UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

AMANDA BERNARDES MUNIZ

**Estudos estruturais e funcionais dos receptores ativadores da
proliferação de peroxissomos**

São Carlos
2013

AMANDA BERNARDES MUNIZ

**Estudos estruturais e funcionais dos receptores ativadores da
proliferação de peroxissomos**

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

Área de concentração: Física Aplicada
Opção: Física Biomolecular

Orientador: Prof. Dr. Igor Polikarpov

Versão Corrigida
(Versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos
2013

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

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

Muniz, Amanda Bernardes

Estudos estruturais e funcionais dos receptores
ativadores da proliferação de peroxissomos / Amanda
Bernardes Muniz; orientador Igor Polikarpov - versão
corrigida -- São Carlos, 2013.
163 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em
Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física
de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2013.

1. Receptor nuclear. 2. Receptor ativador da
proliferação de peroxissomos. 3. Cristalografia de
proteínas. 4. Oligomerização de proteínas. 5. Interação
proteína:ligante. I. Polikarpov, Igor, orient. II.
Título.

Dedico,

Aos meus pais, Joana e Valdelídio
Aos meus irmãos, Andréa e Rodolfo e
co-irmão Márcio
Ao meu amor, João

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Igor Polikarpov pela orientação, confiança e apoio. Meu muito obrigada por ter me dado a oportunidade de ingressar no mundo científico, desenvolver esse projeto fascinante e fazer parte de um grupo de pesquisa forte e de referência no Brasil.

À toda minha família pelo suporte incondicional, principalmente meus pais e meus irmãos que mesmo sem entender bem meu trabalho sentem muito orgulho e me apoiam em todas as minhas decisões. Sem eles com certeza eu não teria forças para enfrentar as dificuldades e não teria esse otimismo e essa alegria de viver. Mãe, obrigada pelo “Vamos que o dia é curto e a noite é longa”, isso ainda me faz acordar mais cedo todos os dias!! Pai, meu exemplo de competência! Andrea, minha irmã companheira e Rodolfo meu irmãozinho querido!!

Ao meu amor e colaborador João que não só torna meus dias mais apaixonantes como também me auxilia em todos os campos da minha vida. Obrigada pela ajuda, paciência, amor, companheirismo e pelas valiosas dicas de cristalografia e de como usar o Pymol.

À amiga Ana Cristina, uma combinação perfeita de ótima pesquisadora e amiga. À amiga Francieli que eu adoro e acho tão parecida comigo. À Ana Carolina Figueira por ter sido minha mentora tão querida, ao André, antes um esperto aluno de iniciação e agora um colaborador competente e à Maria Auxiliadora pelos excelentes conselhos e carinho.

À Tia Made pelas valiosas correções e vitalidade contagiante. Aos meus sogros Maria Lucia e Wilson pelo companheirismo.

Aos amigos e colaboradores Fernanda Batista (sofremos muito juntas), Dani Tri, Jademilson, Mario, Viviane, Lívias, Daiana, Letícia, Malu, Lis, Renata, Caio, Tavin, Bruno, Fer Costa, Mamé, Ju Torini, Jaque, Ana Letícia, Everton, Carol Guzzi, Alexandre, Marisa, Suzana, Bianca, Napo, César, Marco, Atílio, Vanessa, Evandro, Ivan, João P.; Josimar, Jéssica, Kelven, Fernandos e todos os membros ou ex-membros dos Grupos de Cristalografia e Biotecnologia Molecular. Gostaria de dizer algo especial para todos, mas aqui vou deixar somente o obrigada pelos sorrisos, conselhos, ideias, piadas, companhia e ensinamentos.

Aos professores do Grupo de Cristalografia e de Biofísica e do IFSC no geral. É ótimo ter professores e pesquisadores de excelência ao redor. Sempre me senti amparada.

Ao Dr. Paul Webb por me orientar durante o estágio fora e disponibilizar horas de fantásticas discussões. Ao pesquisador Stephen pela ajuda e paciência durante a prática dos ensaios funcionais e à todos os amigos do The Methodist Hospital Research Institute (EUA).

Aos pesquisadores do LNBio e da Unicamp pelas colaborações, principalmente ao Prof. Munir e seus alunos.

*Agradeço à **FAPESP** pelo apoio financeiro e ao IFSC-USP pela infraestrutura.*

À todos que de forma direta ou indireta participaram desse trabalho.

Obrigada!

"I would feel more optimistic about a bright future for man if he spent less time proving that he can outwit Nature and more time tasting her sweetness and respecting her seniority"

-E. B. White, "Coon Tree", 1977.

RESUMO

MUNIZ, A. B. **Estudos estruturais e funcionais do receptor ativador da proliferação de peroxissomos.** 2013. 163p. Tese (Doutorado Direto em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

Os receptores ativadores da proliferação de peroxissomos (PPARs) pertencem à superfamília de receptores nucleares que funcionam como fatores transcricionais. Eles exercem um papel fundamental em processos que envolvem, principalmente, o metabolismo lipídico, em resposta à ativação por ligantes naturais e sintéticos como os ácidos graxos e os fibratos, respectivamente. A crescente descoberta de importantes funções fisiológicas, coordenadas pelos PPARs, e a necessidade de se conhecer como os agonistas, atualmente disponíveis, atuam nesses receptores, têm incitado pesquisas que vislumbram sua melhor exploração nos tratamentos de doenças metabólicas e inflamatórias, minimizando os efeitos adversos de ativações suprafisiológicas. Nesse cenário, o presente trabalho buscou compreender melhor as bases estruturais envolvidas nas funções atribuídas aos PPARs e explicar como as interações com seus ligantes ocorrem. Para isso, foram realizadas a subclonagem do domínio de ligação ao ligante do PPAR α , sua expressão e purificação, seguidas de ensaios cristalográficos e biofísicos, além da abordagem de testes funcionais. Uma vez que a formação de oligômeros está relacionada à funcionalidade desses receptores, foram abordados estudos de oligomerização dos PPARs α e γ , compreendendo tanto o processo de homo- quanto o de heterodimerização. Os ensaios de cristalização do hPPAR α LBD complexado a ligantes naturais e sintéticos, resultaram em estruturas cristalográficas que permitiram a identificação dos resíduos envolvidos no reconhecimento dos ligantes e a caracterização de sítios de ligação nunca antes descritos. A presença de ligantes nessas regiões afeta a conformação da proteína e, conseqüentemente, a modulação de sua função e o recrutamento da maquinaria transcricional. Adicionalmente, as estruturas cristalográficas da proteína complexada a ácidos graxos auxiliaram na compreensão de como essa importante classe de ligantes naturais possui efeitos farmacológicos similares aos de ligantes sintéticos. Esses resultados têm imediato impacto na procura racional de agonistas para esses receptores e se inserem em uma perspectiva de promoção do desenvolvimento científico-tecnológico na área de endocrinologia molecular.

Palavras-chave: Receptor nuclear. Receptor ativador da proliferação de peroxissomos. Cristalografia de proteínas. Oligomerização de proteínas. Interação proteína:ligante.

ABSTRACT

MUNIZ, A. B. **Structural and functional studies of peroxisome proliferator-activated receptor**. 2013. 163p. Tese (Doutorado Direto em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

The peroxisome proliferation-activated receptors (PPARs) belong to the nuclear receptors superfamily, acting as transcriptional factors. They play a key role in processes involving essentially lipid metabolism in response to activation by natural and synthetic ligands such as fatty acids and fibrates, respectively. The rising discovery of important physiological functions coordinated by PPARs and the necessity to know how the currently available agonists act on these receptors, have encouraged researches envisioning a better receptor exploration in the treatment of metabolic and inflammatory diseases, minimizing the adverse effects of supraphysiological activations. In this scenario, the present study aimed to better understand the structural basis involved in PPARs functions and elucidates how the interactions with their ligands takes place. For this, the ligand-binding domain of PPAR α was subjected to subcloning, expression and purification steps, followed by crystallographical and biophysical assays, in addition to functional testing approaches. Since the degree of oligomerization is related to the functionality of these receptors, oligomeric studies of PPARs α and γ oligomerization were also achieved, comprising both homo- and hetero-dimerization. The co-crystallization assays of hPPAR α LBD complexed with natural and synthetic ligands resulted in crystallographic structures that allowed the identification of residues involved in ligand recognition and the characterization of novel binding sites. The presence of ligands in these regions affects the conformation of the protein and thereby modulates their function and transcriptional machinery recruitment. Additionally, the crystallographic structures of the protein complexed to fatty acids were valuable for the understanding of how this important class of natural ligands has similar pharmacological effects to those of synthetic ligands. These results have direct impact on rational agonists design to these receptors and are inserted in a perspective of scientific promotion and technological development in the field of molecular endocrinology.

Keywords: Nuclear receptor. Peroxisome proliferator-activated receptor. Protein crystallography. Protein oligomerization. Protein:ligand interaction.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 -** Organização estrutural em domínios funcionais dos receptores nucleares. A. Representação linear em barras da divisão dos domínios; B. representação em *cartoon* da estrutura cristalográfica do complexo PPAR γ +RXR α +DNA (PDB 3DZU). A região N-terminal que possui a AF-1 está representada pela barra rosa e ausente na estrutura cristalográfica devido à sua alta mobilidade; em verde a região que corresponde ao DBD; o LBD representado em azul e entre o DBD e o LBD está o *hinge* em preto.32
- Figura 2 -** Mecanismo de ação dos RNs. A. No interior do núcleo celular, os receptores, na ausência de moléculas ativadoras, se encontram ligados aos correpressores. B. Quando ocorre a ligação com um ligante, os RNs sofrem mudanças conformacionais que ocasionam o desligamento dos correpressores e C. a formação do heterodímero funcional com o receptor RXR. D. O heterodímero reconhece sequências específicas no DNA (HRE), recrutando os coativadores e todo complexo proteico envolvido na maquinaria transcricional, que são capazes de modificar a estrutura da cromatina e iniciar o processo da transcrição de genes alvos.35
- Figura 3 -** Estados oligoméricos observados para os receptores nucleares e a interação com os HREs. A. Monômero, verificado principalmente para receptores órfãos e se ligam a um sítio simples da sequência consenso de elementos responsivos. Dímeros capazes de reconhecer B. repetições diretas da sequência consenso AAGTC; C. sequências palindrômicas e também D. HREs que apresentam a repetição em forma de palíndromo invertido. Os HREs podem apresentar variações no número de bases (n – destacado em vermelho) que separam as sequências consenso na formação dos elementos responsivos.36
- Figura 4 -** Integração metabólica dos PPARs. Os três isotipos de PPAR regulam a homeostase de lipídeos e glicose através de suas atividades coordenadas no fígado, músculo e tecido adiposo³⁴.39
- Figura 5 -** Esquema representativo do papel do PPAR α na resposta hepática à dieta. Durante o jejum, os ácidos graxos são liberados do tecido adiposo e chegam até o fígado, onde eles se ligam e ativam o PPAR α . Essa ativação do receptor resulta na estimulação de vários mecanismos funcionais, incluindo a oxidação de ácidos graxos, cetogênese e gliconeogênese, além da supressão do catabolismo de aminoácidos. Essas respostas estão associadas com um aumento (setas em verde) ou decréscimo (setas em vermelho) de componentes específicos no sangue²⁹.40
- Figura 6 -** Enovelamento tridimensional e topologia do domínio de ligação ao ligante de PPARs. A. Representação em *cartoon*, com as 13 hélices em formato de cilindro, organizadas em três camadas sobrepostas (sanduíche de hélices- α) formando o LBD. B. Imagem topológica do mesmo domínio, ressaltando as regiões e elementos de estrutura secundária envolvidos na interação com os ligantes e na formação de dímeros.42
- Figura 7 -** Regiões referentes ao bolsão de ligação do LBD em formato de Y, composto por três sub-braços. O braço I, representado em magenta, é predominantemente composto por resíduos polares que inclui os da H12. O braço II, localizado na região mais interior e superior do bolsão, está representado em verde e apresenta

um perfil mais hidrofóbico, assim como o braço III que compreende a região entre a H3 e a folha- β (em laranja).	43
Figura 8 - Remodelamento estrutural do LBD. Após a interação com o ligante, a estrutura dos receptores nucleares adota uma conformação proteica transcricionalmente ativa. O ligante induz modificações estruturais, originando o sulco de interação de proteínas coativadoras. Na forma inativa, a H12 está projetada para fora do corpo da proteína e as H11 e H10 são descontínuas. Após a ligação do ligante, a H12 é reposicionada e as H10 e H11 tornam-se contínuas e somente após as mudanças conformacionais que o coativador (rosa) se liga a proteína. Os modelos utilizados são referentes ao RXR α na ausência de ligante – conformação inativa (PDB 1LBD) e do complexo RXR α +agonista BMS649 – conformação ativa (PDB 1MVC).	44
Figura 9 - Região de interação de coativadores. A. Esquema representativo das regiões de interação dos receptores nucleares com os motivos LxxLL dos coativadores, que engloba a H3 e H12, e os resíduos polares lisina (K) e ácido glutâmico (E), respectivamente presentes nessas hélices e formando o que chamamos de “ <i>charge clamp</i> ”. B. Representação em superfície do sulco hidrofóbico formado nessa região com os resíduos da <i>charge clamp</i> delimitando as duas extremidades desse sulco e provendo o direcionamento e a ancoragem desse motivo ⁵⁰	45
Figura 10 - Estruturas químicas bidimensionais de alguns representantes de ligantes endógenos de PPAR α . Elas incluem ácidos graxos saturados com cadeias alquílicas de diferentes tamanhos, insaturados ou poliinsaturados, além de seus derivados, os eicosanoides (ex: leucotrieno B4 e 8(5)-HETE).	47
Figura 11 - Estruturas bidimensionais de moléculas sintéticas ativadoras do PPAR α . Estão representados alguns membros da classe dos fibratos (clorofibrato, fenofibrato e bezafibrato) que compreendem os fármacos usados no tratamento da hipertrigliceridemia e na prevenção de aterosclerose; um análogo de fibrato, amplamente utilizado em experimentos em geral, o WY14643; e o GW7647 que é um agonista com alta afinidade do mesmo.	49
Figura 12 - Características gerais de agonistas sintéticos de PPARs que auxiliam no desenvolvimento de novos compostos ⁶⁵	50
Figura 13 - Esquema representativo do experimento de transativação de gene repórter. A proteína quimérica possui o LBD do receptor nuclear fusionada ao DBD da Gal4. A ligação do ligante ao LBD ativa a proteína e seu DBD reconhece uma sequência específica no DNA que controla a expressão da luciferase. Quando a luciferase expressa através da ativação da proteína quimérica encontra moléculas de luciferina, ocorre uma reação enzimática que resulta em luminescência.	76
Figura 14 - Gel de agarose 1% TAE 1X mostrando o resultado da amplificação e digestão do gene hPPAR α LBD. A. 1) Marcador de massa molecular (MMM); 2) pTrcHisA-hPPAR α ; 3) Amplificação do hPPAR α LBD (retângulo preto). B. Digestão 1) Marcador de massa molecular; 2) Inseto referente ao hPPAR α LBD.	81
Figura 15 - SDS-PAGE 15% indicando o teste de expressão do hPPAR α LBD (31 kDa). 1) MMM (66 kDa, 45 kDa, 36 kDa e 29 kDa); 2) Alíquota antes da indução com IPTG; 3) 1 hora de indução; 4) 2 horas de indução; 5) 3 horas de indução; 6) 4 horas de indução e 7) 12 horas de indução.	82
Figura 16 - Purificação da proteína hPPAR α LBD. A. Cromatograma da purificação por exclusão de tamanho utilizando a coluna HL Superdex 75 16/60, onde o maior pico	

é referente à eluição da proteína hPPAR α LBD. **B.** SDS-PAGE 15%, utilizado para verificação dos passos de purificação da proteína, sendo 1) Marcador de massa molecular (MMM) utilizado como padrão (66, 45, 36, 30, 29, 20 e 12 kDa); Amostras provenientes 2) da purificação por afinidade; 3) da eluição do primeiro e 4) do segundo pico da purificação por exclusão de tamanho. **C.** SDS-PAGE 15% da clivagem da cauda de histidina do hPPAR α LBD. 1) MMM (66, 45, 36, 29 e 12 kDa); 2) Aliquota antes 3) durante e 4) depois de 12 horas de clivagem.83

Figura 17 - Purificação da proteína hPPAR γ . **A.** Cromatograma da purificação por exclusão de tamanho utilizando a coluna HL Superdex 75 16/60 para a construção da proteína referente ao domínio LBD (em azul) e para a proteína contendo os domínios DBD-LBD (em vermelho), cromatograma utilizando a coluna HL Superdex 75 26/60, onde os maiores picos são referentes às eluições das proteínas em questão. SDS-PAGE 15%, utilizado para verificação dos passos de purificação das proteínas **B.** hPPAR γ LBD, sendo 1. MMM (66, 45, 36, 29, 14 e 12 kDa); 2. - 3. Frações do pico da purificação por cromatografia por exclusão de tamanho **C.** hPPAR γ DBD-LBD, sendo 1) MMM utilizado como padrão (66, 45, 29, 20 e 12 kDa); Amostras provenientes 2) da fração solúvel do extrato celular; 3) da purificação por afinidade e 4) da eluição do maior pico da purificação por exclusão de tamanho.84

Figura 18 - Purificação da proteína hRXR α . **A.** Cromatograma da purificação por cromatografia por exclusão de tamanho, utilizando a coluna Supersdex 200 16/60. Em azul o resultado da cromatografia realizada para a proteína contendo somente o LBD e em vermelho para a construção com os dois domínios (DBD-LBD). SDS-PAGE 15% das amostras oriundas das purificações **B.** do hRXR α LBD, onde 1. MMM (66, 45, 36, 29, 20 e 12 kDa); 2. amostra aplicada na coluna de cromatografia por exclusão de tamanho (resultado da purificação por afinidade); e 3. eluição da purificação por exclusão de tamanho. **C.** do hRXR α DBD-LBD, onde 1. MMM (66, 45, 36, 29, 20 e 12 kDa); 2. eluição da purificação por afinidade; e 3. eluição da purificação por exclusão de tamanho.85

Figura 19 - Perfil cromatográfico proveniente da cromatografia analítica por exclusão de tamanho para análise dos oligômeros em solução e formação do heterodímero funcional PPAR/RXR. **A.** Diferentes concentrações de hPPAR α LBD analisadas. Eluição referente a formação dos heterodímeros (em azul) **B.** hPPAR α /hRXR α LBD; **C.** hPPAR γ /hRXR α LBD; e **D.** hPPAR γ /hRXR α DBD-LBD. Todas as eluições dos heterodímeros apresentaram um deslocamento do pico predominante de monômeros de cada PPAR (em vermelho), confirmando assim a formação do complexo. Inserto: SDS-PAGE 15% sendo **B.** 1) MMM (66, 45, 36, 30 e 12 kDa) e 2) amostra do pico referente ao heterodímero; **C.** 1) MMM (66, 45, 36 e 30 kDa) e 2) amostra do pico referente ao heterodímero e **D.** 1) MMM (66, 45, 30 e 12 kDa) e 2) amostra do pico referente ao heterodímero. Em **A.** **B.** **C.** Foi utilizada a coluna Superdex 75 10/30 e, em **D.** a coluna Superdex 200 10/30.91

Figura 20 - Gel Nativo de amostras hPPAR α e hPPAR γ LBD em diferentes concentrações e em complexo com hRXR α LBD. **A.** hPPAR α LBD 1) MMM (669, 440, 232, 140 e 67 kDa); 2 - 6) concentrações da proteína em mg/mL: 2; 3,5; 5; 7; 10, respectivamente. **B.** Análise da formação do heterodímero hPPAR α /hRXR α LBD. 1) MMM; 2) hPPAR α LBD; 3 - 6) Frações eluídas da coluna de cromatografia por exclusão de tamanho, pico de heterodímero; 7) hRXR α LBD. **C.** hPPAR γ LBD 1) MMM; 2 - 7) concentrações da proteína em mg/mL: 1; 3; 5; 7; 10 e 15, respectivamente. **D.** Análise da formação do heterodímero hPPAR γ /hRXR α LBD. 1) MMM; 2) hPPAR γ LBD; 3) hRXR α LBD; 4) MMM e 5) heterodímero.92

