. 389. p.753-758, 1997.

68. LEFEBVRE, B. *et al.* H11-H12 loop retinoic acid receptor mutants exhibit distinct trans-activating and trans-repressing activities in the presence of natural or synthetic retinoids. *Biochemistry.* v. 30. n. 37. p. 9240-9249, 2001.

69. VOEGEL, J.J. *et al.,* The coactivator TIF2 contains three nuclear receptor-binding motifs and mediates transactivation through CBP binding-dependent and -independent pathways. *Embo J.* v. 17. p. 507-519, 1998.

70. HU X., LAZAR M. A. The CoRNR motif controls the recruitment of corepressors by nuclear hormone receptors. *Nature.* v. 402. p.93–96, 1999.

71. MARTINEZ, *et al.* Molecular dynamics simulations of ligand dissociation from thyroid hormone receptors: evidence of the likeliest escape pathway and its implications for the design of novel ligands. *J. Med. Chem.* v. 49. p. 23-26, 2006.

72. TOGASHI, M. *et al.,* Conformational adaptation of nuclear receptor ligand binding domains to agonists: potential for novel approaches to ligand design. *J. Steroid Biochem.* v. 93. p. 127-137, 2005.

73. WAGNER, R. L. *et al.,* Hormone selectivity in thyroid hormone receptors. *Mol. End.* v. 15. n.3. p. 398-410, 2001.

74. ZHU, X. *et al.,* Interaction of estrogen and thyroid hormone on regulation of proenkephalin gene expression in hypothalamus and striatum of female rats. *J. Biol. Chem.* v. 273. p. 27058–27063, 1998.

75. YE, L., LI, Y.L. Thyroid receptor ligands. 1. Agonist ligands selective for the thyroid receptor beta1. *J Med Chem*. v. 46. n. 9. p. 1580-1588, 2003.

76. BLEICHER, L. *et al*., Structural basis of GC-1 selectivity for thyroid hormone receptor isoforms. *BMC Structural Biology*. v.8, n.8, *in press*, 2008.

77. BUNN, C.F. *et al.* Nucleocytoplasmic shuttling of the thyroid hormone receptor α. *Mol. Endocrinol.* v. 15. p. 512-533, 2001.

78. NICOLL, J.B. *et al.,* Compartment-specific phosphorylation of rat thyroid hormone receptor α1 regulates nuclear localization and retention. *Mol. Cel.Endocrinol.* v.205. p.65-77, 2003.

79. RIBEIRO, R.C. *et al.,* Thyroid hormone alters in vitro DNA binding domain of monomers and dimmers of thyroid hormone receptors. *Mol. Endocrinol.* v. 6. n. 7. p. 1142-1152, 1992.

80. YEN, P.M. *et al.,* Triiodothyronine (T3) decreases DNA-binding of receptor homodimers but not receptor-auxiliary protein heterodimers. *J. Biol. Chem*. v. 267. p. 3565–3568, 1992.

81. CHIN, W.W. *et al.* Thyroid hormone regulation of thyrotropin gene expression. *Rec. Prog. Horm. Res.* v. 48. p. 393–414, 1993.

82. HOLLENBERG, A.N. *et al.,* The human thyrotropin-releasing hormone gene is regulated by thyroid hormone through two distinct classes of negative thyroid hormone response elements. *Mol Endocrinol*. v. 9. p. 540– 550, 1995.

83. NAAR, A.M. *et al.,* The orientation and spacing of core DNAbinding motifs dictate selective transcriptional responses to three nuclear receptors. *Cell*. v. 65. p. 1255–1266, 1991.

84. LEZOUALC'H, F. *et al.* Assignment of the beta-thyroid hormone receptor to 3,5,39-triiodothyronine-dependent inhibition of transcription from thyrotropin-releasing hormone promoter in chick hypothalamic neurons. *Mol Endocrinol*. v. 6. p. 1797–1804, 1992.

85. CHEN, H. *et al.* Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300. *Cell*. v. 90. p. 569–580, 1997.

86. KORZUS, E. *et al.* Transcription factorspecific requirements for coactivators and their acetyltransferase functions. *Science.* v. 279. p. 703–707, 1998.