- Figura 21** - Resultados de espalhamento de luz dinâmica. Valores para R_H do hPPAR γ LBD, derivados de estudos de DLS, são representados como uma função da concentração de proteína..... 93
- Figura 22** - Curvas experimentais de SAXS para os LBDs dos PPARs. **A.** Curva de espalhamento e **B.** função de distribuição de distâncias geradas a partir dos dados experimentais do hPPAR α LBD e do complexo hPPAR α /hRXR α LBD. **C.** Curva espalhamento e **D.** função de distribuição de distâncias geradas a partir dos dados experimentais do hPPAR γ LBD e do complexo hPPAR γ /hRXR α LBD. **A.** e **C.** apresentam gráficos $\log I$ versus q mostrando o ajuste das curvas experimentais (triângulos invertidos para os monômeros e círculos para os dímeros) com as curvas teóricas dos modelos de alta resolução (linhas pretas para os monômeros e cinzas para os heterodímeros). Inserto: Gráfico de Guinier. Todos os dados foram normalizados..... 95
- Figura 23** - Modelos de SAXS. Envelopes de baixa resolução **A.** dos monômeros de hPPAR α LBD e **B.** dos heterodímeros hPPAR α /hRXR α LBD, derivados de cálculos *ab initio*. Superposição da média de 10 DAMs obtidos pelo DAMMIN com estruturas depositadas no PDB. Os modelos foram rotacionados a 90° em torno do eixo y e x, respectivamente. Em azul o DAM do monômero; em preto a estrutura cristalográfica do LBD do hPPAR α (PDB 1K7L); em verde o DAM do heterodímero e em preto e cinza o modelo de alta resolução do heterodímero hPPAR α /hRXR α LBD (PDB 1FM6 modificado)..... 96
- Figura 24** - Envelopes de baixa resolução **A.** dos monômeros de hPPAR γ LBD e **B.** dos heterodímeros hPPAR γ /hRXR α LBD, derivados de cálculos *ab initio*. Superposição da média de 10 DAMs obtidos pelo DAMMIN com estruturas depositadas no PDB. Os modelos foram rotacionados a 90° em torno do eixo y e x, respectivamente. Em ciano o DAM do monômero; em preto a estrutura cristalográfica do LBD do hPPAR γ (PDB 1FM6, somente o PPAR); em vermelho o DAM do heterodímero e em preto e cinza o modelo de alta resolução do heterodímero hPPAR γ /hRXR α LBD (PDB 1FM6). **C.** Superposição do modelo de corpo rígido (em tons de vermelho) com a estrutura cristalográfica (em preto), mostrando a abertura do ângulo imposta no modelo de corpo rígido, maior que a observada na estrutura cristalográfica..... 97
- Figura 25** - Formação assimétrica do heterodímero PPAR γ /RXR α LBD. Essa assimetria resulta em interações adicionais além de garantir um maior empacotamento de superfícies opostamente carregadas das proteínas..... 98
- Figura 26** - Curvas experimentais de SAXS do hPPAR γ DBD-LBD e de seu complexo com o hRXR α DBD-LBD. **A.** Curva espalhamento e **B.** função de distribuição de distâncias geradas a partir dos dados experimentais do hPPAR γ DBD-LBD (triângulos amarelos invertidos) e do complexo hPPAR γ /hRXR α DBD-LBD (círculos magenta). Os gráficos mostram o ajuste das curvas experimentais com as curvas teóricas dos modelos cristalográficos (linha preta para o monômero e cinza para o heterodímero) e de corpo rígido (linha cinza escuro para o monômero e cinza claro para o heterodímero). Inserto: Gráfico de Guinier. Todos os dados foram normalizados..... 99
- Figura 27** - Envelopes de baixa resolução. **A.** monômeros de hPPAR γ DBD-LBD e **B.** heterodímeros hPPAR γ /hRXR α DBD-LBD. Superposição do DAM médio obtidos pelo DAMMIN com estruturas cristalográficas. Os modelos foram rotacionados a 90° em torno do eixo y e x, respectivamente. Em amarelo o DAM do monômero; em preto o modelo de corpo rígido do hPPAR γ DBD-LBD; em magenta o DAM do

heterodímero e em preto e cinza o modelo de corpo rígido gerado para o heterodímero hPPAR γ /hRXR α DBD-LBD. C. Superposição do modelo de corpo rígido (em tons de rosa) com a estrutura cristalográfica (PDB 3DZU, em preto), mostrando as diferenças entre as posições dos DBDs do modelo de corpo rígido e da estrutura cristalográfica. Os DBDs foram transladados e a distância entre a posição inicial e final dos mesmos está representada pelas linhas tracejadas em vermelho para DBDs do PPAR em azul para os DBDs do RXR.100

Figura 28 - Grau de deuteração do monômero de PPAR e de seus complexos com o RXR e com o DNA (DR-1). A porcentagem de deuteração está disposta em função da sequência de aminoácidos do PPAR, mostrando assim as características dinâmicas da proteína em solução. Cada bloco de três linhas representa uma preparação de amostra (PPAR monômero, complexo PPAR+RXR, na ausência e presença do DR-1) em três períodos de incubação com deutério (3, 10 e 30 minutos). A sequência foi colorida de acordo com a troca de H/D, sendo azul para 0-10%, verde para 11-30%, amarelo 31-50% e vermelho quando a troca era acima de 50%.....102

Figura 29 - Modelos da estrutura do hPPAR γ DBD-LBD coloridos de acordo com os dados de H/D-Ex MS. As regiões protegidas e expostas ao solvente foram coloridas como indicativo do grau de deuteração, sendo azul para 0-10%, verde para 11-30%, amarelo 31-50% e vermelho quando a troca era acima de 50%. Dados das amostras de **A.** hPPAR γ ; **B.** hPPAR γ /hRXR α , com o quadro mostrando detalhes da interface de dimerização (H10-11) **C.** hPPAR γ /hRXR α +DR-1, com o quadro preto mostrando a interface de dimerização (H10 e H11) e o quadro laranja a terceira interface de dimerização (H7).104

Figura 30 - Esquema representativo do mecanismo de heterodimerização e ligação ao DNA. Após a ativação, o PPAR recruta o RXR, formando um heterodímero intermediário, que possui os LBDs e os DBDs em uma conformação estendida. Com a ligação ao DNA, o heterodímero sofre alterações conformacionais, tornando-se mais compacto e menos exposto ao solvente.....106

Figura 31 - Cristais obtidos do receptor hPPAR α complexado ao ligante WY14643 através da técnica de difusão à vapor e sob a condição composta por 100 mM Tris-HCl pH 7,5 e 25% PEG 20000. Esses cristais foram submetidos aos experimentos de difração de raios-X para posterior obtenção do modelo de alta resolução da estrutura do receptor.111

Figura 32 - Modelo de alta resolução do complexo hPPAR α LBD+WY14643 obtido através de experimentos de difração de raios-X. A figura apresenta as duas moléculas de proteína, cada uma ligada a duas moléculas de ligante, uma molécula de etileno glicol e moléculas de água, representando o conteúdo da unidade assimétrica designada para o cristal. As duas moléculas proteicas estão representadas em ciano, porém com diferentes tonalidades e o mesmo padrão assinala em rosa as moléculas de ligante, laranja o etileno glicol e em azul moléculas de água.113

Figura 33 - Estrutura do hPPAR α LBD ligada a duas moléculas de WY14643. **A.** LBD do receptor indicando a região do primeiro e segundo sítio. **B.** Detalhes das interações no primeiro sítio, com destaque ao resíduo Tyr464 da H12. **C.** Interações do ligante no segundo sítio. Representado em tracejado preto as ligações de hidrogênio e em círculos pontilhados resíduos envolvidos nas interações hidrofóbicas.....114

Figura 34 - Análise da seletividade do ligante WY14643 frente aos três subtipos de PPAR. **A.** Curva dose-resposta do ligante WY14643 comparando as atividades relativas da luciferase dos três receptores. **B.** Sobreposição das estruturas cristalográficas,

destacando o resíduo de Y314 do hPPAR α LBD+WY14643 em ciano, H287 do hPPAR β LBD (PDB 3ET2) em alaranjado e H323 do hPPAR γ LBD (PDB 3ET0) em verde. WY14643 em magenta. RMSD entre PPAR α e β : 0,546 Å; RMSD entre PPAR α e γ : 0,655 Å. 116

Figura 35 - Regiões ocupadas pelo segundo ligante WY14643. **A.** Alinhamento de todas as estruturas do hPPAR α LBD depositadas no PDB. Todos os ligantes presentes no sítio ativo da proteína (esferas azuis) ocupam a região do primeiro ligante e parte da região do segundo ligante (região indicada pela seta preta). **B.** Alinhamento de algumas estruturas do hPPAR γ LBD complexadas a agonistas parciais, região representada por esferas verdes, e que coincide com parte da região ocupada pelo segundo ligante WY14643 (região indicada pela seta vermelha). 117

Figura 36 - Análise da atividade do hPPAR α nativo e do mutante V255A/I263A na presença de WY14643. **A.** Curva dose-resposta do receptor nativo hPPAR α (em ciano) e de seu mutante V255A/I263A (em vermelho) através da titulação do ligante WY14643 e, em **B.** a ilustração do segundo sítio e em destaque os resíduos modificados através de mutações sítio dirigidas. 119

Figura 37 - Influência da segunda molécula de WY14643 na mobilidade da cadeia principal do hPPAR α LBD. As mobilidades são mostradas como *snaphots* alinhados e derivados das trajetórias da dinâmica molecular. A coloração segue uma escala em que: azul = baixa mobilidade (RMSF $\leq$ 0,5 Å); verde mobilidade intermediária (RMSF $\leq$ 1,75 Å); e vermelho = alta mobilidade (RMSF $\leq$ 3,0 Å). Esses resultados sugerem que o receptor é estabilizado pela presença de um ligante extra no segundo sítio **A.** quando comparado ao receptor na presença de um único ligante **B.** As maiores diferenças podem ser observadas na região do Ω -loop, no loop H2/H2' e na H12. 120

Figura 38 - Mobilidades da H12, Ω -loop e loop H2/H2' computadas através de trajetórias essenciais. **A.** Distribuição RMSD da H12 computada considerando a sua estrutura média, que mostra sua baixa mobilidade na presença de dois ligantes (azul) quando comparada na presença de apenas um ligante (vermelho). **B.** RMSD da H12 graficado em função do Ω -loop e do loop H2/H2', através dos cálculos das trajetórias essenciais. 121

Figura 39 - Análise das interações do PPARs. Interação com **A.** coativador SRC-1; e com **B.** RXR, provocadas após a adição dos ligantes. Resultados obtidos com a técnica de duplo-híbrido em células de mamíferos. Os valores no eixo y são apresentados como vezes de ativação, ou seja, o controle sem o ligante é uma vez e o valor obtido de luminescência com o ligante é dividido pelo valor de luminescência do controle. Em ciano o PPAR α , em alaranjado o PPAR β e em verde o PPAR γ 122

Figura 40 - Análise das interações entre o PPAR α com GRIP-1 e NCOR-1, geradas após a titulação do ligante. Resultados obtidos com a técnica de duplo-híbrido em células de mamíferos. Os valores no eixo y são apresentados como valores de luminescência obtidos. 123

Figura 41 - Experimentos de imunohistoquímica. **A.** Esses experimentos confirmaram a presença da expressão do PPAR α nas células HCEC, principalmente na região referente ao núcleo celular, como esperado. **B.** Mudanças na expressão das citocinas IL-6 e IL-8 induzidas pela modulação da atividade do PPAR α através da adição do ligante WY14643, sob condições hipertônicas (450 mOsm). 124

- Figura 42** - Cristais obtidos do receptor hPPAR α complexado a ácidos graxos através da técnica de difusão à vapor e sob as condições descritas acima. **A.** hPPAR α LBD+2AG; **B.** hPPAR α LBD+AG10C; e **C.** hPPAR α LBD+AG16C.131
- Figura 43** - Estrutura cristalográfica do hPPAR α LBD complexado a ácidos graxos de 9 e 16 carbonos. **A.** LBD do receptor indicando a região de ligação dos dois ácidos graxos no interior do bolsão de ligação da proteína. **B.** Detalhes do sítio ativo e posição do ácido graxo de 9 carbonos (AG 9C). Em destaque os resíduos que participam de ligações de hidrogênio com o ácido graxo (resíduos nomeados) e, em destaque também, os resíduos que fazem interações hidrofóbicas (*dots*). **C.** Detalhes do sítio ativo e posição do ácido graxo de 16 carbonos (AG 16C). Em destaque o resíduo que faz uma ligação de hidrogênio com o oxigênio da cabeça polar do ácido graxo (resíduo nomeado) e os resíduos que fazem interações hidrofóbicas (*dots*). Representado em tracejado preto as ligações de hidrogênio.134
- Figura 44** - Estrutura do hPPAR α LBD complexado ao ácido graxo de 10 carbonos (AG 10C). **A.** LBD do receptor com a densidade eletrônica em torno do ligante. **B.** Detalhes do sítio ativo e a posição do ligante. Em destaque os resíduos que fazem ligações de hidrogênio com o ácido graxo (resíduos nomeados e tracejado em preto as ligações de hidrogênio).135
- Figura 45** - Modelo cristalográfico do hPPAR α LBD complexado ao ácido graxo de 16 carbonos (AG16C). **A.** LBD do receptor e densidade eletrônica em torno do ligante. **B.** Detalhes do sítio ativo e posição do ligante. Em destaque os resíduos que fazem ligações de hidrogênio com o ácido graxo (resíduos nomeados e tracejado preto para as ligações de hidrogênio).136
- Figura 46** - Alinhamento dos modelos estruturais dos complexos formados pelo LBD do PPAR α e os diferentes tipos de ácidos graxos. **A.** Os três modelos possuem ligantes de tamanhos e ocupação variados, mas que não modificaram drasticamente o enovelamento proteico, com somente uma alteração na região destacada em **B.** referente ao Ω -loop e H2' (vermelho), que acarretou uma acomodação diferencial e estabilização dessa região. **C.** Alinhamento destacando a região compartilhada pelos três ácidos graxos próxima a H12 (círculo vermelho) que possibilita a interação com o resíduo Y464.138
- Figura 47** - Demonstração do padrão diferenciado de distribuição dos fatores de temperatura (B-fatores) das estruturas cristalográficas dos complexos PPAR α +ácidos graxos. **A.** hPPAR α +2AG; **B.** hPPAR α +AG10; **C.** hPPAR α +AG16.139
- Figura 48** - Alinhamento das estruturas complexadas a ácidos graxos alinhadas a duas estruturas ligadas a ligantes sintéticos de alta afinidade (em cinza e circundados por esferas vermelhas) (PDBs 3KDU e 1K7L). Os ácidos graxos ocupam as mesmas regiões exploradas por esses ligantes de alta afinidade, apresentando a mesma posição do grupo carboxila que interage com a H12 (círculo preto).140
- Figura 49** - Ensaio de transativação do PPAR α /GAL4 realizado com diferentes concentrações de ácidos graxos e do ligante GW7647, o último usado como controle. O gráfico mostra a atividade relativa da luciferase em função do aumento da concentração das moléculas ligantes. Todos os ensaios foram realizados em três replicatas e as diferenças nas eficiências de transfecções foram normalizados pela medida da atividade da luciferase de *Renilla* no mesmo lisado celular.142

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	<i>Primers</i> construídos para a inserção de mutações em plasmídeos já existentes.....	74
Tabela 2 -	Valores obtidos para os R_H e MM das proteínas de interesse, segundo as calibrações realizadas nas colunas de cromatografia de exclusão por tamanho utilizadas.	91
Tabela 3 -	Parâmetros estruturais dos hPPAR α LBD e hPPAR α /hRXR α LBD referentes às medidas de SAXS.	94
Tabela 4 -	Parâmetros estruturais dos hPPAR γ LBD e hPPAR γ /hRXR α LBD referentes às medidas de SAXS.	94
Tabela 5 -	Parâmetros estruturais dos hPPAR γ DBD-LBD e hPPAR γ /hRXR α DBD-LBD referentes às medidas de SAXS.	99
Tabela 6 -	Parâmetros e estatísticas da coleta, processamento e refinamento dos dados cristalográficos do hPPAR α LBD complexado ao ligante WY14643.....	112
Tabela 7 -	Valores de EC_{50} obtidos para o PPAR α e seus mutantes, dos ligantes WY14643 e GW7647, calculados através das curvas dose-resposta.	118
Tabela 8 -	Parâmetros e estatísticas da coleta, processamento e refinamento dos dados cristalográficos do hPPAR α LBD complexado a diferentes ácidos graxos.....	132
Tabela 9 -	Ácidos graxos encontrados na amostra de hPPAR α LBD purificada através de espectrometria de massa.	143

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AD	Domínio de Ativação (do inglês <i>Activation Domain</i>)
AF-2	Função de Ativação-2 (do inglês <i>Activation Function-2</i>)
AG	Ácidos Graxos
AR	Receptor de Andrógeno (do inglês <i>Androgen Receptor</i>)
CBP	Proteína de Ligação à CREB (do inglês <i>CREB-Binding Protein</i>)
CMV	Citomegalovírus
DAM	Modelos de Átomos Simulados (do inglês <i>Dummy Atoms Models</i>)
DBD	Domínio de Ligação ao DNA (do inglês <i>Ligand Binding Domain</i>)
DR-1	Repetição Direta com Espaçamento de 1 Nucleotídeo (do inglês <i>Direct Repeat</i>)
ER	Receptor de Estrogênio (do inglês <i>Estrogen Receptor</i>)
FABP	Proteína Transportadora de Ácidos Graxos (do inglês <i>Fatty Acids Binding Protein</i>)
GR	Receptor de Glicocorticóide (do inglês <i>Glucocorticoid Receptor</i>)
GRE	Elemento Responsivo do Gal (do inglês <i>Gal Responsive Element</i>)
H/D-Ex MS	Troca de Hidrogênio por Deutério Analisada por Espectrometria de Massas (do inglês <i>Hydrogen/Deuterium Exchange analyzed by Mass Spectrometry</i>)
HCEC	Células Humanas do Epitélio da Córnea (do inglês <i>Human Corneal Epithelial Cells</i>)
HRE	Elemento Responsivo Hormonal (do inglês <i>Hormone Response Element</i>)
LBD	Domínio de Ligação aos Ligantes (do inglês <i>Ligand Binding Domain</i>)
MMM	Marcador de Massa Molecular (usado na técnica de SDS-PAGE)
NCoR	Correpressor de Receptor Nuclear (do inglês <i>Nuclear receptor Co-Repressor</i>)
NGFI	Receptor Induzido pelo Fator de Crescimento do Nervo (do inglês <i>Neurite Growth Factor-Induced</i>)
PPAR	Receptor Ativador da Proliferação de Peroxissomos (do inglês <i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor</i>)
PPRE	Elementos Responsivos aos PPARs (do inglês <i>Peroxisome Proliferator Responsive Element</i>)

PR	Receptor de Progesterona (do inglês <i>Progesterone Receptor</i>)
PXR	Receptor de Pregnanos X (do inglês <i>Pregnane X Receptor</i>)
RAR	Receptor de Ácido Retinóico (do inglês <i>Retinoic Acid Receptor</i>)
RMSD	Raiz Quadrada do Desvio Médio Quadrático (do inglês <i>Root-Mean-Square Deviation</i>)
RMSF	Raiz Quadrada da Variação Média Quadrática (do inglês <i>Root-Mean-Square Fluctuation</i>)
RN	Receptor Nuclear
RXR	Receptor de Retinóide X (do inglês <i>Retinoid X Receptor</i>)
SAXS	Espalhamento de Raios-X a Baixos Ângulos (do inglês <i>Small Angle X-ray Scattering</i>)
SMRT	Silenciador e Mediador para Receptores de Retinóides e de Hormônio Tireoidiano (do inglês <i>Silencing Mediator for Retinoid or Thyroid hormone receptors</i>)
SRC1	Coativador de Receptor Nuclear 1 (do inglês <i>Steroid Receptor Coactivator 1</i>)
TR	Receptor de Hormônio Tireoidiano (do inglês <i>Thyroid hormone Receptor</i>)
VDR	Receptor de Vitamina D (do inglês <i>Vitamin D Receptor</i>)

SUMÁRIO

1	Introdução.....	31
1.1	Receptores Nucleares.....	31
1.2	Mecanismo de Ação dos Receptores Nucleares.....	33
1.3	Dimerização dos Receptores Nucleares	35
1.4	Os Receptores Ativadores da Proliferação de Peroxissomos (PPARs).....	37
1.5	PPAR α	39
1.6	Características Estruturais do Domínio de ligação ao Ligante do PPAR	41
1.7	Moléculas Sinalizadoras da Função dos PPARs – Ligantes	46
1.7.1	Ligantes Naturais	46
1.7.2	Ligantes Sintéticos.....	48
1.8	Potencial Farmacológico	50
2	Objetivos	55
3	Materiais e Métodos.....	59
3.1	Procedência dos clones	59
3.2	Subclonagem do gene de hPPAR α LBD em pET28a(+)......	59
3.3	Obtenção das proteínas recombinantes	61
3.3.1	Teste de expressão do hPPAR α LBD	61
3.3.2	Expressão em larga escala	61
3.3.3	Purificação	62
3.3.3.1	Purificação por afinidade.....	62
3.3.3.2	Purificação por cromatografia por exclusão de tamanho	63
3.4	Clivagem da cauda de histidina	63
3.5	Estudos oligoméricos em solução.....	63
3.5.1	Cromatografia analítica por exclusão de tamanho e obtenção do heterodímero	64
3.5.2	Eletroforese por gel não desnaturante (gel nativo)	65
3.5.3	Espalhamento de luz dinâmico (DLS).....	66
3.5.4	Estudos de espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS).....	66
3.5.4.1	Análise dos dados de SAXS	67
3.5.4.2	SAXS e modelos <i>ab initio</i>	68
3.5.4.3	Geração de modelos de corpo rígido.....	68
3.6	Ensaio de troca de hidrogênio por deutério acoplados à espectrometria de massas	69
3.7	Cristalografia de proteínas.....	71
3.7.1	Ensaio de cristalização	71
3.7.2	Coleta e processamento de dados de difração de raios-X.....	72
3.7.3	Obtenção das fases e refinamento das estruturas cristalográficas	73
3.8	Mutações sítio dirigidas.....	74
3.9	Ensaio de transativação de gene repórter	74
3.10	Ensaio de duplo-híbrido em células de mamíferos.....	76
4	Resultados e Discussão: Obtenção das Proteínas Alvos	81
4.1	Subclonagem hPPAR α LBD em pET28a(+)......	81
4.2	Obtenção da proteína hPPAR α LBD pura e clivada.....	81
4.2.1	Expressão proteica	81
4.3	Purificação e clivagem da cauda de histidina.....	82

5	Estudos Oligoméricos do PPAR em Solução.....	89
5.1	Introdução.....	89
5.2	Resultados e Discussão.....	90
5.2.1	Análise do estado oligomérico do PPAR em solução por resultados de cromatografia analítica por exclusão de tamanho, gel nativo e DLS.....	90
5.2.2	Estudos de espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS).....	93
5.2.2.1	Análises dos hPPAR α e hPPAR γ LBD isolados e em complexo com o hRXR α LBD.....	94
5.2.2.2	Modelos de SAXS sugerem uma disposição diferente para os domínios das proteínas em solução.....	98
5.2.3	Análise da dinâmica da proteína e formação do complexo através da troca de hidrogênio por deutério avaliada por espectrometria de massas.....	101
5.3	Conclusão.....	105
6	Análises Estruturais e Funcionais do hPPARα LBD em Complexo com o Ligante WY14643.....	109
6.1	Introdução.....	109
6.2	Resultados e discussão	110
6.2.1	Cristalografia.....	110
6.2.1.1	Ensaio de cristalização	110
6.2.1.2	Coleta e processamento de dados de difração de raios-X.....	111
6.2.2	Análise do modelo cristalográfico do complexo hPPAR α LBD+WY14643 com o auxílio de ensaios funcionais	113
6.2.2.1	Análise da seletividade do WY14643 pelo isotipo α do PPAR.....	115
6.2.2.2	Funcionalidade do segundo sítio de ligação	117
6.2.3	A segunda molécula de WY14643 promove a estabilização da região AF-2.....	119
6.2.4	Ensaio de duplo-híbrido em células de mamíferos para análise de interações proteína:coativador/correpressor.....	122
6.2.5	Ensaio funcional verificaram a atividade anti-inflamatória do WY14643	123
6.3	Conclusão	125
7	Mecanismos Moleculares Envolvidos na Ativação do hPPARα LBD por seus Ligantes Naturais.....	129
7.1	Introdução.....	129
7.2	Resultados e discussão	130
7.2.1	Cristalografia.....	130
7.2.1.1	Ensaio de cristalização	130
7.2.1.2	Coleta e processamento de dados de difração de raios-X.....	131
7.3	Análises dos modelos de alta resolução dos complexos formados pelo hPPARα LBD e ácidos graxos.....	132
7.3.1.1	Medida da atividade diferenciada dos ácidos graxos	141
7.3.1.2	Espectrometria de massas para checar a presença de ácidos graxos na amostra cristalina	142
7.4	Conclusão	143
8	Conclusão e Considerações Finais.....	147
	REFERÊNCIAS.....	149
	ANEXO	161

CAPÍTULO 1

Introdução

1 Introdução

1.1 Receptores Nucleares

Os receptores nucleares (RN) constituem uma grande família de fatores transcricionais, que atuam como interceptores da transcrição, em resposta às moléculas sinalizadoras, incluindo: hormônios, vitaminas lipofílicas, lipídeos provenientes da dieta, ou outros sinais intracelulares. Essas moléculas são adequadas para mediar a comunicação intracelular, pois são capazes de passar livremente pela membrana celular e atingir o seu alvo¹. Em virtude desta atividade dependente do ligante, os RN servem como uma interface entre o ambiente celular e o nosso genoma².

A disponibilidade de informação sequencial revela que os seres humanos codificam 48 membros da família de RN³, essenciais para a sobrevivência dos organismos vivos, pois os mesmos exercem papéis importantes em muitos processos fisiológicos críticos, como, por exemplo: metabolismo, homeostase, diferenciação, crescimento, desenvolvimento e reprodução. Disfunções na sinalização desses receptores levam a doenças metabólicas, proliferativas e reprodutivas como o câncer, infertilidade, obesidade e diabetes⁴. Essa superfamília de receptores tem um histórico evolucionário comum, o que explica a relação de alta identidade sequencial existente e a similaridade das funções celulares exercidas⁵.

As análises evolutivas dessa superfamília de RNs sugerem uma divisão em subfamílias ou classes: i) família dos receptores de esteróides (receptores de progesterona (PR), estrógeno (ER), glicocorticóide (GR), andrógeno (AR) e mineralcorticóide); ii) família dos receptores tireoidianos/retinóides (receptor de vitamina D (VDR), de ácido retinóico (RAR), de hormônio tireoidiano (TR) e ativador da proliferação de peroxissomos (PPAR); iii) e a família dos receptores órfãos, cujos ligantes não foram ainda definidos⁶. O Receptor de Retinóide X (RXR) foi considerado um receptor órfão até que seu ligante, o ácido 9-cis retinóico, fosse identificado, o que conferiu o nome de “Receptor de 9-cis retinóico”. Além desse, outros receptores tiveram seus ligantes identificados, como os eicosanóides e ácidos graxos para os PPARs⁷, a progesterona para o receptor de pregnanos X (PXR)⁸, entre outros.

Os RNs exercem suas funções de regulação da expressão gênica através do reconhecimento de elementos responsivos específicos em regiões reguladoras de genes alvos no DNA, que são seletivos a um receptor ou a uma classe de receptores⁹. Uma vez complexados ao DNA, esses receptores recrutam proteínas acessórias como coativadores, correpressores e fatores de transcrição basais, regulando assim a transcrição gênica¹⁰.

Uma particularidade dessa superfamília de RNs é que todos os seus membros possuem a mesma organização estrutural em domínios funcionais (Figura 1). O domínio N-terminal, comumente nomeado de domínio de ativação-1 (AF-1), possui a função de ativação independente do ligante. Este domínio, reconhecido por coativadores e/ou fatores de transcrição, varia bastante em tamanho e identidade sequencial entre os diferentes membros da superfamília dos receptores e tem como principal função a de conferir especificidade à célula, ao DNA e aos promotores⁹.

Figura 1 - Organização estrutural em domínios funcionais dos receptores nucleares. **A.** Representação linear em barras da divisão dos domínios; **B.** representação em *cartoon* da estrutura cristalográfica do complexo PPAR γ +RXR α +DNA (PDB 3DZU). A região N-terminal que possui a AF-1 está representada pela barra rosa e ausente na estrutura cristalográfica devido à sua alta mobilidade; em verde a região que corresponde ao DBD; o LBD representado em azul e entre o DBD e o LBD está o *hinge* em preto.

O domínio responsável pelo reconhecimento dos elementos específicos no DNA, como o próprio nome já diz, é o domínio de ligação ao DNA (DBD – *DNA Binding Domain*), que é formado por, aproximadamente, 70 aminoácidos e, apresenta elevada identidade sequencial, possuindo 9 resíduos de cisteína, além de outros resíduos requeridos para garantir a alta afinidade pelo DNA. O DBD é estruturalmente composto por três hélices, onde uma delas irá se encaixar no sulco maior da sequência de DNA reconhecida. A segunda hélice, um pouco menor que a primeira, e o *loop* que a precede criam uma interface de dimerização¹⁰.

Esse domínio possui dois motivos tipo “dedo de zinco” (comum entre os receptores nucleares) que, juntos, formam uma estrutura compacta e independente¹¹.

O *hinge* possui propriedades funcionais ainda desconhecidas, contudo, além de possibilitar a movimentação entre os domínios e permitir que o DBD reconheça muitas combinações de elementos responsivos no DNA, ele pode ser fosforilado e essa fosforilação leva ao aumento da ativação transcricional⁶.

A porção C-terminal da proteína é composta pelo domínio de ligação ao ligante (LBD). Ele é comumente formado por 250 aminoácidos e contém um importante elemento regulatório chamado de domínio de função de ativação 2 (*activation function-2*, AF-2), assim como resíduos específicos requeridos para o reconhecimento e ligação do ligante. Análises baseadas em alinhamentos sequenciais sugerem um enovelamento comum para a região do LBD de todos os membros da família dos RN¹².

1.2 Mecanismo de Ação dos Receptores Nucleares

Os RNs são sintetizados no citoplasma da célula pelos ribossomos e a passagem para o ambiente nuclear ocorre devido ao sinal de localização celular, presente na região do *hinge* dessas proteínas. Dessa maneira, os receptores, em sua grande maioria, já residem no núcleo celular mesmo na ausência de moléculas ativadoras¹³.

No interior do núcleo, os receptores atuam como comutadores moleculares, alternando entre estados de repressão e ativação transcricional, dependendo da presença ou ausência de ligantes e da associação com correpressores ou coativadores¹⁴. Essas proteínas correguladoras são geralmente componentes de um grande complexo multiprotéico que atuam de maneira sequencial e/ou combinatória para remodelar a cromatina, mobilizar os nucleossomos e recrutar a maquinaria transcricional¹⁵.

Na ausência de ligantes, os RN se encontram ligados a correpressores transcricionais, que incluem o Correpessor de Receptor Nuclear 1 e 2 (NCoR1/NCoR2), onde o último também é conhecido como Silenciador e Mediador para Receptores de Retinóides e de Hormônio Tireoidiano (SMRT). Esta ligação ocorre via interação hidrofóbica de sequências conservadas (motivo L/IxxIxxL) do correpessor com um sulco hidrofóbico localizado na superfície do LBD, compreendido pelas hélices 3 e 4. O mecanismo de repressão da transcrição envolve o recrutamento de desacetilases de histonas (HDACs), que produzem uma condensação da estrutura da cromatina exatamente sobre os promotores alvos, impedindo

assim, que os receptores responsáveis pela ativação da transcrição possam se encaixar nos elementos responsivos do DNA¹⁶.

Fundamentalmente, a ligação de um ligante ao receptor provoca uma mudança conformacional na região AF2, fazendo com que essa se feche sobre o LBD. Essa nova conformação desestrutura a cavidade hidrofóbica de interação dos correpressores, ocasionando assim, a dissociação do complexo correpressor.

Posteriormente, ocorre a formação do complexo heterodimérico com outros fatores de transcrição, principalmente com o RXR, capaz de reconhecer certas sequências de DNA na porção 5' de seus genes alvos. Essas sequências são conhecidas como Elementos Responsivos (HREs – *Hormone Responsive Elements*), formados por repetições da sequência 5'-AGGTCA-3' e que, através de eventos de duplicação, extensão, mutação e variações na orientação relativa dessas sequências geram respostas seletivas a um específico receptor ou para uma classe deles⁴.

Os RNs, que funcionam como monômeros, ligam-se a uma sequência consenso, enquanto que aqueles que funcionam como homo- ou heterodímeros se ligam a duas sequências consenso, que juntas formam um HRE funcional. Nos HREs essas sequências consenso podem estar arranjadas como repetições diretas (DR), como palíndromos (Pal) ou como palíndromos invertidos (IP) e ainda separadas por uma pequena sequência variável, cujo tamanho (entre 0 a 6 pares de bases) é específico para os diferentes dímeros de receptores. Desse modo, a especificidade da ligação do RN é determinada pela sequência nucleotídica e estrutura do HRE¹³.

A formação do complexo heterodimérico e a ligação ao DNA induzem ao recrutamento de proteínas coativadoras capazes de remodelar a cromatina, ativando a transcrição. Dentre as proteínas que possuem essa função, podemos citar o Coativador de Receptor Nuclear 1 (SRC1), o p300 e o CBP (*Creb-Binding Protein*). Os motivos de interação desses coativadores são altamente conservados e contém uma ou mais cópias de uma sequência consenso LxxLL (Leu – aminoácido x – aminoácido x – Leu – Leu).

Diferentes ligantes podem alterar as especificidades de ligação dos cofatores aos RNs, gerando, dessa maneira, um complexo conjunto de proteínas com seletividade diferenciada dependente do tipo de RN, do agonista presente e do motivo LxxLL envolvido, uma vez que algumas proteínas possuem múltiplas cópias desse motivo¹⁷. Esse complexo de moléculas coativadoras contém histonas acetil-transferases (HATs) e outras proteínas que induzem à transcrição gênica através da modificação e relaxamento da cromatina, próxima à região promotora⁹. O mecanismo de ação dos RNs pode ser observado na Figura 2.

Figura 2 - Mecanismo de ação dos RNs. **A.** No interior do núcleo celular, os receptores, na ausência de moléculas ativadoras, se encontram ligados aos corressores. **B.** Quando ocorre a ligação com um ligante, os RNs sofrem mudanças conformacionais que ocasionam o desligamento dos corressores e **C.** a formação do heterodímero funcional com o receptor RXR. **D.** O heterodímero reconhece sequências específicas no DNA (HRE), recrutando os coativadores e todo complexo proteico envolvido na maquinaria transcricional, que são capazes de modificar a estrutura da cromatina e iniciar o processo da transcrição de genes alvos.

Os ligantes endógenos e exógenos podem recrutar os corretores de maneira diferenciada, promovendo o desencadeamento de respostas fisiológicas diversas, tanto na modulação da atividade biológica, quanto das possíveis ações tóxicas decorrentes da ação direta ou indireta dos RNs sobre seus diversos genes-alvos¹⁸.

1.3 Dimerização dos Receptores Nucleares

O processo de dimerização é um mecanismo que tem como objetivo o aumento da afinidade e especificidade de ligação do receptor ao seu HRE, uma vez que promove uma

ligação cooperativa de seus domínios ao DNA. Portanto, a maneira como os receptores se ligam aos HREs está vinculada ao seu estado de oligomerização e, normalmente, a ligação pode ocorrer de três maneiras (Figura 3):

- Monomérica, quando se liga a um sítio simples. Ex: alguns receptores órfãos como o NGFI (*Nerve Growth Factor-Induced*);
- Homodimérica, quando se liga a sítios duplicados, principalmente no formato de palíndromo ou palíndromo invertido, ex: RXR, ER, TR, GR, PR e AR;
- Heterodimérica, quando se liga a sítios duplicados com repetição direta majoritariamente, mas também a palíndromos e palíndromos invertidos. Ex: heterodímeros com RXR, que incluem os receptores PPAR, TR, RAR, LXR, VDR.

Figura 3 - Estados oligoméricos observados para os receptores nucleares e a interação com os HREs. **A.** Monômero, verificado principalmente para receptores órfãos e se ligam a um sítio simples da sequência consenso de elementos responsivos. Dímeros capazes de reconhecer **B.** repetições diretas da sequência consenso AAGTC; **C.** sequências palindrômicas e também **D.** HREs que apresentam a repetição em forma de palíndromo invertido. Os HREs podem apresentar variações no número de bases (n – destacado em vermelho) que separam as sequências consenso na formação dos elementos responsivos.

Os homodímeros de receptores de esteróides apresentam interfaces de dimerização em ambos os domínios DBD e LBD. No receptor de estrógeno (ER), a interface dimérica identificada no LBD é formada por resíduos das hélices 7, 8 e 9 incluindo, também, resíduos do *loop* localizado entre as hélices 8 e 9, porém há predominância de interações hidrofóbicas da região das hélices 10 e 11, que é conservada¹⁹.

Outros RNs exibem interfaces similares devido aos resíduos altamente conservados que formam as regiões descritas. Dados coletados para a dimerização dos LBDs de TR, RXR, RAR e VDR foram obtidos através de estudos de mutações pontuais e também de deleções. Tais estudos revelaram a existência de uma área comum de 40 aminoácidos situados nas

hélices 10 e 11, responsáveis pela homodimerização de RXR e TR e a heterodimerização entre: RAR-RXR, TR-RXR, e VDR-RXR²⁰.

O heterodímero PPAR γ /RXR α , diferentemente dos citados acima, apresentou uma assimetria em sua formação, possuindo uma interface de dimerização composta por motivos conservados que formam uma estrutura tipo *coiled-coil* ao longo da hélice 10 com interações eletrostáticas das hélices 7 e 9²¹. Através da análise da estrutura cristalográfica do complexo PPAR γ -RXR α -DNA, foram observadas interfaces adicionais entre esses domínios. O LBD auxilia o DBD de ambos os parceiros heterodiméricos na ligação ao DNA. Adicionalmente, o LBD forma a porção central do complexo que é envolto pelos outros domínios do PPAR e do RXR²².

Apesar de alguns receptores não esteroidais apresentarem-se como homodímeros (ex: TR e RXR), esses receptores ligam-se, preferencialmente, aos elementos responsivos na forma heterodimérica, principalmente com o promíscuo parceiro de vários receptores, o RXR. A formação do heterodímero com o RXR aumenta, fortemente, a eficiência de ligação ao DNA e a atividade transcricional quando comparado aos homodímeros dos mesmos receptores¹³. A formação desses homodímeros que possuem menor atividade pode estar envolvida em um processo de estocagem do receptor que, na presença de certos estímulos, se dissocia. Sendo assim, as formas oligoméricas são capazes de promover níveis adicionais de controle da atividade do receptor e consequentemente da transcrição de certos genes.

1.4 Os Receptores Ativadores da Proliferação de Peroxissomos (PPARs)

Os PPARs são membros da superfamília de receptores nucleares, subfamília 1 do tipo de receptores de hormônio tireoidiano e grupo C, sendo conhecidos como sensores biológicos do metabolismo lipídico, em particular dos níveis intracelulares de ácidos graxos. Além dessas funções, esses receptores também estão envolvidos em outros processos biológicos importantes como o crescimento, o desenvolvimento e a apoptose celular em uma grande variedade de células²³.

Quando foram descobertos, em meados de 1990, através da clonagem de um receptor órfão murino, esses receptores apresentavam ativação por compostos xenobióticos que causavam a proliferação de peroxissomos hepáticos em roedores, por isso o nome²⁴.

As variadas funções dos PPARs são mediadas por três subtipos desse receptor, codificados por diferentes genes (PPAR α – NR1C1, PPAR β/δ – NR1C3 e PPAR γ – NR1C2),

expressos em diferentes tecidos e em diferentes períodos do desenvolvimento celular, podendo apresentar ligantes, genes alvos e papéis biológicos diferentes²⁵. Essa multiplicidade de subtipos de receptores é um importante fator que contribui tanto para diversificação quanto para a especificação do sinal. Portanto, a potência e a especificidade da ativação dos PPARs são altamente dependentes do tipo celular²⁶ (Figura 4).

- PPAR α – Regula positivamente a β -oxidação de ácidos graxos, cetogênese, gluconeogênese e, simultaneamente suprime o catabolismo de amino ácidos e respostas inflamatórias²⁷. Expresso principalmente no fígado, porém, também possui expressão significativa no coração, músculos, rins, tecido adiposo e outros. Sua função anti-inflamatória ocorre especialmente em células do músculo liso e em células endoteliais vasculares²⁸⁻²⁹;
- PPAR β/δ – Possui funções relacionadas ao metabolismo lipídico e de ácidos graxos, na dissipação de energia e em processos inflamatórios³⁰, além da regulação de genes envolvidos no câncer de cólon³¹ e no processo de diferenciação epitelial, a cicatrização³². Sua expressão ocorre em muitos tecidos, porém mais intensamente no cérebro, tecido adiposo e pele;
- PPAR γ – É um modulador da diferenciação de ácidos graxos e estocagem de lipídeos e possui um papel importante na atividade anti-inflamatória de macrófagos e outros tecidos como o cólon. Esse receptor também contribui para a sensibilização à insulina, em parte, através da regulação da adiponectina, proteína responsável por aumentar a sensibilidade à insulina²⁷. Apesar de transcrito pelo mesmo gene, o PPAR, através do evento de *splicing* alternativo, é expresso em três diferentes isoformas:
 - $\gamma 1$: expresso em praticamente todos os tecidos, incluindo no coração, músculo, cólon, rim, pâncreas e baço;
 - $\gamma 2$: expresso majoritariamente no tecido adiposo e possui 28 aminoácidos adicionais, quando comparado às outras isoformas;
 - $\gamma 3$: expresso nos macrófagos, intestino grosso e tecido adiposo branco³³.