87. OGRYZKO, V.V. *et al.* The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell*. v. 87. p. 953–959, 1996.

88. RACHEZ, C. *et al.,* The DRIP complex and SRC-1/p160 coactivators share similar nuclear receptor binding determinants but constitute functionally distinct complexes. *Mol Cell Biol*. v. 20. p. 2718–2726, 2000.

89. BRAVERMAN, L.E., INGBAR, S.H., STERLING, K. Iodothyronine deiodinases: structure-function analysis and their role in the regulation of thyroid hormone levels. *J. Clin Invest.* v. 49. p. 855-64, 1970.

90. GAVIN, L.A. *et al.,* 3,3'- Diiodothyronine production, a major pathway of peripheral iodo-thvronine metabolism in man. *J. Clin Invest*. v. 61. p.1276-1285, 1978.

91. WU, Y., XU, B., KOENIG, R.J. Thyroid Hormone Response Element Sequence and the Recruitment of Retinoid X Receptors for Thyroid Hormone Responsiveness. *J. Biol. Chem.* v. 276. p.3929-3936, 2001.

92. CARLIN, K., CARLIN, S. Possible etiology for euthyroid sick syndrome. *Med. Hypotheses*. v. 40. p. 38-43, 1993.

93. GUYTON, A.C., HALL, J.E. *Tratado de fisiologia médica.* 10ed., Rio de Janeiro: Guanabara e Koogan, 2002, p. 972.

94. EVERTS, M.E. *et al.,* Uptake of triiodothyroacetic acid and its effect on thyrotropin secretion in cultured anterior pituitary cells. *Endocrinol.* v.135. p.2700-2707, 1994.

95. MENEGAY, C., JUGE, C., BURGER, A.G. Pharmacokinetics of 3,5,3'-triiodothyroacetic acid and its effects on serum TSH levels. *Acta Endocrinol.* v. 121. p.651-58, 1989.

96. BRACCO, D. *et al.,* Comparison of the metabolic and endocrine effects of 3,5,3'-triiodothyroacetic acid and thyroxine. *J. Clin. Endocrinol.Metab.* v.77. p. 221-228, 1993.

97. ABU, E.O *et al.,* The expression of thyroid hormone receptors in human bone. *Bone*, v. 21. n. 2. p.137-142, 1997.

98. KUNITAKE, J.M. *et al.,* 3,5,3'-triiodothyroacetic acid therapy for thyroid hormone resistance. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* v. 69. p.461-466, 1989.

99. MESSIER, N., LANGLOIS, M.F. Triac regulation of transcription is T_3 receptor isoform- and response element-specific. *Mol. Cell. Endocrinol.* v.165. p. 57-66, 2000.

100. SAMBROOK, J., MACCALLEEN, P., RUSSELL, D. *Molecular Cloning: A laboratory Manual.* 3ed. New York : Cold Spring Habor Laboratory Press, 2001, p. 2344.

101. *GEL Filtration Principles and Methods.* Uppsala, Suécia. 1ed. GE Healthcare Bio-sciences. 123p. Disponível em www.gelifesciences.com/protein-purification, acesso: fevereiro de 2008.

102. BOLLAG, D. M., EDELSTEIN, S. T. *Protein methods.* New York: Wiley Interscience, 1991, p. 143-160.

103. KERSTEN, S. *et al.* Role of ligand in retinoid signaling. 9-cis-retinoic acid modulates the oligomeric state of the retinoid X receptor. *Biochemistry.* v. 34. p.13717-13721, 1995.

104. SVERGUN, D. I. *et al.,* Shape Determination from Solution Scattering of Biopolymers. *J Appl Crystallog.* v. 30. p. 798-802, 1997.

105. GUINIER, A., FOURNET, G. *Small-Angle Scattering of X-rays*, 1 ed., New York: John Wiley, 1955, 1352p.

106. SVERGUN, D. I. *et al.,* New Developments in Direct Shape Determination from Small-Angle Scattering. 2. *Uniqueness Acta Cryst A*. v. 52. p. 419-426, 1996.

107. KELLERMANN, G. *et al.,* The Small-Angle X-ray Scattering Beamline of the Brazilian Synchrotron Light Laboratory. *J. Appl. Crystallogr*. v. 30. p. 880–883, 1997.