Figura 4 - Integração metabólica dos PPARs. Os três isotipos de PPAR regulam a homeostase de lipídeos e glicose através de suas atividades coordenadas no fígado, músculo e tecido adiposo³⁴.

Os três isotipos de PPAR possuem uma divergência na sequência de aminoácidos, suficiente para permitir especificidade na ligação do ligante. Contudo, enquanto ligantes seletivos têm sido sintetizados, ainda não é sabido se ligantes endógenos possuem tais seletividades operantes *in vivo*.

Os PPARs, quando ativados, ligam-se ao DNA como heterodímeros com o RXR, reconhecendo os elementos responsivos aos PPARs (PPRE), que são organizados como repetições diretas e espaçadas por um nucleotídeo e, portanto, chamados de *direct repeat-1* (DR-1)^{7,35}. O PPAR e o RXR ligam-se às extremidades 5' e 3' do PPRE, respectivamente, e uma pequena sequência de nucleotídeos, localizada imediatamente após à primeira sequência AGGTCA, confere uma complementariedade eletrostática³⁶. Os PPREs, como esperado, têm sido identificados em regiões regulatórias de uma variedade de genes que estão envolvidos, principalmente, no metabolismo de lipídeos e no balanço energético³⁷.

1.5 PPAR α

O PPAR α foi o primeiro membro da subclasse dos PPARs a ser identificado, tendo sido clonado por Issemann e Green em 1990²⁴. Esse receptor é altamente expresso em células

que possuem a capacidade de oxidação de ácidos graxos ativa e, portanto, possui funções significativas no metabolismo dessas moléculas, assim como na modificação dos níveis circulantes de lipoproteínas de alta densidade (HDL)³⁸. A ligação funcional entre a oxidação de ácidos graxos e o PPAR α foi primeiramente estabelecida em 1992, quando foi observado que a regulação do gene da acil-coenzima A (CoA) oxidase peroxissomal, envolvida na β -oxidação, é regulada pelo receptor³⁹.

Os genes-alvo do PPAR α funcionam em conjunto, de modo a sincronizar as complexas mudanças metabólicas necessárias à conservação de energia durante a alimentação e o jejum. Durante o jejum prolongado, os ácidos graxos são liberados pelo tecido adiposo e transportados para o fígado que induzem a ativação do PPAR α , promovendo a oxidação mitocondrial, peroxissomal e microssomal dos ácidos graxos, para gerar corpos cetônicos, fonte alternativa de açúcar para tecidos periféricos (Figura 5). Essa ação é particularmente importante por prevenir o acúmulo de ácidos graxos no fígado e, consequentemente, a esteatose hepática. Foi observado que a inativação do gene do PPAR α , em modelos animais, resulta em acúmulo de lipídios no fígado, severa hipocetonemia, hipoglicemia, hipotermia e elevados níveis plasmáticos de ácidos graxos^{34;40}.

Figura 5 - Esquema representativo do papel do PPAR α na resposta hepática à dieta. Durante o jejum, os ácidos graxos são liberados do tecido adiposo e chegam até o fígado, onde eles se ligam e ativam o PPAR α . Essa ativação do receptor resulta na estimulação de vários mecanismos funcionais, incluindo a oxidação de ácidos graxos, cetogênese e gliconeogênese, além da supressão do catabolismo de aminoácidos. Essas respostas estão associadas com um aumento (setas em verde) ou decréscimo (setas em vermelho) de componentes específicos no sangue²⁹.

Devido ao seu papel crucial na oxidação de ácidos graxos nas células do fígado, o PPAR α pode aumentar o consumo de energia de modo a garantir o controle do metabolismo energético e o peso corporal. Assim, a ativação desse receptor promove a utilização de gordura como fonte de energia e ele pode ser considerado alvo no tratamento da obesidade, além de já ser o alvo de muitos fármacos disponíveis para o tratamento de dislipidemias⁴¹.

O desbalanço da homeostase lipídica está ligada a doenças cardiovasculares, além de obesidade, resistência à insulina e hipertensão. Em particular, a diminuição dos níveis de triglicerídeos no plasma e elevação das HDLs possuem uma importância vital na redução de riscos cardiovasculares em pacientes com diabetes e são os fibratos que medeiam esses efeitos, através da ativação do PPAR α . Como há expressão de PPAR α nas células vasculares, os seus efeitos contribuem diretamente com a eficiência no tratamento da aterosclerose⁴².

Além dessas ações metabólicas, o PPAR α pode diminuir a expressão de inúmeros fatores de transcrição pró-inflamatórios, exibindo efeitos anti-inflamatórios no fígado, tecido adiposo e parede vascular. No tecido adiposo especificamente, o PPAR α pode controlar o processo inflamatório por três mecanismos: regulação direta da expressão de genes inflamatórios; diminuição da hipertrofia dos adipócitos, a qual está ligada ao estado altamente inflamatório do tecido adiposo; e eventos sistêmicos provenientes do fígado⁴³.

1.6 Características Estruturais do Domínio de ligação ao Ligante do PPAR

As estruturas tridimensionais de muitos LBDs de receptores nucleares complexados a vários ligantes já foram determinadas, aprovisionando, ainda mais, o entendimento das bases estruturais e o modo de ação de agonistas e antagonistas⁴⁴.

O enovelamento terciário desse domínio é tipicamente formado por 12 hélices- α (no caso do PPAR há uma hélice 2' adicional) e de 3 a 4 fitas- β . As hélices são organizadas como três camadas empilhadas, caracterizando um enovelamento do tipo sanduíche de hélices- α (Figura 6A). As hélices que formam as camadas superficiais são alinhadas paralelamente, enquanto que as hélices do meio cruzam as mais externas ocupando, principalmente, a parte superior na estrutura, formando uma cavidade interna na parte inferior da estrutura onde irão se alojar as pequenas moléculas, ou ligantes¹⁰. O primeiro passo de ativação dos RNs é iniciado pela ligação ao ligante. A especificidade do complexo LBD-ligante é amplamente baseada em interações hidrofóbicas, na rede de ligações de hidrogênio e no tamanho e

formato dos bolsões de ligação, portanto, o tamanho dessa cavidade e a afinidade de ligação varia significativamente entre os membros da família²⁷.

Figura 6 - Enovelamento tridimensional e topologia do domínio de ligação ao ligante de PPARs. **A.** Representação em *cartoon*, com as 13 hélices em formato de cilindro, organizadas em três camadas sobrepostas (sanduíche de hélices- α) formando o LBD. **B.** Imagem topológica do mesmo domínio, ressaltando as regiões e elementos de estrutura secundária envolvidos na interação com os ligantes e na formação de dímeros.

Os bolsões de ligação ao ligante dos PPARs é uma cavidade hidrofóbica bastante volumosa, quase duas vezes o volume quando comparado a outros receptores nucleares. Essa cavidade é formada pelas hélices H2', H3, H4, H5, H7, H10/H11, H12 e as fitas- β S3 e S4 (Figura 6B). Os PPARs, como supracitado, possuem uma hélice H2' adicional e, a região entre ela e a H3, corresponde ao Ω -loop, que é uma porção bastante móvel do receptor e que participa de mudanças conformacionais que ocorrem durante a ligação do ligante. O fácil acesso do ligante fornecido pela hélice extra H2' e o posicionamento da H2, diferenciado dos outros receptores, faz com que os PPARs sejam capazes de ligar múltiplos ligantes naturais com relativamente baixa afinidade⁴⁵.

A ocupação dos ligantes dentro do bolsão de ligação pode variar, o que ocasiona diferentes respostas transcricionais. A região que compõe o bolsão de ligação pode ser marcada como um bolsão em formato de “Y”, composto por três sub-braços. O braço I é predominantemente polar, conservado e, inclui os resíduos próximos à H12. O braço II e III, situados entre a H3 e a folha- β e no interior da entrada do sítio ativo, respectivamente, são predominantemente hidrofóbicos e menos conservados⁴⁶ (Figura 7).

Figura 7 - Regiões referentes ao bolsão de ligação do LBD em formato de Y, composto por três sub-braços. O braço I, representado em magenta, é predominantemente composto por resíduos polares que inclui os da H12. O braço II, localizado na região mais interior e superior do bolsão, está representado em verde e apresenta um perfil mais hidrofóbico, assim como o braço III que compreende a região entre a H3 e a folha- β (em laranja).

A entrada do bolsão é guardada por uma hélice (H12), estruturalmente flexível e que forma uma “tampa” sobre a abertura do bolsão de ligação dos ligantes. É nessa hélice que estão presentes os resíduos considerados cruciais para a função do AF-2 (dessa forma, essa hélice é muitas vezes designada como AF-2). Na forma *apo*, a H12 está projetada para fora do corpo da proteína e as H11 e H10 são descontínuas. A ligação do ligante gera um reposicionamento da H12 e torna a H10 e H11 contínuas (Figura 8). Essa reorientação da H12 é consequência de efeitos alostéricos induzidos por estruturas químicas particulares de ligantes específicos que se ligam à proteína⁶. Isso resulta em alterações na interação entre os receptores e as proteínas correguladoras, responsáveis por mediar a resposta transcricional e induzir os efeitos específicos de cada ligante no padrão de expressão gênica⁴⁷. Esse mecanismo de abertura e fechamento da hélice 12 para entrada e acomodação do ligante é conhecido como o “mecanismo ratoeira”⁴⁸.

Figura 8 - Remodelamento estrutural do LBD. Após a interação com o ligante, a estrutura dos receptores nucleares adota uma conformação proteica transcricionalmente ativa. O ligante induz modificações estruturais, originando o sulco de interação de proteínas coativadoras. Na forma inativa, a H12 está projetada para fora do corpo da proteína e as H11 e H10 são descontínuas. Após a ligação do ligante, a H12 é reposicionada e as H10 e H11 tornam-se contínuas e somente após as mudanças conformacionais que o coativador (rosa) se liga a proteína. Os modelos utilizados são referentes ao RXR α na ausência de ligante – conformação inativa (PDB 1LBD) e do complexo RXR α +agonista BMS649 – conformação ativa (PDB 1MVC).

O fato da H12 interagir com os ligantes e com os correpressores evidencia sua importância no controle das propriedades agonistas e antagonistas dos RNs^{12;49}. As regiões de ligação de coativadores e correpressores, em parte, se sobrepõem e somente após o fechamento da H12 ocorrerá a destruição da região de ancoragem de correpressores e a formação de um sulco hidrofóbico para a interação com coativadores. A estabilização do complexo RN-coativadores ocorre por meio de interações hidrofóbicas e também através da formação de ligações de hidrogênio entre dois resíduos de ancoragem bastante conservados dentre os membros dos receptores nucleares. Estes resíduos, chamados de “*charge clamp*”, correspondem a um ácido glutâmico (Glu462) localizado na H12 e uma lisina (Lys292) na H3, que formam ligações de hidrogênio com a leucina 1 e 5 do correpressor, respectivamente. Esses contatos são responsáveis por orientar e posicionar corretamente os receptores nos motivos dos coativadores, permitindo assim o alojamento dos resíduos de leucina na cavidade hidrofóbica¹³ (Figura 9).

Figura 9 - Região de interação de coativadores. **A.** Esquema representativo das regiões de interação dos receptores nucleares com os motivos LxxLL dos coativadores, que engloba a H3 e H12, e os resíduos polares lisina (K) e ácido glutâmico (E), respectivamente presentes nessas hélices e formando o que chamamos de “*charge clamp*”. **B.** Representação em superfície do sulco hidrofóbico formado nessa regiões com os resíduos da *charge clamp* delimitando as duas extremidades desse sulco e provendo o direcionamento e a ancoragem desse motivo⁵⁰.

Apesar dos LBDs dos três isotipos de PPAR apresentarem de 60 a 70% de similaridade sequencial⁵¹ e RMSD entre os átomos C α menor que 1 Å⁴¹, eles possuem uma divergência de aminoácidos suficiente para permitir a especificidade na ligação do ligante. A comparação das estruturas tridimensionais dos LBDs entre os três PPARs demonstra que, embora o tamanho total dos bolsões seja similar, existem diferenças importantes na topologia detalhada. O PPAR α e o PPAR γ são mais semelhantes, tanto em relação ao tamanho, quanto à forma, porém o PPAR α possui o bolsão mais lipofílico em relação aos demais subtipos, o que pode explicar o fato de possuir maior afinidade por vários ácidos graxos saturados e de não se ligar a certos ácidos graxos hidroxilados, os quais são bons ligantes de PPAR γ . Já o PPAR β/δ possui o menor bolsão de ligação entre os PPARs, sendo essa característica a principal determinante na dificuldade de identificação de agonistas fortes e seletivos para esse receptor⁵¹. Todavia, a maior variação entre os três LBDs dos subtipos de PPAR é encontrada no Ω -loop, que apresenta grandes diferenças na posição observada entre as estruturas cristalográficas reportadas⁴¹.

1.7 Moléculas Sinalizadoras da Função dos PPARs – Ligantes

As variadas funções que os PPARs exercem como, por exemplo, a atividade antiaterogênica (evita a formação de ateromas), anti-inflamatória e antidiabética, entre outras, é reflexo da inúmera diversidade de ligantes que podem ser acomodados dentro de seus bolsões de ligação.

Os ligantes dos RNs, em geral, possuem características que irão definir sua ativação nos diferentes tecidos, o que os distinguem em:

- Agonistas totais – Induzem somente o recrutamento de coativadores e a resposta é máxima em todos os tecidos;
- Agonistas parciais (moduladores seletivos) – Coativadores e correpressores competem pela ligação no receptor. Além disso, apresentam respostas diferenciadas dependendo do tecido, ou seja, a distribuição tecidual diferenciada desses cofatores irá determinar se a pequena molécula irá atuar como um agonista ou antagonista;
- Antagonista – Somente correpressores irão interagir com os receptores ligados a essas moléculas e não será observada ativação em qualquer tecido⁴⁴.

A investigação das propriedades de ligação dos conhecidos moduladores de PPAR é então essencial para acessar as bases moleculares envolvidas no agonismo/antagonismo desses receptores. Com esse propósito, um conhecimento detalhado de como um ligante interage com a proteína, levando à conformação ativa, pode ser usado como molde das propriedades de ligação de ligantes potencialmente ativos, através de abordagens de estudos racionais dos alvos, em um esforço para o desenvolvimento de compostos mais eficientes e seguros.

Os ligantes de PPAR podem ainda ser classificados como naturais e sintéticos.

1.7.1 Ligantes Naturais

Um grande número de moléculas tem sido proposto como ligantes endógenos, que são, na maioria, ácidos graxos saturados, insaturados ou poliinsaturados, que podem, ainda, servir de substratos enzimáticos para a geração de seus derivados que possuem, também, atividade agonista sobre esses receptores, tais como eicosanoides e prostaglandinas (Figura 10). A produção de ligantes naturais pode ser influenciada tanto por condições fisiológicas

(alimentação, privação de alimentação e exercício), quanto por condições patofisiológicas (inflamação crônica, diabetes, aterosclerose, câncer)⁵²⁻⁵³.

Figura 10 - Estruturas químicas bidimensionais de alguns representantes de ligantes endógenos de PPAR α . Elas incluem ácidos graxos saturados com cadeias alquílicas de diferentes tamanhos, insaturados ou poliinsaturados, além de seus derivados, os eicosanoides (ex: leucotrieno B4 e 8(5)-HETE).

Estes ligantes naturais geralmente possuem baixa afinidade (constantes de ligação na ordem de μM) e, portanto, requeridos em altas concentrações molares para alcançar a ativação dos PPARs⁵³. Entretanto, essas concentrações são compatíveis com o nível encontrado na corrente sanguínea³⁷. A quantidade de ligantes endógenos presentes em cada tecido específico poderá desempenhar um importante papel na definição do estado de ativação de um isotipo de PPAR na célula. A predominância de um determinado ligante endógeno em um tipo celular, contudo, pode controlar a especificidade de um isotipo de PPAR na atividade transcricional, sob condições fisiológicas²⁷. Todavia, essas informações ainda não são suficientes para esclarecer como os PPARs, em especial o PPAR α exerce suas funções que incluem a manutenção da homeostase em resposta à dieta, que, por ser uma importante função atribuída aos PPARs, possui forte implicação clínica⁵⁴.

O transporte de ácidos graxos intracelulares até os receptores, ou seja, da membrana plasmática até o interior do núcleo da célula, ocorre através de diferentes proteínas capazes de ligar lipídeos (FABP, de *Fatty Acids Binding Protein*), que incluem as de queratinócitos (FABP-5), cardíaca (FABP-3), hepática (FABP-1), muscular (FABP-3), cerebral (FABP-7) e a proteína de ligação a ácidos graxos dos adipócitos (FAPB-4 ou A-FABP)⁵⁵.

1.7.2 Ligantes Sintéticos

Compondo a classe de ligantes sintéticos encontram-se os proliferadores de peroxissomos, agentes hipolipidêmicos, anti-inflamatórios e compostos sensibilizadores de insulina^{7;56-57}. Os compostos hipolipidêmicos, da classe dos fibratos (ácidos carboxílicos anfipáticos), como o WY14643 e o clorofibrato, foram os primeiros ativadores de PPAR α descritos e utilizados na prática clínica há algumas décadas, antes mesmo de o receptor ter sido identificado como seu alvo molecular⁵⁸. Outros agonistas que compõem essa classe, como o gemfibrozil, fenofibrato e bezafibrato, são utilizados como fármacos no tratamento de dislipidemia e doenças cardiovasculares devido à capacidade dessas moléculas de induzir a diminuição de níveis de lipídeos e colesterol no organismo via ativação do PPAR α ⁵⁹⁻⁶⁰ (Figura 11). Existem, no entanto, fatores que limitam a utilização desses fármacos: fibratos são ativadores com baixa potência e a seletividade não é tão alta, o que resulta no uso de altas doses para exercer seus efeitos terapêuticos, aumentando, assim, o risco de miopatia e hepatotoxicidade⁶¹. Esse potencial patogênico, atribuído aos fibratos, explica o imenso interesse no desenho de novos compostos dessa classe com maior potência e seletividade ao alvo PPAR α .

O PPAR γ é o alvo da classe dos fármacos sintéticos designados como tiazolidinadionas (TZDs) e usados no tratamento de pacientes com diabetes do tipo 2 e outras doenças que caracterizam a resistência à insulina³³. Entretanto, existem muitos efeitos colaterais relacionados ao uso de TZDs, que incluem o ganho de peso, edema e insuficiência cardíaca⁶².

Além de ligantes subtipos específicos, a classe de duplo-agonistas (que ativa dois subtipos de PPAR) ou pan-agonistas (ativa os três subtipos de PPAR) estão sob intensa investigação para serem usados no tratamento de um grande conjunto de sintomas de síndromes metabólicas. Dentre eles, podemos destacar os compostos aleglitazar, muraglitazar e tesaglitazar⁶³.

Figura 11 - Estruturas bidimensionais de moléculas sintéticas ativadoras do PPAR α . Estão representados alguns membros da classe dos fibratos (clorofibrato, fenofibrato e bezafibrato) que compreendem os fármacos usados no tratamento da hipertrigliceridemia e na prevenção de aterosclerose; um análogo de fibrato, amplamente utilizado em experimentos em geral, o WY14643; e o GW7647 que é um agonista com alta afinidade do mesmo.

Os duplo-agonistas PPAR α/γ simultaneamente reduzem o nível de triglicerídeos aterogênicos, aumentam os níveis de HDL cardioprotetor e melhoram a resistência à insulina⁶⁴. Dessa maneira, o estímulo do catabolismo de lipídeos proveniente da ativação do PPAR α pode compensar a indução da adipogênese devido à ativação do PPAR γ e, então, diminuir os efeitos indesejados da estimulação seletiva desse último receptor. Porém, muitos estudos desses compostos estão sendo descontinuados por apresentarem alta toxicidade³³. Por essa razão, pesquisas devem ser direcionadas na busca de um balanço na afinidade de ligação para gerar efeitos biológicos otimizados.