108. HAMMERSLEY, A.P. FIT2D: an introduction and overview. *ESRF Internal Report, ESRF97HA02T*, 1997, disponível em: http://www.esrf.eu/computing/scientific/FIT2D. Acesso em fevereiro, 2008.

109. SVERGUN, D. I. Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. *J. Appl. Crystallogr*. v. 25. p. 495–503, 1992.

110. GLATTER, O., KRATKY, O. *Small Angle X-ray Scattering*, London: Academic Press, 1982. p. 289.

111. SVERGUN, D. I. Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing. *Biophys. J.* v. 76. p. 2879–2886, 1999.

112. KOZIN, M.B., SVERGUN, D.I. Automated matching of high- and low-resolution structural models. *J. Appl. Crystallogr*. v. 34. p. 33–41, 2001.

113. SHANNON, C. E., WEAVER, W. *The Mathematical Theory of Communication*, Illinois: University Urbana Illinois Press, 1949, p.462.

114. SALI, A., BLUNDELL, T.L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restrains. *J. Mol. Biol.* v.234, p. 779-815, 1993.

115. COLLABORATIVE Computational Project, Number 4. *Acta Cryst. D.* v. 50. p.760-763, 1994.

116. EMSLEY, P., COWTAN, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Cryst. D*. v. 60. p. 2126-2132, 2004.

117. GAMPE Jr., R.T. *et al.,*. Structural basis for autorepression of retinoid X receptor by tetramer formation and the AF-2 helix. *Genes Dev.* v. 14. p. 2229-2241, 2000a.

118. KONAREV, P. V., PETOUKHOV, M. V., SVERGUN, D. I. MASSHA - a graphics system for rigid-body modelling of macromolecular complexes against solution scattering data. *J. Appl. Crystallogr*. v. 34. p. 527–532, 2001.

119. SVERGUN, D. I., BARBERATO, C., KOCH, M. H. CRYSOL - a Program to Evaluate X-ray Solution Scattering of Biological Macromolecules from Atomic Coordinates. *J. Appl. Crystallogr.* v. 28. p. 768–773, 1995.

120. LAKOWICZ, J.R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3ed. New York: Plenum Press, 2002, p1-25, 353-382, 492- 575.

121. LIMA, L.M.T. R., SILVA, J. L. Positive Contribution of Hydration on DNA Binding by E2c Protein from Papillomavirus. *J. Biol. Chem.* v. 279, n.46. p. 47968–47974, 2004.

122. WALES, T.E., ENGEN, J.R. An examination of dynamics crosstalk between SH2 and SH3 domains by hydrogen/deuterium exchange and mass spectrometry. *Mass spectroscopy reviews*. v. 25. p.158-170, 2006.

123. ZHANG, Z., SMITH, D.L. Determination of amide hydrogen exchange by mass spectrometry: A new tool for protein structure elucidation. *Protein Science.* v. 2. p. 522-531, 1993.

124. HAMURO, y. *et al.,* Rapid Analysis of Protein Structure and Dynamics by Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry. *J. Biomol Tech* v.14. p. 171-182, 2003.

125. WANG, L., PAN, H., SMITH, D.L. Hydrogen exchange-mass spectrometry - optimization of digestion conditions. *Mol. Cell Proteomics.* v 12, p.132-138, 2002.

126. CHALKLEY R. J. *et al.,* Comprehensive analysis of a multidimensional liquid chromatography mass spectrometry dataset acquired on a quadrupole selecting quadrupole collision cell, time-of-flight mass spectrometer. I. How Much of the Data is Theoretically Interpretable by Search Engines? *Mol. and Cell. Prot.*, v. 4. p.1189-1193, 2005.

127. BEITZ E. TEXshade: shading and labeling of multiple sequence alignments using LATEX2 epsilon. *Bioinformatics.* v. 16. n. 2. p.135-139, 2000.

128. FIGUEIRA, A. C. M.*et al.,* Human thyroid receptor forms tetramers in solution, which dissociate into dimers upon ligand binding. *Cell Biochem Biophys*. v. 44. n. 3. p. 453-462, 2006.

129. KLIEWER, S.A *et al.* Retinoid X receptor interacts whit nuclear receptors in retinoic acid, thyroid hormone and vitamin D3 signalling. *Nature.* v. 355. p. 446-449, 1992.

130. LAZAR, M.A., BERRODIN, T.J., HARDING, H.P. Differential DNA binding by monomeric, homodimeric, and potentially heteromeric forms of the thyroid hormone receptor. *Mol. Cell Biol*. v. 11. p. 5005-5015, 1991.

131. KUROKAWA, R. *et al,*. Differential orientations of the DNA-binding domain and carboxy- terminal dimerization interface regulate binding site selection by nuclear receptor heterodimers. *Genes & Development*. v. 7. p. 1423-1435, 1993.

132. YEN, P.M. *et al.,* Roles of 3,5,3'- triiodothyronine and deoxyribonucleic acid binding on thyroid hormone receptor complex formation. *Endocrinol.* v. 134. p.1075-1081, 1994.

133. ZHANG, X.K. *et al.,* Retinoid X receptor is an auxiliary protein for thyroid hormone and retinoic acid receptors. *Nature*. v. 30, n.335. p.441-446, 1992.

134. KERSTEN, S. *et al.,* Retinoid X receptor alpha forms tetramers in solution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* v. 92. p. 8645-8649, 1995.

135. KERSTEN, S., PAN, L., NOY, N. On the role of ligand in retinoid signaling. Positive cooperativity in the interactions of 9-*cis* -retinoic acid with tetramers of the retinoid X receptor. *Biochemistry* . v. 34. p.14263-14269, 1995c.

136. KERSTEN, S *et al.,* Auto-silencing by the retinoid X receptor. *J. Mol. Biol*. v. 284. p. 21-32, 1998.

137. GAMPE, R.T*et al.,* Asymmetry in the PPARgamma/RXRalpha crystal structure reveals the molecular basis of heterodimerization among nuclear receptors. *Genes Develop.* v. 14. p. 2229-41, 2000b.

138. EGEA, P.F *et al.,* Effects of ligand binding on the association properties and conformation in solution of retinoic acid receptors RXR and RAR. *J Mol Biol*.v. 307. p. 557-576, 2001a.

139. EGEA, P.F. *et al.,* Purification and crystallization of the human RXRalpha ligand binding domain-9-cisRA complex. *J. Mol. Biol*. v.307. p.557- 576, 2001b.

140. FISCHER, H. *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.* v. 278. p. 16030–16038, 2003.

141. DE LA TORRE, J. G. *et al.,* HYDRO: a computer program for the prediction of hydrodynamic properties of macromolecules. *Biophys. J.* v. 67. p. 530-531, 1994.

142. KERSTEN, S., GRONEMEYER, H., NOY, N. The DNA binding pattern of the retinoid X receptor is regulated by ligand-dependent modulation of its oligomeric state. *J. Biol. Chem*. v. 272. p.12771-12777, 1997.

143. LAHOZ, E. G.*et al.* Suppression of Myc, but not E1a, transformation activity by Max-associated proteins, Mad and Mxi1. *Proc. Natl. Acad. Sci*. v. 91. p. 5503-5507, 1994.

144. MATEU, M. G. *et al.* Mechanism of folding and assembly of a small tetrameric protein domain from tumor suppressor p53. *Nature Struct. Bio*l. v. 6. p. 191-198, 1999.

145. BROKX, R. D., BOLEWSKA-PEDYCZAK, E., GARIÉPY, J. A stable human p53 heterotetramer based on constructive charge interactions within the tetramerization domain. *J. Biol. Chem*. v. 278. p. 2327-2332, 2003.

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

147. GRESCHIK H, MORAS D. Structure-activity relationship of nuclear receptor-ligand interactions. *Curr Top Med Chem.* v. 3, p. 1573-1599, 2003.

148. GRESCHIK, H. *et al.* Structural and Functional Evidence for Ligand-Independent Transcriptional Activation by the Estrogen-Related Receptor 3. *Mol. Cell*. v. 9. p. 303-313, 2002.

149. SABLIN, E.P. *et al.,* Structural basis for ligand-independent activation of the orphan nuclear receptor LRH-1. *Mol. Cell.* v.11. p.1575-1585, 2003.

150. LU, X.-J., OLSON, E.K. 3DNA: a software package for the analysis, rebuilding and visualization of three-dimensional nucleic acid structures, *Nucl. Acids Res.* v. 17, p. 5108–5121, 2003.