As estruturas químicas dos agonistas sintéticos de PPAR apresentam um farmacóforo geral, que inclui uma cabeça formada por um grupamento de ácido carboxílico, um anel aromático e uma cauda cíclica lipofílica, acoplados por uma conexão. A natureza dos fragmentos adicionais afeta a potência e a seletividade da molécula. Foi verificado também

que o tamanho da conexão entre o centro aromático e a cauda lipofílica pode influenciar na ativação do receptor⁶⁵ (Figura 12).

Figura 12 - Características gerais de agonistas sintéticos de PPARs que auxiliam no desenvolvimento de novos compostos⁶⁵.

Na busca de novos ligantes que compartilham essas características estruturais, os “nutracêuticos” e produtos naturais derivados de plantas, como estilbenos⁶⁶ e chalconas⁶⁷, têm atraído a atenção na busca de novos ligantes por causa de seus efeitos benéficos, que incluem propriedades antioxidante, antilipêmica e antiplaquetária. Já é previsto que estruturas que contêm os grupos citados podem apresentar atividade agonista de PPAR com melhores efeitos farmacológicos⁶⁵.

1.8 Potencial Farmacológico

Atualmente, há um surto mundial de doenças metabólicas, caracterizadas, principalmente, por obesidade, diabetes do tipo II, hipertensão e doenças cardiovasculares. Os fatores responsáveis por esta epidemia parecem ser uma combinação de predisposição genética, dietas calóricas e estilos de vida cada vez mais sedentários. Embora um certo número de fármacos já esteja disponível para o tratamento de um grande número de doenças metabólicas, a epidemia crescente indica que ainda precisamos de uma melhor compreensão das redes genéticas e das vias de transdução de sinal que caracterizam estas condições. Portanto, uma melhor definição dos fatores responsáveis pelo controle metabólico pode pavimentar o caminho para novos alvos terapêuticos, com novos mecanismos de ação para o tratamento de doenças humanas⁶⁸

Os RNs possuem um rico e longo histórico no tocante à descoberta de fármacos^{10;69} e isso se deve às características inerentes dessa classe de receptores: 1) são naturalmente seletivos na ligação de pequenas moléculas e 2) podem regular um grande conjunto de

funções biológicas importantes. Sendo assim, além de dados de seletividade dos diferentes receptores⁷⁰, é possível verificar como diferentes compostos, em um mesmo receptor, pode assumir diferentes papéis como agonistas completos, agonistas parciais ou antagonistas e, dessa maneira, gerar respostas diversas e ativar somente um subconjunto de funções⁷¹⁻⁷³, ou, ainda, ligantes que podem atuar seletivamente em diferentes tipos celulares⁷⁴. Por esse motivo, são alvos de intensas pesquisas, principalmente direcionadas ao melhoramentos dos ligantes já existentes ou na busca de novas moléculas que possam se tornar ligantes promissores.

Uma área importante no campo de pesquisas metabólicas se refere às funções dos PPARs como alvos terapêuticos para desordens no metabolismo de lipídios e glicose, em virtude da ligação desses fatores estarem associados às doenças supracitadas como a epidemia mundial atual. Conjuntamente à isso, existem evidências que sugerem que a ativação do PPAR também pode conter a evolução de processos inflamatórios e a aterosclerose, o que fortalece ainda mais a relevância clínica desses receptores e têm instigado o interesse e a busca por novos ligantes. Adicionalmente, os efeitos indesejados observados em avaliações clínicas de alguns agonistas de PPAR já identificados e comercializados, como os fibratos e TZDs, têm contribuído com o aumento em pesquisas com foco em substâncias com propriedades mais seletivas e menos tóxicas⁷⁵.

CAPÍTULO 2

Objetivos e Justificativa

2 Objetivos

Inúmeras disfunções do organismo humano podem ser atribuídas ao mau funcionamento dos PPARs e o conhecimento de sua biologia e de seus mecanismos de ação podem levar a novas alternativas para o tratamento de doenças. Esse entendimento é crucial para se averiguar como ocorre a transmissão dos sinais hormonais para a maquinaria transcricional e para descobrirmos as regras moleculares que definem o controle espacial e temporal da expressão gênica. Dentro desse contexto, esse trabalho busca a caracterização das relações existentes entre a estrutura e a função dos PPARs e definir os mecanismos regulatórios que controlam suas atividades. Esses objetivos incluem:

- O desenvolvimento de protocolos para a produção das proteínas de interesse para possibilitar os ensaios estruturais e biofísicos pretendidos: Clonagem do gene do receptor nuclear humano PPAR α LBD em vetor de superexpressão (pET28a) em bactérias geneticamente modificadas (*E. coli* BL21), seguida da expressão e purificação, em larga escala, dos alvos de interesse (hPPAR α LBD, hRXR α LBD, hRXR α DBD-LBD, hPPAR γ LBD, hPPAR γ DBD-LBD);
- A caracterização da proteína em solução, principalmente no que tange ao seu estado oligomérico, uma vez que, além de possibilitar a avaliação do comportamento do receptor em solução, o processo de dimerização afeta diretamente as interfaces disponíveis para interação com os correguladores e elementos responsivos e, portanto, o processo de regulação transcricional realizada pelos receptores nucleares. Para isso, diferentes técnicas são abordadas: SAXS, gel nativo, cromatografia analítica por exclusão de tamanho e espalhamento de luz dinâmico;
- Estudos estruturais na busca de modelos cristalográficos da proteína complexada à diferentes ligantes, incluindo moléculas naturais e sintéticas. Esse trabalho poderá render explicações para a seletividade dos subtipos, além de acrescentar mais conhecimento sobre as características de ligação de agonistas e as mudanças conformacionais ocasionadas pela formação dos complexos;
- A análise dos modelos de alta resolução, capazes de gerar hipóteses à respeito da atividade funcional dos PPARs. Essas informações poderão ser acessadas através do emprego de mutações sítio-dirigidas de resíduos importantes para o reconhecimento do ligante pela proteína e de possíveis regiões modificadoras do formato estérico da mesma;

- Ensaios de transativação com células de mamíferos, empregados com o intuito de analisar as diferenças na atividade das proteínas em função da presença de moléculas ativadoras e ocasionadas por mutações em resíduos proteicos específicos;
- O estágio realizado no laboratório situado no *Diabetes and Endocrinology Research Center, The Methodist Hospital Research Institute – Houston, TX – USA*, sob a orientação do Dr. John D. Baxter e Dr. Paul Webb, teve como objetivo o aprendizado de diversas técnicas mais voltadas para a parte funcional e manipulação de células. Essa abordagem busca o melhor entendimento de como ocorre a modulação da função através da interação com certas moléculas conhecidas como ativadoras da proteína, além de auxiliar na busca de outras que poderiam ser consideradas ligantes.

CAPÍTULO 3

Materiais e Métodos

3 Materiais e Métodos

3.1 Procedência dos clones

O clone do hPPAR α (aa 101-468) foi gentilmente cedido pelo grupo do Dr. Martin Safo (*Virginia Commonwealth University, Richmond - Virginia*). Este clone é formado pelo DBD e LBD, inserido no vetor pTrcHisA (*addgene plasmid 13574*, <www.addgene.org>). A partir desse plasmídeo foram realizados os ensaios de subclonagem de uma construção contendo somente o LBD do receptor.

Os clones dos hPPAR γ DBD-LBD (aa 111-478) e hPPAR γ LBD (aa 204-477) foram cedidos pelo Dr. Andre Luis Berteli Ambrosio, ex-aluno do nosso grupo de pesquisa. Esses clones estavam inseridos no vetor pET28a(+), específico para expressão em bactéria.

Os genes do hRXR α DBD-LBD (aa 126-462) e hRXR α LBD (aa 225-462) foram cedidos pela Dra. Maria Auxiliadora Morin dos Santos, técnica especialista em laboratório do nosso grupo de pesquisa. Eles estavam inseridos no vetor pET28a(+) e pETDuet, respectivamente. Este último vetor também se destina à expressão em bactérias contendo cauda de histidina e sítio de clivagem para trombina.

3.2 Subclonagem do gene de hPPAR α LBD em pET28a(+)

Como o principal objetivo do projeto foi o estudo estrutural para análise de ligação de ligantes, se torna mais coerente o trabalho com apenas a porção LBD da proteína, onde a chance de cristalização é maior e a manipulação mais simples, devido a menor complexidade da amostra. Por este motivo, a construção composta pelo domínio LBD foi subclonada no vetor pET28a, utilizado para expressão da proteína em bactérias e que garante à mesma uma cauda com seis histidinas e sítio de clivagem para a trombina.

Os oligonucleotídeos referentes a região considerada inicial e final do LBD (aa 195-478) foram empregados para limitar a sequência do inserto. Os iniciadores desenhados continham 30 nucleotídeos para a sequência 5' $\rightarrow$ 3' e 30 para a sequência 3' $\rightarrow$ 5' e, incluíam, também, sequências referentes aos sítios de restrição para as enzimas *NdeI* (5') e *BamHI* (3'). Os oligonucleotídeos desenhados foram:

5' – GGG AATCCATatgatagaagattctgaaactgcagatctcaaa – 3'

5' – gacgtcctctagatgtccctgtacatgactCCTAGGCGC – 3'

Onde as letras minúsculas representam a sequência inicial ou final de cada domínio do gene, em vermelho os códons de iniciação (atg) e de terminação (act, complementar de tga), em azul as regiões de clivagem das enzimas de restrição e grifados os sítios de reconhecimento das enzimas.

Esses oligonucleotídeos foram utilizados como iniciadores na reação de amplificação da sequência, que foram realizadas segundo especificações do fabricante. Cada reação foi complementada com uma duplicata e um controle negativo (reação na ausência do DNA molde). A polimerase utilizada para amplificação foi a *Taq DNA Polimerase Platinum High Fidelity* (Promega), com seu respectivo tampão. O DNA molde, hPPAR α DBD-LBD pTrcHisA foi obtido utilizando um conjunto de minipreparação de plasmídeos (*Kit Wizard[®] Plus SV Minipreps* - Promega).

Essas reações foram submetidas a um programa de PCR, utilizando um aparelho termociclador Perkin-Elmer modelo 480 e o ciclo de amplificação foi padronizado da seguinte maneira:

- Desnaturação inicial do DNA a 95 °C por 3 minutos
- 30 ciclos de:
 - Desnaturação a 95 °C por 45 segundos.
 - Anelamento por 45 segundos a 62 °C.
 - Ativação da enzima por 60 segundos a 72 °C
- Após os 30 ciclos foi efetuada uma extensão final a 68 °C por 4 minutos

Os produtos da reação de amplificação para cada construção foram analisados por eletroforese em gel de agarose (BioRad) 1% em tampão TAE 1X (Tris-acetato 40 mM e EDTA 1 mM, pH 8,0), corado com brometo de etídio. As bandas de interesse foram recortadas e purificadas do gel, empregando-se o método por passagem em colunas de purificação (kit *Wizard[®] SV Gel and PCR clean-Up System* – Promega).

Após a purificação e dosagem dos insertos de interesse, os mesmos foram submetidos a uma reação de digestão das extremidades com as enzimas *NdeI* e *BamHI*. O vetor pET28a(+) também foi digerido com as mesmas enzimas utilizadas para a liberação do inserto. Os produtos dessas digestões foram analisados por gel de agarose 1% e purificados com o objetivo de separar as enzimas e outros produtos indesejáveis presentes na reação.

O plasmídeo pET28a linearizado e o inserto purificados foram então submetidos a uma reação de ligação com T4 DNA ligase. Todas as reações foram acompanhadas de um controle negativo para se acompanhar a taxa de religação do vetor.

Após, aproximadamente, 12 horas de reação a 16 °C, os plasmídeos recém construídos com o gene de interesse foram transformados em células células de *E. coli* linhagem BL21 (DE3) e DH5 α competentes.

Todos os produtos obtidos durante os passos de subclonagem foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% e o produto final examinado por PCR de colônias e sequenciamento do gene.

3.3 Obtenção das proteínas recombinantes

3.3.1 Teste de expressão do hPPAR α LBD

Os procedimentos empregados para os testes iniciais de expressão do hPPAR α LBD foram adaptados dos protocolos já utilizados para construções similares de outros receptores nucleares, porém com algumas modificações.

Os ensaios foram realizados com o emprego de pequenas quantidades de meio de cultura LB (5 mL), inoculadas com o estoque de bactérias recombinantes. Esses inóculos foram submetidos a variações de temperatura durante a indução (18, 20, 25 e 37 °C), no período de 1 a 12 horas e nas concentrações de IPTG (isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo) de 0,5 e 1,0 mM.

Durante os testes, 1 mL da cultura foi coletado a cada hora e centrifugado. Os produtos resultantes dessa sedimentação foram ressuspensos em tampão de amostra para gel com dodecil sulfato de sódio (SDS) e analisados por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 15%.

3.3.2 Expressão em larga escala

A expressão em larga escala foi realizada utilizando-se de 4 a 6 litros de meio de cultura LB que foram inoculados com 10 mL/litro de pré-cultura crescida por 16 horas. O crescimento ocorreu a 37 °C até DO_{600 nm} (densidade óptica) = 1,0. Depois de atingida esta DO, a indução foi conduzida com 1 mM de IPTG, e as culturas mantidas sob as condições mais favoráveis de acordo com as proteínas expressas:

- hPPAR α LBD, hPPAR γ DBD-LBD e LBD → temperatura de indução de 18 °C e tempo de indução de 4 horas;

- hRXXRα DBD-LBD e LBD → temperatura de indução de 25 °C e tempo de indução de 3 horas;

Após o processo de expressão das proteínas, as bactérias foram sedimentadas por centrifugação a 6.000 rpm (Sorvall-GS3) por 10 minutos a 4 °C. O sedimento foi ressuspenso em tampão de lise (50 mM tampão fosfato de sódio pH 8,0, 100 mM NaCl, 10% glicerol, 10 mM β-mercaptoetanol), na quantidade 20 mL/6 g células. Ao homogeneizado, foram adicionados lisozima (0,1 mg de lisozima para cada 1 mL de tampão) e fenilmetilsulfonilflúor (PMSF) (1 mM final). O extrato obtido foi posteriormente sonificado até tornar-se liquefeito e depois centrifugado a 34.302 g (Sorvall-SS34) por 40 minutos à 4 °C.

3.3.3 Purificação

3.3.3.1 Purificação por afinidade

O protocolo de purificação, utilizado para todas as proteínas expressas, emprega uma coluna de afinidade como primeiro passo, já que as mesmas foram expressas com uma cauda N-terminal contendo seis histidinas, que confere às proteínas alta afinidade para ligação em resinas de cromatografia contendo íons de metal (Co^{2+} , Ni^{2+}) imobilizados, sendo esta técnica conhecida como IMAC (*Imobilized Metal ion Affinity Chromatography*).

Os sobrenadantes, resultantes do processo de lise celular e que contêm as proteínas de interesse, foram incubados com uma matriz de afinidade de íons Co^{2+} , por aproximadamente uma hora, a 4 °C e com agitação. Em seguida, cada conjunto foi colocado em uma coluna e o produto não ligado à matriz eluído através de lavagens da resina (aproximadamente 10 volumes de coluna) com o tampão A, com concentrações crescentes de imidazol (50 mM tampão fosfato de sódio pH 8,0, 300 mM NaCl, 10% glicerol, 5, 10 e 15 mM Imidazol e 6 mM β-mercaptoetanol). A eluição das proteínas ocorreu com um tampão contendo maior concentração de imidazol (tampão B: 50 mM tampão fosfato de sódio pH 8,0, 300 mM NaCl, 10% glicerol, 300 mM Imidazol e 6 mM β-mercaptoetanol). Amostras desse processo foram guardadas para análise por SDS-PAGE 15%.

3.3.3.2 Purificação por cromatografia por exclusão de tamanho

Para a obtenção de um maior grau de pureza, as amostras obtidas após a purificação por afinidade foram submetidas a um segundo passo de purificação, por cromatografia por exclusão de tamanho. Esse método de purificação visa a separação de proteínas através de seu tamanho. Para isso, uma coluna Superdex 75 (16/60 ou 26/60) (Pharmacia Biotech) foi empregada para todas as proteínas trabalhadas, exceto para as amostras de hRXR α DBD-LBD, na qual utilizamos uma coluna Superdex 200 26/60 (devido à formação de tetrâmeros da proteína). Inicialmente, as colunas foram pré-equilibradas com o tampão C (20 mM Hepes-Na pH 8,0, 1 mM DTT, 150 mM NaCl e 5% glicerol) e a eluição das proteínas ocorreu nesse mesmo tampão, com fluxo de 1 mL/min e corrida com no máximo de 1 volume e meio de coluna. As amostras obtidas foram analisadas em SDS-PAGE 15%. Todos os passos foram realizados a 4 °C ou em gelo.

3.4 Clivagem da cauda de histidina

A clivagem da cauda de histidinas foi aplicada somente à proteína que foi submetida a testes de cristalização, no caso desse projeto, somente as amostras de hPPAR α LBD. Para isso, vários ensaios foram realizados para conseguir a clivagem eficiente da cauda de histidina com a protease Trombina (Amersham Bioscience). Após a expressão e a purificação da proteína, foram realizados testes empregando variações da quantidade de enzima (1, 5, e 10 unidades de Trombina/mg de proteína), da temperatura (4, 10 e 18 °C) e do tempo de incubação (1 a 12 horas). Após o tempo destinado à clivagem, foi adicionado 0,1 μ M de PMSF nas amostras, para a inibição da protease. O monitoramento da clivagem também foi realizado por eletroforese.

3.5 Estudos oligoméricos em solução

Os estudos de oligomerização foram realizados com os receptores hPPAR α (construção LBD) e hPPAR γ (construção LBD e DBD-LBD), para a comparação de possíveis diferenças entre os subtipos, além de garantir análises da influência do DBD no estado de oligomérico do receptor. Adicionalmente, também foram empregadas análises de heterodimerização com o parceiro obrigatório de ambas as proteínas, o hRXR α . Nesse

trabalho foram empregadas diferentes técnicas como cromatografia analítica por exclusão de tamanho, gel nativo, espalhamento de luz dinâmico (DLS) e espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS), pois o processo de formação de oligômeros possuiu um importante significado do ponto de vista funcional da proteína. Todo o estudo oligomérico do subtipo γ do receptor PPAR foi realizado em colaboração com o Prof. Dr. Mario de Oliveira Neto, Dra. Ana Carolina Migliorini Figueira e Dra. Fernanda Batista, que, durante o trabalho, faziam parte do mesmo grupo de pesquisa.

3.5.1 Cromatografia analítica por exclusão de tamanho e obtenção do heterodímero

Amostras de hPPAR α LBD em diferentes concentrações (2, 5, 7 e 10 mg/mL) foram aplicadas a uma coluna Superdex 75 10/30 (*Pharmacia Biotech*) que é capaz de separar diferentes formas oligoméricas. Dessa maneira, possibilita a aferição aproximada da massa e do raio hidrodinâmico (R_H) da proteína presente em cada pico do cromatograma através de sua calibração. O R_H , também conhecido como o Raio de Stokes, é um indicativo do tamanho aparente da molécula, considerando a solvatação. Esse procedimento foi realizado utilizando um *Kit Pharmacia* de calibração de massa molecular (contendo proteínas de massas moleculares e R_H conhecidos como a conalbumina com 75 kDa; ovalbumina com 43 kDa; anidrase carbônica com 29 kDa; ribonuclease com 13,7 kDa e aprotina com 6,5 kDa). O volume de eluição dessas proteínas foi usado para calcular os valores do coeficiente de distribuição de fases K_{av} ($K_{av} = [\text{volume de eluição} - \text{volume de exclusão da coluna}] / [\text{volume total da coluna} - \text{volume de exclusão da coluna}]$) que foram graficados em função de seus R_H e massa e os pontos tratados como uma regressão linear. Sendo assim, o valor de eluição de cada amostra da proteína de interesse foi analisado usando seu valor de K_{av} , e que, através da regressão linear descrita, foi possível encontrar os valores de R_H das amostras.

Amostras de hPPAR γ LBD, hPPAR γ DBD-LBD puras também foram analisadas segundo a eluição da cromatografia analítica por exclusão de tamanho. O protocolo utilizado foi o mesmo descrito no parágrafo anterior, porém as proteínas foram avaliadas na concentração fixa de 5 mg/mL e a construção proteica DBD-LBD foi aplicada a uma coluna Superdex 200 10/30, devido à formação de tetrâmeros do RXR.