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

152. YOH, S.M., PRIVALSKY, M.L. Transcriptional repression by thyroid hormone receptors: a role for receptor homodimers in the recruitment of SMRT corepressor.*J.Biol Chem.* v. 276. p. 16857-16867, 2001.

153. CHEN, Z. P. *et al.,* Ligand- and DNA-induced dissociation of RXR tetramers *J. Mol. Biol.* v. 275. p. 55-65, 1998.

154. VIVAT, V. *et al.,* A mutation mimicking ligand-induced conformational change yields a constitutive RXR that senses allosteric effects in heterodimers. *EMBO J.* v.16. p. 5697-5709, 1997.

155. KERSTEN, S., RECZEK, P., NOY, N. The tetramerization region of the retinoid X receptor is important for transcriptional activation by the receptor. *J. Biol. Chem*. v. 272. p. 29759-29768, 1997.

156. LIN, B. C. *et al.* Plasticity of tetramer formation by retinoid X receptors. An alternative paradigm for DNA recognition. *J. Biol. Chem.* v.272. p. 9860–9867, 1997.

157. MUSCAT, G.E. *et al.,* Characterization of the thyroid hormone response element in the skeletal alpha-actin gene: regulation of T3 receptor binding by retinoid X receptor. *Cell Growth Differ.* v. 4. p. 269–279, 1993.

158. MUSCAT, G.E. *et al.,* The rat growth hormone gene contains multiple thyroid response elements. *J Biol Chem* . v. 264. p. 12063–12073, 1989.

159. MASSAAD, C. *et al.,* Properties of overlapping EREs: synergistic activation of transcription and cooperative binding of ER. *Biochemistry.* v.37. p. 6023–6032, 1998.

160. PONGLIKITMONGKOL, M., WHITE, J.H., CHAMBON, P. Synergistic activation of transcription by the human estrogen receptor bound to tandem responsive elements. *EMBO J.* v. 9. p. 2221-2231, 1990.

161. GARLATTI, M. *et al.,* A functional glucocorticoid-responsive unit composed of two overlapping inactive receptor-binding sites: evidence for formation of a receptor tetramer. *Mol. Cell Biol.* v. 14**.** p. 8007–8017, 1994.

162. GLASS, C.K. *et al.,* Some new twists in the regulation of gene expression by thyroid hormone and retinoic acid receptors. *J Endocrinol*. v. 150. p. 349–357, 1996.

163 GLASS, C.K. *et al.,* The thyroid hormone receptor binds with opposite transcriptional effects to a common sequence motif in thyroid hormone and estrogen response elements. *Cell*. v. 54. n. 3. p.313-323, 1998.

164. PIEDRAFITA, J.F., ORTIZ, M.A., PFAHL, M. Thyroid hormone receptor homodimers can function as ligand-sensitive repressors. *Mol Endocrinol*. v. 9. n. 5. p.563-578, 1995.

165. ROSENFELD, R.M. A crerb-A. binding site in rat growth hormone mediates trans-activation by thyroid hormone. *Nature*. v. 329. p.738-741, 1987.

166. WILLIAMS, G.R., GA, B. *Molecular endocrinology: Basic concepts and clinical correlations.* New York: Raven Press, 1995, p.217-239.

167. CHEN, S. *et al.,* Co-activator-vitamin D receptor interactions mediate inhibition of the atrial natriuretic peptide promoter. *J Biol Chem*. v. 275. p.15039-15048, 2000.

168. WYMAN JR., J. Functions and reciprocal effects in hemoglobin: a second look. *Adv. Protein Chem.* v. 19. p. 223–286, 1964.

169. RECORD JR., M. T., LOHMAN, T. M., DE HASETH, P. Ion effects on ligand-nucleic acid interactions, *J. Mol. Biol.*, v.107. p. 145-158, 1976.

170. MEIER, C. A. *et al.,* Interaction of human beta 1 thyroid hormone receptor and its mutants with DNA and retinoid X receptor beta T3 response element-dependent dominant negative potency. *J Clin Invest.* v. 92. n. 4. p.1986–1993, 1993.

171. YEN, P.M., CHIN, W.W. Molecular Mechanisms of Dominant Negative Activity by Nuclear Hormone Receptors. *Mol. Endocrinol.*v. 8. n. 11. p. 1450-1454, 1994.