Para a formação do heterodímero, as proteínas hPPAR α LBD, hPPAR γ LBD e hPPAR γ DBD-LBD foram incubadas durante uma hora com o hRXR α (de acordo com cada construção, LBD com LBD e sucessivamente) a uma relação estequiométrica (1:1). Essas

amostras foram então aplicadas à coluna de cromatografia analítica por exclusão de tamanho e examinadas segundo a calibração descrita acima. O tampão utilizado para este experimento foi o mesmo empregado na etapa de purificação por exclusão de tamanho, composto por: 20 mM Hepes-Na pH 8,0, 1 mM DTT, 150 mM NaCl e 5% glicerol.

3.5.2 Eletroforese por gel não desnaturante (gel nativo)

O gel não desnaturante, também chamado de gel nativo é utilizado para averiguar amostras proteicas na forma nativa e, portanto, na ausência do reagente SDS. A separação das proteínas nessa técnica, diferentemente da SDS-PAGE que depende somente da massa molecular das proteínas, possui dependência também da carga elétrica e do tamanho hidrodinâmico das proteínas. A carga elétrica que dirige essa separação é regulada tanto pelo pH da solução quanto pela carga intrínseca de cada proteína, que dependerá de sua composição de aminoácidos e modificações pós-traducionais. Uma vez que as proteínas estão em suas configurações enoveladas, o tamanho hidrodinâmico e mobilidade no gel irão variar de acordo com a natureza de suas conformações (maior mobilidade para conformações mais compactas e menor para estruturas maiores, como oligômeros). Assim, géis nativos podem ser sensíveis a qualquer processo que altere a carga ou a conformação de uma dada proteína, tornando essa técnica excelente na observação de auto-associação ou agregação proteica.

Em nossas análises, o gel nativo foi empregado para a verificação de possíveis monômeros, homodímeros e homotetrâmeros do PPAR que poderiam ser formados, além dos estudos sobre a formação dos heterodímeros com o RXR. Adicionalmente, esta técnica também auxiliou na averiguação da estabilidade da proteína, através da checagem de agregação da mesma.

Para essa técnica foram utilizados géis nativos do sistema *Phast System* (Amersham-GE), com a concentração de poliacrilamida variando em um gradiente de 8 a 25%. Juntamente às amostras, um padrão de proteínas de conhecidos pesos moleculares foi submetido à eletroforese (kit de calibração de eletroforese GE-Amersham – alto peso molecular). Ao final da corrida, os géis foram corados com *Coomassie blue* a averiguação e análise da migração das bandas visualizadas após a descoloração do gel.

3.5.3 Espalhamento de luz dinâmico (DLS)

A técnica do DLS foi empregada para complementar o estudo do grau de oligomerização em solução dos receptores nucleares purificados, uma vez que essa técnica mede a distribuição de tamanhos das moléculas de proteínas em solução.

O conceito do DLS usa a ideia de que pequenas partículas em suspensão se movem aleatoriamente em função de choques com as moléculas dos fluidos, seguindo o princípio do “Movimento Browniano”. Quando uma fonte coerente de luz de frequência conhecida é incidida sobre as partículas em movimento, a luz é espalhada. O DLS mede o espalhamento da luz por uma amostra, em pequenos períodos de tempo e correlaciona os dados. Como partículas maiores se movimentam mais lentamente que partículas menores, na mesma temperatura, podemos definir então uma função de correlação. Dessa função de correlação, o coeficiente de difusão das moléculas em solução pode ser calculado através do ajuste dos dados. Este coeficiente está relacionado com o R_H da molécula pela equação de Stokes-Einstein. Se ocorrer a agregação entre as moléculas de uma dada proteína, isso pode ser reconhecido pelo aumento em seu R_H .

O equipamento *DynaPro MS (Protein Solutions)* foi utilizado para realização das medidas, que foram praticadas em 30 séries de 2,5 segundos de aquisição para cada medida e para cada concentração de proteína analisada. As características do solvente, como a presença de 5% de glicerol nas amostras, foram registradas e consideradas para os cálculos. Anteriormente às medições, todas as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm 10 minutos a 4 °C. Os R_H foram obtidos pelas médias das aquisições e graficadas em função da concentração da proteína.

3.5.4 Estudos de espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS)

Os estudos de espalhamento de raios-X a baixos ângulos são amplamente utilizados para análises estruturais à baixa resolução de macromoléculas em solução. Com este tipo de análise é possível obter informações sobre o raio de giro (R_g), volume molecular, envelope e, ainda, o estado de oligomerização de proteínas⁷⁶. Assim, essa técnica foi utilizada para a determinação do estado de oligomerização e definição do envelope molecular de diferentes concentrações da proteína hPPAR α LBD em solução, de duas construções (LBD e DBD-LBD) do receptor hPPAR γ . Adicionalmente, essa técnica foi aplicada para a aferição da

formação de complexos dos receptores supracitados com o parceiro obrigatório de heterodimerização, hRXR α .

Os dados de SAXS do domínio LBD do hPPAR α , LBD e DBD-LBD do hPPAR γ e do complexo formado por esses receptores com o hRXR α , em diferentes concentrações foram coletados na linha de D02A-SAXS2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas, Brasil) utilizando comprimento de onda $\lambda=1,488$ Å, detector bidimensional (MarCCD) e distância amostra-detector de aproximadamente 1000 mm.

As curvas de espalhamento da solução de proteína e do tampão foram coletadas a 20 °C em 2 etapas de 300 segundos para monitoramento dos danos causados pela radiação à amostra, além da estabilidade do feixe. A análise sistemática dos dados foi realizada, primeiramente, subtraindo o ruído do detector coletado no mesmo tempo de exposição da amostra e, em seguida, os dados foram normalizando pela intensidade do feixe incidente e multiplicados pela absorção da amostra. O espalhamento da solução tampão foi subtraído do espalhamento da solução de proteína e a integração dos padrões de espalhamento foram realizadas com o programa Fit2D⁷⁷.

3.5.4.1 Análise dos dados de SAXS

Os Raios de giro (R_g) das proteínas em solução, de cada medida, foram obtidos por dois métodos distintos, utilizando a equação de Guinier⁷⁸ e pelo método de Transformada Inversa de Fourier implementado pelo programa Gnom⁷⁹, onde também obtivemos a função de distribuição de distâncias $p(r)$ e o diâmetro máximo ($D_{\text{máx}}$). O R_g é uma medida global do tamanho e formato do complexo molecular, sendo definido como a raiz quadrada da distância quadrática média entre os elétrons da partícula e o centro de massa eletrônico do objeto espalhador. O resultado obtido para o R_g pode ser relacionado com o R_H , através da equação $R_H = R_g \times 1,3$, que é uma aproximação válida para esferas e, portanto, válida somente para proteínas globulares⁸⁰. Isso torna então possível uma comparação entre as demais técnicas utilizadas. Essas análises foram realizadas utilizando o pacote de programas Atsas⁸¹.

O cálculo da massa molecular foi realizado utilizando um procedimento implementado pela ferramenta SAXS MoW (www.ifsc.usp.br/~saxs/saxsmow.html)⁸². Esse método não requer a medida da intensidade do SAXS na escala absoluta e não envolve nenhum tipo de comparação com outras curvas de SAXS de uma proteína padrão conhecida.

3.5.4.2 SAXS e modelos *ab initio*

Modelos de baixa resolução foram gerados utilizando procedimento *ab initio* no programa Dammin⁸³ e Gasbor⁸³, onde um modelo de átomos *dummy* (DAM) é gerado com uma cadeia aleatória de C α . O DAM corresponde a uma média das orientações da determinada macromolécula e é enovelado de forma a minimizar a discrepância com os dados experimentais de SAXS. Para cada curva foram gerados 10 modelos e a análise automatizada de reconstrução e elaboração de um modelo médio foi utilizado o pacote de programas DAMAVER⁸³.

Para a validação do modelo gerado através dos dados experimentais, foi realizado um ajuste dos DAMs com as estruturas cristalográficas dos monômeros do hPPAR α LBD (PDB 2REW), hPPAR γ LBD (PDB 1FM6), hPPAR γ DBD-LBD (PDB 3DZU). Para os complexos heterodiméricos utilizamos as estruturas de alta resolução do hPPAR α /hRXR α LBD (nesse caso utilizamos o heterodímero hPPAR γ /hRXR α LBD (PDB 1FM6) sendo a posição do hPPAR γ substituída manualmente pelo hPPAR α , visto que ambos apresentam alta identidade), hPPAR γ /hRXR α LBD (PDB 1FM6) e hPPAR γ /hRXR α DBD-LBD (PDB 3DZU). O programa Crysol foi usado para gerar curvas de espalhamento simuladas para os DAMs, assim como as curvas de espalhamentos para as estruturas cristalográficas.

Para facilitar a visualização da concordância do envelope da proteína em solução com a estrutura cristalográfica, além da sobreposição das curvas, foram geradas superposições do modelo cristalográfico com o modelo em baixa resolução, através do programa SUPCOMB⁸³. As figuras de sobreposição foram geradas com o programa PyMOL⁸⁴.

3.5.4.3 Geração de modelos de corpo rígido

Para um melhor ajuste da estrutura do receptor contendo os dois domínios funcionais DBD e LBD, foi utilizado o programa Sasref⁸⁵. Esse programa é utilizado para a visualização e manipulação de estruturas de alta resolução e modelos de baixa resolução. Através dele, foi possível realizar um refinamento de corpo rígido das estruturas cristalográficas, de forma interativa. Para tal, foram empregadas as curvas de espalhamento teóricas das estruturas e as curvas experimentais.

Nessa metodologia, os dois monômeros da estrutura cristalográfica (PDB 1FM6) foram separados e as suas posições e orientações relativas foram minimizados. Com base na

interface clássica de dimerização conhecida entre hPPAR γ LBD e hRXR α LBD, os contatos intermoleculares RXR F415-A433 PPAR e RXR L420-L436 PPAR²¹ foram mantidos durante o processo de minimização. A fim de melhorar a qualidade dos ajustes entre as curvas, foi permitido que os domínios da proteína se separassem e, posteriormente, as suas posições e orientações relativas foram determinadas por modelamento de corpo rígido. Para o modelo de corpo rígido do monômero PPAR LBD-DBD, a região do *hinge* foi mantida e a proteína foi separada em dois corpos rígidos separadas pelos de resíduos de aminoácidos P206-E207.

Para realizar a modelagem do corpo rígido com o heterodímero PPAR/RXR DBD-LBD, nós separamos o complexo em dois corpos rígidos, um contendo os LBDs e outro com os DBDs, uma vez que as informações estruturais de dados de SAXS são limitadas e não nos permitiu usar muitos domínios independentes e mais graus de liberdade. Nesse caso as regiões dos dois *hinges* (para o PPAR, o fragmento entre A172-P206 e para o RXR, o fragmento entre E203-N227) foram excluídas dos modelos estruturais. A interface de dimerização de LBD foi mantida, tal como descrita previamente²¹⁻²². A posição de DBDs, foi determinada segundo a interface de dimerização descrita para os DBDs do receptor de estrógeno (ER) (PDB 1HCQ), que mostrou uma complementaridade de forma, bem como contatos diretos entre os domínios⁸⁶. Após a geração dos modelos de corpo rígido, foram produzidas curvas de espalhamento simulado para os mesmos através do programa Crysol.

3.6 Ensaios de troca de hidrogênio por deutério acoplados à espectrometria de massas

A espectrometria de massa é uma técnica analítica poderosa que é usada para identificar compostos desconhecidos, quantificar materiais conhecidos e elucidar as propriedades químicas e estruturais das moléculas. A essência da técnica envolve a geração de íons que são depois detectados. A sofisticação surge nos métodos que são usados para a geração desses mesmos íons e no modo de analisá-los. Há vários tipos de espectrômetros de massa, mas todos eles requerem a gaseificação e ionização da amostra, aceleração da molécula carregada por um campo elétrico, dispersão dos íons de acordo com a razão massa/carga, a detecção dos íons e o registro do sinal.

A metodologia utilizada para avaliar a mobilidade e dinâmica da proteína, através da utilização da técnica de espectrometria de massas, envolve a troca de alguns hidrogênios da proteína por deutério. Dessa maneira, podemos dividir esse procedimento em duas etapas: primeiramente a macromolécula é submetida à troca isotópica dos hidrogênios das amidas

expostas ao solvente pelo deutério, em excesso na solução. Essa troca de H/D pode ser feita com a proteína submetida a várias condições diferentes, na presença e ausência de ligantes. 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 sequências reconhecidas pela enzima, gerando peptídeos com sequência e tamanho conhecidos, os quais serão analisados no espectrômetro de massa. A diferença na incorporação se dá pela comparação dos espectros da proteína clivada sem ser incubada e incubada com deutério.

Os experimentos de troca de hidrogênio por deutério acoplados à espectrometria de massas foram aplicados com a finalidade de entendermos melhor as propriedades de formação do complexo heterodimérico hPPAR γ /hRXR α DBD-LBD em solução e as mudanças ocasionadas no mesmo na presença do DNA. Esses experimentos também auxiliaram na validação dos modelos de SAXS, além de sugerir um mecanismo de ação dessas proteínas.

Os ensaios foram conduzidos utilizando a proteína hPPAR γ DBD-LBD, na ausência e na presença do parceiro heterodímero, hRXR α DBD-LBD e também na ausência e presença de uma sequência de DNA que corresponde ao elemento responsivo desse complexo (PPRE), caracterizado pela sequência: 5'-AGCTAAAGGTCAGAGGTCAGTAGGA-3'.

Iniciamos a montagem dos experimentos diluindo (cerca de 10x) em água deuterada (D₂O) a proteína sozinha e seu complexo, para obtermos uma concentração de, aproximadamente, 2,5 mg/mL (condição final: 2 mM Hepes pH 8,0, 15 mM NaCl, 0,5% glicerol, 0,1 mM DTT e 60% D₂O). Essas amostras (100 μ L) foram incubadas por 3, 10 e 30 minutos à temperatura ambiente. Após a incubação, as proteínas foram imediatamente submetidas a clivagem com Pepsina (diluída no tampão de 100 mM Fosfato de Sódio pH 2,5), utilizando a relação 1:50 de massa de enzima por massa de proteína, por 10 minutos. Durante a clivagem, as amostras foram mantidas em gelo para evitar troca reversa. Após esse processo, as amostras foram acrescidas de acetonitrila (concentração final de 30%) e os peptídeos, produto da clivagem, imediatamente aplicados no aparelho de espectrometria de massa. O equipamento utilizado para esses experimentos foi um *Eletrospray*, acoplado a um quadrupolo (*Quattro II triple-quadrupole mass spectrometer* - Micromass, UK).

Essas medidas contaram com a colaboração da Dra. Ana Carolina Migliorini Figueira (antes do IFSC-USP), do Prof. Dr. Mario Sergio Palma e seu aluno Dr. Daniel Saidemberg (UNESP, Rio Claro).

O *software* MS-Digest (Peter Baker e Karl Clauser, 1999 – disponível em: <http://prospector.ucsf.edu/prospector/4.0.8/html/msdigest.htm>) foi utilizado para identificar a

sequência de peptídeos, com valores para relação carga/massa de cada peptídeo, gerado pela clivagem de pepsina. O nível de incorporação de deutério para cada peptídeo foi determinado verificando mudanças no centro de massa do espectro obtido antes e depois de deutar, utilizando o programa Masslinx (Micromass, UK).

3.7 Cristalografia de proteínas

3.7.1 Ensaios de cristalização

A cristalização de macromoléculas ocorre quando são atingidas condições apropriadas de supersaturação da solução, para que ocorra a diminuição da solubilidade e aglutinação das macromoléculas. Entretanto, essa aglutinação proteica deve ocorrer de forma organizada e através de uma cinética lenta para que não resulte em precipitação.

O processo de formação dos cristais compreende três passos clássicos: nucleação, crescimento e cessação de crescimento. Esse processo ainda pode ser influenciado por muitos parâmetros como, por exemplo, a temperatura, o pH, sais, precipitantes, aditivos e solventes orgânicos, o que justifica a complexidade envolvida na obtenção desses cristais.

Existem diversos métodos de cristalização de proteínas, porém o mais usualmente empregado é o de difusão a vapor, que pode ser ainda dividido na técnica da gota pendurada (*hanging drop*) ou da gota sentada (*sitting drop*). Ambas as técnicas implicam em colocar uma gota contendo proteína purificada, solução tampão e precipitante e deixar que essa gota alcance o equilíbrio com um reservatório maior, contendo tampões e precipitantes semelhantes, porém em concentrações mais elevadas. A partir da evaporação da água, a concentração do agente precipitante aumentará na gota e levará à condição de supersaturação que é mais propícia à formação de cristais.

Os ensaios de cristalização foram conduzidos com o hPPAR α LBD, em sua forma apo e ligado a diferentes ligantes. Como a obtenção de cristais requer altas concentrações de amostra altamente pura, foram utilizadas alíquotas de proteína na concentração de 10 mg/mL (320 μ M). Os ligantes utilizados foram diluídos previamente em DMSO (100%), na concentração de 100 mM e incubados com a proteína em um excesso de aproximadamente três vezes (concentração final de ligante na amostra 1 mM).

O robô de cristalização Honeybee (*Genomic Solutions*) foi empregado na triagem inicial de condições favoráveis para cristalização da proteína, com conjuntos comerciais de

soluções. O método de cristalização empregado foi o de difusão a vapor com gota sentada (*sitting drop*), com o volume da gota de 1 μL da solução proteica e 1 μL de solução de poço. Todos os testes foram inicialmente realizados a 18 °C.

As condições mais promissoras que apresentaram cristais, agulhas ou precipitados cristalinos foram otimizadas através do uso de detergentes e aditivos, além de variações na temperatura de incubação das placas (4 e 10 °C), estas últimas montadas manualmente.

3.7.2 Coleta e processamento de dados de difração de raios-X

Os cristais de hPPAR α LBD, obtidos em complexo com ligantes, foram crioprotetidos com 15% de etileno glicol e coletados a temperaturas criogênicas (100 K) em fluxo de vapor de nitrogênio. As coletas de dados de difração de raios-X foram realizadas na linha de cristalografia de proteínas MX-2, no LNLS, com detector Marmosaic-225 CCD (*MarUSA*), a um comprimento de onda de 1,4586 Å. Os conjuntos de dados foram obtidos através do método de rotação ($\Delta\varphi$), com o objetivo de coletar o máximo de reflexões, alcançar alta completude, que é o número de reflexões cristalográficas medidas em um conjunto de dados, expresso como uma porcentagem do número total de reflexões presentes na resolução especificada; e a multiplicidade, caracterizada como o número de medições independentes de cada reflexão medidas em um conjunto de dados, onde os fatores simetria e sobreposição contribuem para a multiplicidade.

De posse das primeiras imagens de difração foi possível determinar os parâmetros de dimensão e orientação da célula unitária (a , b , c , α , β e γ), além de determinar o grupo pontual, que designa a simetria do cristal, e estimar a mosaicidade. Esse passo é necessário para planejar uma estratégia eficiente de coleta de dados, minimizando o tempo de exposição do cristal ao feixe de raios-X e maximizando a qualidade dos resultados. A indexação das primeiras imagens e a estratégia de coleta foram realizadas pelo programa iMOSFLM⁸⁷.

A integração do conjunto de imagens de difração e o refinamento dos parâmetros cristalinos também foram conduzidos com o programa iMOSFLM. Nesse processo, a intensidade de cada reflexão é quantificada e cada imagem em um mesmo conjunto de dados tem a intensidade média gravada em escalas diferentes, que é consequência de vários fatores, incluindo a variação da radiação incidente, absorção de raios difratados ou distribuição do cristal. Logo, há a necessidade de escalonar essas intensidades e agrupar todos os dados. Para isso, foi utilizado o programa SCALA, que faz parte do pacote de programas CCP4⁸⁸.

O número de moléculas presentes na unidade assimétrica e o conteúdo de solvente foram estimados utilizando o programa Matthews_coeff⁸⁸, que faz uso da metodologia proposta por Matthews⁸⁹.

3.7.3 Obtenção das fases e refinamento das estruturas cristalográficas

Após a integração e escalonamento dos conjuntos de dados, o *phenix.xtriage*⁹⁰ foi utilizado na identificação de patologias do cristal, como, por exemplo, *outliers* e presença de *twinning*.

Para resolver o problema das fases foi aplicada a técnica de substituição molecular utilizando o programa PHASER⁹¹, que utiliza informações de similaridade estrutural. O modelo empregado para a substituição molecular foi a estrutura da própria proteína, complexada a outro ligante a uma resolução de 2,35 Å (PBD 2REW). Como essa estrutura apresenta 100% de identidade, logo após a obtenção das fases, o modelo foi submetido ao refinamento. Esse é um processo em que se busca encontrar a melhor concordância entre o modelo proposto e sua estrutura real. Esta concordância deve refletir numa igualdade entre os fatores de estrutura calculados (F_{calc}) e os fatores de estrutura observados (F_{obs}).