172. OZERS, M.S. *et al.,* Equilibrium binding of estrogen receptor with DNA using fluorescence anisotropy. *J Biol Chem*. v. 272, n.48. p.30405-30411, 1997.

173. FLINK, I.L., MORKIN, E. Interaction of thyroid hormone receptors with strong and weak cis- acting elements in the human alpha-myosin heavy chain gene promoter. *J. Biol. Chem.* v. 265. n. 19. p.11233-11237, 1990.

174. VELASCO, F.L.R. *et al.,*. Thyroid hormone response element organization dictates the composition of active receptor. *J Biol Chem*. v. 282, n.17. p.12458-12466, 2007.

175. CLARK, G.R. *et al.* Intermolecular interactions and water structure in a condensed phase B-DNA crystal. *Nucleic Acids Research*. v. 28. p. 1259-1265, 2000.

176. PIKE, A.C. *et al.,* Structure of the ligand-binding domain of oestrogen receptor beta in the presence of a partial agonist and a full antagonist. *EMBO J.* v.18. n.17. p. 4608–4618, 1999.

177. JOHNSON, B.A. *et al.* Ligand-induced stabilization of PPARγ monitored by NMR spectroscopy: implications for nuclear receptor activation. *J. Mol. Biol*. v. 298. n.2. p. 187-194, 2000.

178. BERGER, J.P. *et al.,* Distinct properties and advantages of a novel peroxisome proliferator-activated protein γ selective modulator. *Mol. Endocr*. v. 17, n. 4. p. 662-676, 2003.

179. RIBEIRO, R.C.J. *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.* v. 276. p.14987–14995, 2001.

180. ENGEN, J.R. *et al.,* Hydrogen exchange shows peptide binding stabilizes motions in Hck SH2 *Biochem.* v. 38. p. 8926-8935, 1999.

181. CHALMERS, M.J. *et al.* Probing protein ligand interactions by automated hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *Anal.Chem*. v. 78. n. 4. p.1005-14, 2006.

182. FREGO, L., DAVIDSON, W. Hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry location of cofactor binding sites determined by binding domain induced by ligand and cofactor binding, and the conformational changes of the glucocorticoid receptor ligand. *Protein Sci.* v.15. p. 722-730, 2006.

183. YAN, X. *et al.,* Dynamics and ligand-induced solvent accessibility changes in human retinoid x receptor homodimer determined by hydrogen deuterium exchange and mass spedtrometry. *Biochem.* v. 43. p. 909-917, 2003.

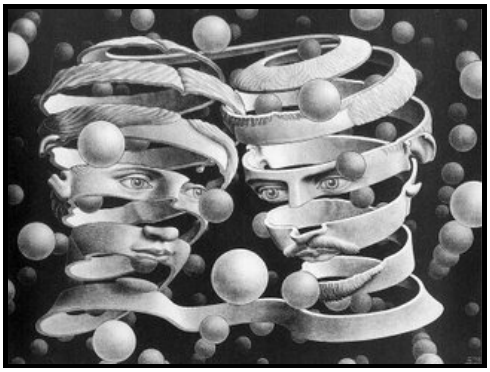
184. ENGEN, J.R., SMITH, D.L. Investigating protein structure and dynamics by hydrogen exchange *MS. Anal. Chem*. v.73. n. 256a-265a, 2001.

185. HAMURO, Y. *et al.* Hydrogen/deuterium exchange (H/D-Ex) of PPARγ LBD in the presence of various modulators. *Prot. Scien*. v.15. p. 1883-1892, 2006.

186. HELDRING, N. *et al.* Structural insights into corepressor recognition by antagonist-bound estrogen receptors .*J. Biol. Chem.* v. 282. n. 14. p.10449-10455, 2007.

187. KALLENBERGER, B.C. *et al.,* A dynamic mechanism of nuclear receptor activation and its perturbation in a human disease. *Nat Struct Biol.* v.10. n.2. p. 136-140, 2003.

188. MARTINEZ, L. *et al.,* Molecular dynamics simulations reveal multiple pathways of ligand dissociation from thyroid hormone receptors.*Biophys J.* v. 89. n. 3. p. 2011-2023, 2005.



Anexo 1 – Artigos Publicados