O acompanhamento da qualidade do processo de refinamento é feito por meio do cálculo do fator R (R_{factor}). Como o fator R pode ser minimizado artificialmente e levando em consideração a redundância dos dados de raios-X, uma pequena porcentagem das reflexões é excluída do refinamento e utilizada como um conjunto de teste no cálculo de um novo fator R, chamado R_{free} , que é isento de minimização artificial. Para o refinamento dos conjuntos de dados obtidos, o programa Phenix⁹⁰ apresentou o melhor desempenho. Durante todo o processo, foram realizados ciclos alternados de refinamento com inspeção visual do mapa de densidade eletrônica, remodelando manualmente as posições dos resíduos com o programa COOT⁹².

As validações dos modelos foram feitas com o programa MolProbity⁹³. Após a obtenção de modelos estruturais satisfatórios para os dados cristalográficos, as estruturas foram submetidas a análises sistemáticas de diferenças nas conformações com outras estruturas idênticas, obtidas com diferentes ligantes, diferenças entre estruturas de outros subtipos que pudessem explicar a seletividade dos ligantes, além da identificação dos elementos principais de reconhecimento dos ligantes em questão.

3.8 Mutações sítio dirigidas

Algumas mutações foram escolhidas para o hPPAR α LBD após as análises da estrutura cristalográfica que indicaram a presença de um segundo sítio de ligação do ligante WY14643. As mutações propostas visavam dificultar a interação dessa segunda molécula para se verificar possíveis mudanças na atividade proteica. As mutações escolhidas foram: E251A, por ser a única interação polar proteína:ligante; V255A e V255A/I263A na tentativa de se minimizar as interações hidrofóbicas.

Todas as mutações foram introduzidas, através de uma reação de PCR, em um vetor já existente (plasmídeo usado nos experimentos de transativação - pBIND contendo DBD-GAL4 e LBD-PPAR α) com a sobreposição de *primers* contendo as mutações, usando técnicas padrões estabelecidas no *Kit QuickChange Site-directed Mutagenesis* (Stratagene). Os oligonucleotídeos utilizados estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - *Primers* construídos para a inserção de mutações em plasmídeos já existentes.

Mutante	Primer (5' à 3') (base modificada em vermelho)
PPAR α E251A	GAT ATG GAG ACA CTG TGT ATG GCT GCG AAG ACG CTG GTG GCC AAG CTG GTG
PPAR α V255A	CTG TGT ATG GCT GAG AAG ACG CTG TGG GCC AAG CTG GTG GCC AAT GGC ATC
PPAR α V255A/I263A	CTG TGT ATG GCT GAG AAG ACG CTG GCC GCC AAG CTG GTG GCC AAT GGC GCC CAG AAC AAG GAG GTG GAG GTC

Todas as mutações foram verificadas através de sequenciamento.

3.9 Ensaios de transativação de gene repórter

O ensaio de transativação é um método amplamente empregado para se estudar o efeito que uma sequência regulatória de um determinado gene, inserido artificialmente no sistema eucarioto, exerce sobre o nível de transcrição desse último. Por essa razão, é o método de escolha para se delimitar os elementos regulatórios, avaliar os efeitos de moléculas sobre a transcrição gênica e estudar o impacto de mutações.

A engenharia envolvida nessa técnica compreende a construção de um plasmídeo quimérico contendo uma sequência regulatória (objeto de estudo) ligada a um gene repórter. O plasmídeo recombinante é introduzido em um tipo de célula apropriado e, depois do tratamento, que se espera influenciar no processo de transcrição gênica, o produto do gene repórter expresso é quantificado ou avaliado. O produto dessa avaliação deve refletir a habilidade da sequência regulatória inserida de promover a transcrição.

O sistema de gene repórter empregado foi a luciferase de vagalume como produto da transcrição. Essa enzima catalisa uma reação de bioluminescência que requer a luciferina como substrato, ATP, Mg^{2+} e O_2 . A emissão total de luz é proporcional à atividade da luciferase e, consequentemente, reflete a taxa de transcrição do gene repórter sob a ação do promotor em estudo.

Os plasmídeos utilizados para realização desses ensaios foram:

- plasmídeo repórter pGRE-LUC, contendo o elemento responsivo GRE (*Gal Responsive Element*) do GAL4 e o gene repórter da luciferase de vagalume;
- plasmídeo pBIND possuindo a sequência que transcreve o elemento regulatório, ou seja, a proteína quimera composta pelo DBD da proteína GAL4 e o LBD dos PPARs, com controle exercido por um promotor forte de citomegalovírus (CMV);
- plasmídeo pRL-TK, utilizado como controle do experimento. Ele produz uma sequência que transcreve constitutivamente o gene da luciferase de *Renilla* depois de transfectado. Dessa forma, essa normalização minimiza a variabilidade causada por diferenças na viabilidade celular ou eficiência da transfecção, além de diferenças causadas pela pipetagem e pelo processo de lise celular. Outra vantagem é que, por se tratar de uma proteína que reconhece um substrato diferente, podemos utilizar o mesmo lisado celular para a análise e para a normalização. Esse plasmídeo é proveniente do *Kit Dual-Luciferase Report Assay system* (Promega, Madison, WI).

Todos os plasmídeos utilizados foram cedidos pelo Dr. Paul Webb (*The Methodist Hospital Research Institute, Houston, EUA*).

Uma esquematização do experimento está representada na Figura 13.

A linhagem celular utilizada foi de origem eucariótica humana proveniente de carcinoma de fígado, HepG2. A manutenção dessas células ocorreu em *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino, 2 mM de glutamina, 50 unidades/mL de penicilina e estreptomicina sob condições de 95% de ar e 5% CO_2 à 37 °C.

Para a transfecção, as células foram tripsinizadas, ressuspensas em DMEM e colocadas em placas de 24 poços (densidade de $1,2 \times 10^5$ células/poço). Em seguida, foi utilizada a lipofectamina FuGENE 6 (Roche) para transfectar 50 ng de pGRE-LUC, 100 ng de pBIND contendo o PPAR LBD/GAL4 DBD e 1 ng de pRL-TK. A relação utilizada de DNA (μ g) para FuGENE 6 (μ L) foi de 1:3.

Figura 13 - Esquema representativo do experimento de transativação de gene repórter. A proteína quimérica possui o LBD do receptor nuclear fusionada ao DBD da Gal4. A ligação do ligante ao LBD ativa a proteína e seu DBD reconhece uma sequência específica no DNA que controla a expressão da luciferase. Quando a luciferase expressa através da ativação da proteína quimérica encontra moléculas de luciferina, ocorre uma reação enzimática que resulta em luminescência.

Os ligantes foram adicionados à cultura transfectada 24 horas depois e incubados por mais 24 horas. Após esse período a monocamada celular foi ressuspensa em tampão de lise (*Kit Dual-Luciferase Report Assay system*). A atividade da luciferase de vaga-lume e de *Renilla* presentes no lisado celular foram determinadas usando luciferinas provenientes do *Kit Dual-Luciferase Report Assay System* e as medidas realizadas no contador de luminescência Tecan Safire 2 (Tecan US, NC, EUA). Quanto aos tratamentos com ligantes, inicialmente foram utilizadas somente 2 ou 3 concentrações para verificar se ocorreria ativação, em seguida curvas foram obtidas titulando diversas concentrações diferentes do ligante de interesse (geralmente de 10^{-9} a 10^{-5} M). Os valores de EC_{50} foram calculados através do programa *GraphPad Prism4* (GraphPad Software, San Diego, Califórnia EUA: www.graphpad.com). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.10 Ensaios de duplo-híbrido em células de mamíferos

O sistema de duplo-híbrido em células de mamíferos é usado para estudar interações proteína:proteína e é bastante similar com o sistema mais conhecido de duplo-híbrido em leveduras. Ambos são baseados no fato de que fatores de transcrição em eucariotos são compostos por dois domínios funcionais e fisicamente distintos: um domínio de ligação ao DNA (DBD) e um domínio de ativação (AD). O DBD reconhece uma sequência específica do DNA, neste caso, um elemento promotor e o AD coordena o arranjo de elementos requeridos

para a transcrição.

O sistema de duplo híbrido de mamíferos depende de três plasmídeos, que são co-transfectados simultaneamente: um vetor que contém um DBD com uma sequência codificadora da proteína isca (DBD-X) e um plasmídeo que contém um AD com uma sequência codificadora da proteína presa (AD-Y). O terceiro vetor contém o sítio de ligação ao DNA específico ao DBD utilizado. A interação entre as proteínas "X" e "Y" resulta em associação do DBD com o AD e, conseqüentemente, se tem início à transcrição. A vantagem desse sistema é que para se estudar interações de proteínas de mamíferos, o verdadeiro ambiente nativo é mimetizado.

O formato mais comum desse sistema de duplo-híbrido em células de mamíferos consiste de um vetor contendo o DBD da proteína GAL4, o outro vetor contendo o AD do vírus da herpes simplex VP16 e um terceiro vetor contendo sítio de ligação ao GAL4 seguido pelo gene da luciferase de vagalume.

Nesses ensaios, a cultura de células HepG2 também foi utilizada nas mesmas condições citadas. A transfecção foi realizada da mesma maneira que os ensaios de transativação, utilizando os plasmídeos pBIND contendo além do DBD do GAL4 sequências referentes a proteínas coativadoras (GRIP - *Glucocorticoid Receptor Interacting Protein 1* e SRC1 - *Steroid Receptor Coactivator 1*), correpressoras (NCOR - *Nuclear Receptor Corepressor*), ou receptor nuclear (RXR); o pGRE-LUC; e o pACT com o AD do VP16 e o LBD de PPARs; além é claro, do vetor pRL-TK usado como controle.

O tratamento com ligantes e a leitura de luminescência foram praticados da mesma maneira que os ensaios de transativação.

CAPÍTULO 4

Resultados e Discussão

Obtenção das Proteínas Alvos

4 Resultados e Discussão: Obtenção das Proteínas Alvos

4.1 Subclonagem hPPAR α LBD em pET28a(+)

A construção do clone do hPPAR α , contendo o domínio LBD, que compreende os aminoácidos 195 ao 478, foi obtida através da amplificação do cDNA do hPPAR α DBD-LBD inserido no vetor pTrcHisA, utilizando oligonucleotídeos específicos. A reação de amplificação foi confirmada através de eletroforese em gel de agarose (Figura 14A).

Figura 14 - Gel de agarose 1% TAE 1X mostrando o resultado da amplificação e digestão do gene hPPAR α LBD. **A.** **1)** Marcador de massa molecular (MMM); **2)** pTrcHisA-hPPAR α ; **3)** Amplificação do hPPAR α LBD (retângulo preto). **B.** Digestão **1)** Marcador de massa molecular; **2)** Inserto referente ao hPPAR α LBD.

Através de reações de digestão e ligação, o inserto foi implantado no vetor pET28a(+). Os plasmídeos recém construídos foram transformados em células competentes DH5 α e BL21 (DE3) que renderam placas com muitas colônias isoladas que apresentavam resistência ao antibiótico kanamicina (característica proveniente do plasmídeo em questão). Essas colônias foram analisadas por PCR de colônias e a checagem através de digestão com as mesmas enzimas utilizadas para a clonagem, que apresentou clones recombinantes com a liberação do inserto do tamanho correto (Figura 14B) e sequência correta e sem mutações, de acordo com o sequenciamento.

4.2 Obtenção da proteína hPPAR α LBD pura e clivada

4.2.1 Expressão proteica

Várias condições de expressão proteica, que exploraram diferentes temperaturas, períodos de indução e quantidades do composto indutor IPTG, foram testadas. A melhor condição foi determinada para o clone do hPPAR α LBD, através da verificação de géis de poliacrilamida (Figura 15), que apontaram um aumento gradativo da banda na altura esperada para a proteína de interesse (31 kDa). O protocolo foi estabelecido considerando o maior rendimento de proteínas solúveis como: crescimento das células a 37 °C até atingir a DO_{600nm} = 0,6; indução com 1 mM de IPTG, à 18 °C e tempo de indução de 12 horas, com agitação de 250 rpm.

Figura 15 - SDS-PAGE 15% indicando o teste de expressão do hPPAR α LBD (31 kDa). **1)** MMM (66 kDa, 45 kDa, 36 kDa e 29 kDa); **2)** Aliquota antes da indução com IPTG; **3)** 1 hora de indução; **4)** 2 horas de indução; **5)** 3 horas de indução; **6)** 4 horas de indução e **7)** 12 horas de indução.

Para a obtenção das quantidades necessárias de proteína pura para os ensaios que se seguiram, a expressão foi realizada em larga escala, aplicando de 4 a 6 litros de meio de cultura em cada processo de purificação. As outras proteínas foram expressas seguindo as condições descritas na seção de materiais e métodos (item 3.3.2).

As condições utilizadas para preparo dos extratos celulares foram eficientes na lise das células e na manutenção das proteínas, que foram encontradas principalmente na fração solúvel do lisado.

4.3 Purificação e clivagem da cauda de histidina

O primeiro passo de purificação utilizado para todas as proteínas expressas explorava a afinidade da cauda de histidina, presente nas proteínas por uma matriz com íons de cobalto. O conjunto resina+proteínas sofria lavagens com tampões contendo concentrações crescentes de imidazol e a eluição das proteínas ocorria somente no tampão de eluição com 300 mM de

imidazol. Porém, em todos os casos, mesmo após esse procedimento de purificação, ainda foi observada a presença de alguns contaminantes nas eluições provenientes da coluna de afinidade. Por este motivo, as amostras de proteínas eluídas foram submetidas a um segundo passo de purificação, desta vez por cromatografia por exclusão de tamanho.

Abaixo estão representados os cromatogramas destas purificações das proteínas de interesse e os géis de poliacrilamida provenientes da técnica SDS-PAGE, que foram utilizados para a análise da pureza dos produtos das técnicas de purificação.

A proteína hPPAR α LBD exibiu um pico predominante no cromatograma da purificação por exclusão de tamanho (Figura 16A) e, posteriormente aos dois passos de purificação, apresentou alto grau de pureza, como pode ser observado pelo SDS-PAGE (Figura 16B), e um rendimento bastante alto, cerca de 30 mg de proteína por litro de cultura crescida.

Figura 16 - Purificação da proteína hPPAR α LBD. **A.** Cromatograma da purificação por exclusão de tamanho utilizando a coluna HL Superdex 75 16/60, onde o maior pico é referente à eluição da proteína hPPAR α LBD. **B.** SDS-PAGE 15%, utilizado para verificação dos passos de purificação da proteína, sendo **1)** Marcador de massa molecular (MMM) utilizado como padrão (66, 45, 36, 30, 29, 20 e 12 kDa); Amostras provenientes **2)** da purificação por afinidade; **3)** da eluição do primeiro e **4)** do segundo pico da purificação por exclusão de tamanho. **C.** SDS-PAGE 15% da clivagem da cauda de histidina do hPPAR α LBD. **1)** MMM (66, 45, 36, 29 e 12 kDa); **2)** Aliquota antes **3)** durante e **4)** depois de 12 horas de clivagem.

Como esse alvo proteico seria submetido a ensaios de cristalização, foi necessária a clivagem da cauda de histidina, pois a presença da mesma, em alguns casos, pode dificultar o processo de formação de cristais. Desse modo, após a purificação, foram realizados vários testes de clivagem que indicaram uma condição que resultava em quase 100% de proteína

clivada (Figura 16C). Nessa condição, a proteína foi mantida por 12 horas a 15 °C, na presença de trombina. A proteína pura e livre da cauda de histidina foi utilizada nos ensaios bioquímicos e estruturais que se seguiram.

Para os próximos alvos analisados, os receptores hPPAR γ LBD e DBD-LBD, podemos observar na figura 17, que os dois passos de purificação foram eficientes na separação das proteínas de interesse, presentes na maior parte, na fração solúvel do extrato celular.

Figura 17 - Purificação da proteína hPPAR γ . **A.** Cromatograma da purificação por exclusão de tamanho utilizando a coluna HL Superdex 75 16/60 para a construção da proteína referente ao domínio LBD (em azul) e para a proteína contendo os domínios DBD-LBD (em vermelho), cromatograma utilizando a coluna HL Superdex 75 26/60, onde os maiores picos são referentes às eluições das proteínas em questão. SDS-PAGE 15%, utilizado para verificação dos passos de purificação das proteínas **B.** hPPAR γ LBD, sendo **1.** MMM (66, 45, 36, 29, 14 e 12 kDa); **2.** - **3.** Frações do pico da purificação por cromatografia por exclusão de tamanho **C.** hPPAR γ DBD-LBD, sendo **1)** MMM utilizado como padrão (66, 45, 29, 20 e 12 kDa); Amostras provenientes **2)** da fração solúvel do extrato celular; **3)** da purificação por afinidade e **4)** da eluição do maior pico da purificação por exclusão de tamanho.

O receptor hRXR α , independente da construção DBD-LBD e LBD utilizada, apresenta uma migração anômala através do gel de poliacrilamida. A banda de ambas as construções deste receptor aparecem a uma altura superior à esperada (Figura 18). Não encontramos uma explicação concreta para esse fenômeno, porém pode estar relacionado às características intrínsecas desse receptor.

Figura 18 - Purificação da proteína hRXR α . **A.** Cromatograma da purificação por cromatografia por exclusão de tamanho, utilizando a coluna Supersdex 200 16/60. Em azul o resultado da cromatografia realizada para a proteína contendo somente o LBD e em vermelho para a construção com os dois domínios (DBD-LBD). SDS-PAGE 15% das amostras oriundas das purificações **B.** do hRXR α LBD, onde **1.** MMM (66, 45, 36, 29, 20 e 12 kDa); **2.** amostra aplicada na coluna de cromatografia por exclusão de tamanho (resultado da purificação por afinidade); e **3.** eluição da purificação por exclusão de tamanho. **C.** do hRXR α DBD-LBD, onde **1.** MMM (66, 45, 36, 29, 20 e 12 kDa); **2.** eluição da purificação por afinidade; e **3.** eluição da purificação por exclusão de tamanho.

A metodologia empregada para a produção e purificação de cada proteína foi eficiente e, todas apresentaram um grau de pureza e rendimento suficientes para os ensaios realizados posteriormente.

CAPÍTULO 5

Resultados e Discussão
Estudos Oligoméricos do PPAR
em Solução

5 Estudos Oligoméricos do PPAR em Solução

5.1 Introdução

Para compreender a função dos receptores nucleares em nível molecular, as características estruturais que medeiam a formação de heterodímeros, a ligação do ligante, a especificidade de reconhecimento da sequência de DNA e os eventos moleculares envolvidos no mecanismo de ativação dos receptores devem ser entendidos. Como descrito anteriormente, os PPARs ativam a transcrição de genes alvos após a ligação do agonista. Neste processo, os DBDs do PPAR reconhecem e se ligam a motivos específicos no DNA, conhecidos como PPREs. Esses PPREs são reconhecidos por heterodímeros de RXR com PPAR, enquanto que PPARs sozinhos não são capazes de se ligar a eles³⁷. A dimerização é um processo de reconhecimento do DNA, frequente em muitas famílias de fatores de transcrição eucarióticos⁹⁴. Esse processo também é comum dentro da superfamília de receptores nucleares, em que as interações funcionais com o DNA envolvem, frequentemente, a formação de homodímeros ou heterodímeros com o RXR⁹⁵.

O heterodímero PPAR γ /RXR α , mais especificamente, regula a transcrição de genes envolvidos principalmente na ação da insulina, diferenciação dos adipócitos, metabolismo lipídico e inflamação⁹⁶. A estrutura cristalográfica desse complexo intacto (presença de todos os domínios proteicos) ligado ao DNA já está disponível²² e mostrou que as arquiteturas globais dos domínios DBD e LBD são muito semelhantes às estruturas cristalográficas dos domínios separados^{21; 97}. No entanto, através da estrutura dos receptores completos foi possível estudar as interações entre os domínios funcionais. Os dois receptores formadores do complexo (RXR α e PPAR γ) são posicionados de forma assimétrica, com as interações entre o PPAR γ e o RXR α , mediadas pelas conhecidas interfaces de dimerização formadas pelos LBDs²¹ e DBDs. O modelo de alta resolução também revelou uma interface de heterodimerização adicional entre o LBD do PPAR e o DBD e o *hinge* do RXR. Esta interface parece ser modulada por interações com o DNA, através de um posicionamento de ambos os receptores em um arranjo único, tanto espacialmente quanto em termos de polaridade²².

Apesar da cristalografia de proteínas revelar informações detalhadas e precisas sobre a estrutura terciária de macromoléculas, as proteínas podem adotar outras conformações funcionais em solução. Por exemplo, acredita-se que a conformação da proteína seja regulada

através de contatos com o DNA e no contexto da cromatina. Portanto, a conformação geral de uma macromolécula e/ou sua estrutura quaternária mais dinâmica em solução pode ser acessada através de SAXS⁹⁸. Esta técnica só fornece informações de baixa resolução estrutural, mas pode revelar a estrutura geral e os estados oligoméricos de proteínas nativas em condições aquosas quase fisiológicas, permitindo, ainda, a análise de alterações estruturais mais gerais, em resposta às variações de parâmetros experimentais.

5.2 Resultados e Discussão

5.2.1 Análise do estado oligomérico do PPAR em solução por resultados de cromatografia analítica por exclusão de tamanho, gel nativo e DLS

As amostras puras de hPPAR α LBD, hPPAR γ LBD e hPPAR γ DBD-LBD foram submetidas à cromatografia analítica por exclusão de tamanho. No caso do hPPAR α LBD foram testadas diferentes concentrações da proteína para verificar a influência da mesma no estado oligomérico. Todas as amostras, incluindo as diferentes concentrações do PPAR α e as diferentes construções (presença/ausência de domínios) do PPAR γ , apresentaram um perfil de eluição com um pico único predominante (Figura 19) que, segundo a calibração das colunas, refere-se à forma monomérica da proteínas, apresentando valores de massa molecular (MM) aparente e R_H consistentes com os valores esperados⁹⁹ (Tabela 2).

Os heterodímeros, formados posteriormente à incubação das proteínas PPARs e RXR α de maneira estequiométrica (1:1), também foram submetidos à análise em colunas para cromatografia analítica por exclusão de tamanho com o intuito de verificar a formação do complexo, que fica visível através da migração dos maiores picos dos cromatogramas para a região referente a dímeros (Figura 19), também analisados segundo a calibração das colunas (Tabela 2). A formação do complexo foi confirmada simultaneamente através do SDS-PAGE que mostra duas bandas para a porção referente aos picos em questão.

Figura 19 - Perfil cromatográfico proveniente da cromatografia analítica por exclusão de tamanho para análise dos oligômeros em solução e formação do heterodímero funcional PPAR/RXR. **A.** Diferentes concentrações de hPPAR α LBD analisadas. Eluição referente a formação dos heterodímeros (em azul) **B.** hPPAR α /hRXR α LBD; **C.** hPPAR γ /hRXR α LBD; e **D.** hPPAR γ /hRXR α DBD-LBD. Todas as eluições dos heterodímeros apresentaram um deslocamento do pico predominante de monômeros de cada PPAR (em vermelho), confirmando assim a formação do complexo. **Inserto:** SDS-PAGE 15% sendo **B. 1)** MMM (66, 45, 36, 30 e 12 kDa) e **2)** amostra do pico referente ao heterodímero; **C. 1)** MMM (66, 45, 36 e 30 kDa) e **2)** amostra do pico referente ao heterodímero e **D. 1)** MMM (66, 45, 30 e 12 kDa) e **2)** amostra do pico referente ao heterodímero. Em **A. B. C.** Foi utilizada a coluna Superdex 75 10/30 e, em **D.** a coluna Superdex 200 10/30.

Tabela 2 - Valores obtidos para os R_H e MM das proteínas de interesse, segundo as calibrações realizadas nas colunas de cromatografia de exclusão por tamanho utilizadas.

Proteína	Parâmetro	2 mg/mL	5 mg/mL	7 mg/mL	10 mg/mL	+ hRXR α
hPPAR α LBD	R_H (nm)	2,61	2,51	2,54	2,49	3,65
	MM (kDa)	39,0	36,0	37,0	36,0	63,0
hPPAR γ LBD	R_H (nm)	-	2,45	-	-	3,52
	MM (kDa)	-	35,0	-	-	60,0
hPPAR γ DBD-LBD	R_H (nm)	-	3,53	-	-	4,58
	MM (kDa)	-	42,0	-	-	79,0

As amostras das proteínas hPPAR α e hPPAR γ LBD, obtidas através da cromatografia analítica por exclusão de tamanho, foram avaliadas também por eletroforese de gel não

desnaturante, que apresentou, predominantemente, uma banda na altura esperada para as proteínas monoméricas em todas as concentrações testadas (Figura 20A e C).

A formação do complexo foi aferida da mesma maneira e exibiu apenas uma banda em uma altura superior às apresentadas pelos monômeros dos receptores, o que indica a formação do heterodímero (Figura 20B e D). Em algumas frações da eluição do heterodímero do receptor isotipo α observou-se uma pequena banda referente aos tetramêros de RXR. Para a utilização de heterodímeros em outras técnicas, apenas a fração referente ao poço 6 (Figura 20B) foi utilizada e, desta forma, garantiu-se o uso da amostra de heterodímeros o mais homogênea possível.

Figura 20 - Gel Nativo de amostras hPPAR α e hPPAR γ LBD em diferentes concentrações e em complexo com hRXR α LBD. **A.** hPPAR α LBD **1)** MMM (669, 440, 232, 140 e 67 kDa); **2 - 6)** concentrações da proteína em mg/mL: 2; 3,5; 5; 7; 10, respectivamente. **B.** Análise da formação do heterodímero hPPAR α /hRXR α LBD. **1)** MMM; **2)** hPPAR α LBD; **3 - 6)** Frações eluídas da coluna de cromatografia por exclusão de tamanho, pico de heterodímero; **7)** hRXR α LBD. **C.** hPPAR γ LBD **1)** MMM; **2 - 7)** concentrações da proteína em mg/mL: 1; 3; 5; 7; 10 e 15, respectivamente. **D.** Análise da formação do heterodímero hPPAR γ /hRXR α LBD. **1)** MMM; **2)** hPPAR γ LBD; **3)** hRXR α LBD; **4)** MMM e **5)** heterodímero.

A técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS) também foi empregada em conjunto com as outras para confirmar a presença unicamente de monômeros de PPAR em solução. As amostras de hPPAR γ LBD foram submetidas às medidas em diferentes concentrações e, além do R_H , essas medidas também foram realizadas para avaliar a monodispersividade da amostra. Os resultados de DLS também confirmaram que o PPAR

permanece na forma monomérica ao longo de um intervalo de concentrações de proteína de 1 a 20 mg/mL, sob a temperatura de 4 °C, com um R_H por volta de 2,5 nm (Figura 21).

Figura 21 - Resultados de espalhamento de luz dinâmica. Valores para R_H do hPPAR γ LBD, derivados de estudos de DLS, são representados como uma função da concentração de proteína.

A mesma abordagem foi utilizada para determinar o raio hidrodinâmico do complexo hPPAR γ /hRXR α LBD mas, em vez de várias concentrações, as medições foram realizadas na concentração única de 1 mg/mL que resultou no R_H de 3,9 nm, concordando com a forma heterodimérica em solução. Esse valor também é consistente com o observado para os dímeros do receptor NGFI-B LBD, que possui R_H de 3,8 nm¹⁰⁰.

Através das metodologias aqui especificadas para a investigação da forma oligomérica do hPPAR em solução, constatou-se que este receptor é monomérico dentro do intervalo de concentração testado. Entretanto, na presença de hRXR α ocorre a formação dos dímeros funcionais PPAR/RXR.

5.2.2 Estudos de espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS)

Após a obtenção de dados sobre o R_H da proteína em solução, empregando distintas práticas, o SAXS foi aplicado para obter informações sobre o R_g , volume molecular, envelope e consequentemente confirmar o estado de oligomerização do PPAR.

Igualmente, para garantir a amostragem de isotipos e verificar a influência dos domínios e da concentração proteica, esses estudos foram realizados com amostras de diferentes concentrações de hPPAR α LBD, hPPAR γ LBD e hPPAR γ DBD-LBD, além de seus complexos com o RXR.

5.2.2.1 Análises do hPPAR α e hPPAR γ LBD isolados e em complexo com o hRXR α LBD

Inicialmente, as análises sistemáticas dos dados de SAXS foram efetuadas e as curvas cortadas na região do q_{min} , de modo a extrair informações referentes aos aglomerados proteicos inespecíficos presentes nas amostras preparadas. As diferentes concentrações medidas dos receptores resultaram em curvas de espalhamento e $p(r)$ similares, indicando que a formação de diferentes aglomerados proteicos não é dependente da concentração (dentro do intervalo de concentrações analisadas) e que efeitos de interferência também não ocorreram, portanto, as análises subsequentes serão apresentadas em termos de dados obtidos para uma única concentração proteica.

As análises de Guinier foram realizadas e derivaram em valores para o R_g consistentes com os esperados para monômeros de PPAR e dímeros para os complexos PPAR/RXR (Tabela 3 e 4). Adicionalmente, esses valores também concordaram com os valores de R_g obtidos através da metodologia explorada pelo programa *Gnom*, que também obteve o valor para o $D_{máx}$ (Tabela 3 e 4), além de gerar a função $p(r)$, apresentada em forma de gráficos na figura 22. As curvas de espalhamento obtidas para os complexos PPAR/RXR apresentaram perfis muito diferentes e através das $p(r)$, podemos verificar um deslocamento para a direita, característico de moléculas maiores (Figura 22).

Tabela 3 - Parâmetros estruturais dos hPPAR α LBD e hPPAR α /hRXR α LBD referentes às medidas de SAXS.

Parâmetros estruturais	Monômero			Heterodímero		
	Exp ^s	PDB 1K7L	DAM	Exp ^s	PDB 1FM6*	DAM
$D_{máx}$ (Å)	65,0 ± 5,0	63,2	61,5	80,0 ± 5,0	82,9	85,2
R_g (Å) Guinier	20,9	-	-	27,7	-	-
R_g (Å) Gnom/Crysol	20,9 ± 0,1	20,1	21,1	28,8 ± 0,1	24,5	26,3
Resolução (Å)	-	-	35,3	-	-	35,9
MM _{SAXS MoW} (kDa)	35,0	-	-	69,2	-	-
MM _{teórico} (kDa)	31,0	-	-	57,5	-	-

^sDados Experimentais; *O PDB utilizado é referente à um heterodímero de hPPAR γ /hRXR α LBD, pois o mesmo possui alta identidade sequencial e estrutural com o heterodímero hPPAR α /hRXR α LBD.

Tabela 4 - Parâmetros estruturais dos hPPAR γ LBD e hPPAR γ /hRXR α LBD referentes às medidas de SAXS.

Parâmetros estruturais	Monômero			Heterodímero			
	Exp ^s	PDB 1FM6	DAM	Exp ^s	PDB 1FM6	DAM	CR [§]
$D_{máx}$ (Å)	65,0 ± 5,0	64,2	62,0	85,0 ± 5,0	85,4	85,7	89,1
R_g (Å) Guinier	21,1	-	-	29,1	-	-	-
R_g (Å) Gnom/Crysol	21,0 ± 0,1	20,2	20,1	28,2 ± 0,1	25,5	27,9	26,4
Resolução (Å)	-	-	25,4	-	-	25,6	-
MM _{SAXS MoW} (kDa)	33,0	-	-	73,9	-	-	-
MM _{teórico} (kDa)	31,3	-	-	57,8	-	-	-

^sDados Experimentais; [§]Modelo de alta-resolução obtido através da manipulação dos domínios como corpos rígidos (CR).

Figura 22 - Curvas experimentais de SAXS para os LBDs dos PPARs. **A.** Curva de espalhamento e **B.** função de distribuição de distâncias geradas a partir dos dados experimentais do hPPAR α LBD e do complexo hPPAR α /hRXR α LBD. **C.** Curva espalhamento e **D.** função de distribuição de distâncias geradas a partir dos dados experimentais do hPPAR γ LBD e do complexo hPPAR γ /hRXR α LBD. **A** e **C** apresentam gráficos $\text{Log } I$ versus q mostrando o ajuste das curvas experimentais (triângulos invertidos para os monômeros e círculos para os dímeros) com as curvas teóricas dos modelos de alta resolução (linhas pretas para os monômeros e cinzas para os heterodímeros). Inserto: Gráfico de Guinier. Todos os dados foram normalizados.

Para a confirmação dos estados oligoméricos foi utilizado o programa *Oligomer*¹⁰¹, capaz de assinalar a quantidade de monômeros e dímeros presentes, que indicou somente a presença de monômeros para todas as amostras de PPAR e dímeros para os complexos. Dentro desse contexto, utilizamos a ferramenta **SAXS MoW** que, através da curva de espalhamento realizou cálculos da massa molecular das partículas espalhadoras, garantindo ainda mais subsídios para a presença de somente monômeros para amostras de PPAR e a formação do complexo funcional (Tabela 3-5). É importante notar que as massas moleculares preditas para os complexos são um tanto superestimadas, mas isso pode ser devido ao algoritmo dessa ferramenta ser baseada no pressuposto de que a densidade da proteína é fixa por unidade de volume ocupado pelo envelope molecular⁸², não considerando, assim, a mobilidade conformacional dos heterodímeros.

Os modelos de baixa resolução dos monômeros e dos complexos heterodiméricos foram gerados sem imposição de simetria, possuindo uma resolução em torno de 30 Å. Para verificar a veracidade dos modelos, foram realizadas 10 construções independentes e em todos os casos foram obtidos envelopes similares, onde os envelopes médios gerados foram alinhados com os modelos de alta resolução.

Os modelos obtidos para os monômeros dos domínios LBDs apresentaram um formato globular, como esperado segundo as estruturas cristalográficas desses domínios isolados, enquanto que os modelos para os heterodímeros exibiram um formato um pouco mais alongado, diferente dos primeiros modelos citados (Figuras 23 e 24).

Figura 23 - Modelos de SAXS. Envelopes de baixa resolução **A.** dos monômeros de hPPAR α LBD e **B.** dos heterodímeros hPPAR α /hRXR α LBD, derivados de cálculos *ab initio*. Superposição da média de 10 DAMs obtidos pelo DAMMIN com estruturas depositadas no PDB. Os modelos foram rotacionados a 90° em torno do eixo y e x, respectivamente. Em azul o DAM do monômero; em preto a estrutura cristalográfica do LBD do hPPAR α (PDB 1K7L); em verde o DAM do heterodímero e em preto e cinza o modelo de alta resolução do heterodímero hPPAR α /hRXR α LBD (PDB 1FM6 modificado).

No geral, as curvas computadas com base nas estruturas cristalográficas dos monômeros do PPAR α e γ LBD resultaram em um ajuste razoável com as curvas experimentais (Figura 22). Porém, o mesmo ajuste não foi observado para o heterodímero, que necessita de um modelo com uma abertura maior entre os LBDs do que o observado na estrutura cristalográfica, para se obter um melhor ajuste com as curvas experimentais obtidas através do SAXS. O modelo de corpo rígido gerado apresentou essa maior abertura entre os LBDs com cerca de um ângulo de 47° contra o ângulo de 30° observado para a estrutura cristalográfica (Figura 24C), garantindo, assim, um melhor ajuste entre as curvas (Figura 22).

Essa metodologia foi empregada somente para o isotipo γ , que apresentava maior discrepância entre as curvas experimentais e as geradas para o modelo de alta resolução. Entretanto, análises similares também foram realizadas com o isotipo α (dados não mostrados) e que renderam poucas diferenças entre os ajustes das curvas, tanto o modelo de corpo rígido quanto o cristalográfico apresentaram ajustes similares. Devido a resolução trabalhada, não podemos garantir que existam diferenças entre os isotipos, somente que, em solução, essas proteínas apresentam uma flexibilidade maior, como o esperado.

Figura 24 - Envelopes de baixa resolução **A.** dos monômeros de hPPAR γ LBD e **B.** dos heterodímeros hPPAR γ /hRXR α LBD, derivados de cálculos *ab initio*. Superposição da média de 10 DAMs obtidos pelo DAMMIN com estruturas depositadas no PDB. Os modelos foram rotacionados a 90° em torno do eixo y e x, respectivamente. Em ciano o DAM do monômero; em preto a estrutura cristalográfica do LBD do hPPAR γ (PDB 1FM6, somente o PPAR); em vermelho o DAM do heterodímero e em preto e cinza o modelo de alta resolução do heterodímero hPPAR γ /hRXR α LBD (PDB 1FM6). **C.** Superposição do modelo de corpo rígido (em tons de vermelho) com a estrutura cristalográfica (em preto), mostrando a abertura do ângulo imposta no modelo de corpo rígido, maior que a observada na estrutura cristalográfica.

Para explicar a preferência da formação de heterodímeros ao invés de homodímeros, uma análise da estrutura cristalográfica do complexo PPAR γ /RXR α LBD mostrou que a interface de dimerização apresentada por eles exibe uma assimetria que reflete em interações adicionais entre os dois receptores²¹. Essa formação assimétrica resulta em um empacotamento de uma região carregada positivamente do RXR com a superfície negativamente carregada no PPAR (Figura 25).

Figura 25 - Formação assimétrica do heterodímero PPAR γ /RXR α LBD. Essa assimetria resulta em interações adicionais além de garantir um maior empacotamento de superfícies opostamente carregadas das proteínas.

O efeito das interações adicionais originadas do empacotamento assimétrico do heterodímero aumentam consideravelmente a interface²¹. Contudo, presumiu-se que a preferência do PPAR para a formação do heterodímero é consequência tanto do aumento da área de contato, bem como devido à complementaridade de cargas da interface.

5.2.2.2 Modelos de SAXS sugerem uma disposição diferente para os domínios das proteínas em solução

A análise dos resultados SAXS mostrou também que a presença do domínio DBD não influencia no estado oligomérico da proteína. Curvas características de monômeros foram

obtidas para o hPPAR γ DBD-LBD e de heterodímeros para o hPPAR γ /hRXR α DBD-LBD, mostradas na Figura 26A.

Figura 26 - Curvas experimentais de SAXS do hPPAR γ DBD-LBD e de seu complexo com o hRXR α DBD-LBD. **A.** Curva espalhamento e **B.** função de distribuição de distâncias geradas a partir dos dados experimentais do hPPAR γ DBD-LBD (triângulos amarelos invertidos) e do complexo hPPAR γ /hRXR α DBD LBD (círculos magenta). Os gráficos mostram o ajuste das curvas experimentais com as curvas teóricas dos modelos cristalográficos (linha preta para o monômero e cinza para o heterodímero) e de corpo rígido (linha cinza escuro para o monômero e cinza claro para o heterodímero). Inseto: Gráfico de Guinier. Todos os dados foram normalizados.

Os parâmetros estruturais derivados das curvas de espalhamento (Tabela 5) estão condizentes com as formas oligoméricas citadas e são compatíveis com os valores calculados através da análise de Guinier (Tabela 5 e inserto Figura 26A) e também através da curva baseada na distribuição de distâncias ($p(r)$) (Figura 26B).

Tabela 5 - Parâmetros estruturais dos hPPAR γ DBD-LBD e hPPAR γ /hRXR α DBD-LBD referentes às medidas de SAXS.

Parâmetros estruturais	Exp ^s	Monômero			Exp ^s	Heterodímero		
		PDB 1FM6	DAM	CR [§]		PDB 1FM6	DAM	CR [§]
$D_{\text{máx}}$ (Å)	100,0 ± 5,0	83,1	110,6	101,1	130,0 ± 5,0	92,1	129,1	121,7
R_g (Å) Guinier	29,6	-	-	-	33,8	-	-	-
R_g (Å) Gnom/Crysol	31,1 ± 0,1	25,8	31,1	29,5	35,0 ± 0,2	28,2	34,9	34,4
Resolução (Å)	-	-	26,0	-	-	-	26,0	-
$MM_{\text{SAXS MoW}}$ (kDa)	55,0	-	-	-	93,9	-	-	-
$MM_{\text{teórico}}$ (kDa)	42,0	-	-	-	80,2	-	-	-

^sDados Experimentais; [§]Modelo de alta-resolução obtido através da manipulação dos domínios como corpos rígidos (CR).

Os modelos de baixa resolução (DAMs) também foram obtidos para essa construção e apresentaram um formato alongado. No caso do complexo, uma forma mais assimétrica (Figura 27) do que a obtida para os outros dímeros de receptores nucleares¹⁰² foi observada. Essa assimetria é compatível com a estrutura cristalográfica completa desse complexo e permite interações adicionais entre os domínios.

Figura 27 - Envelopes de baixa resolução. **A.** monômeros de hPPAR γ DBD-LBD e **B.** heterodímeros hPPAR γ /hRXR α DBD-LBD. Superposição do DAM médio obtidos pelo DAMMIN com estruturas cristalográficas. Os modelos foram rotacionados a 90° em torno do eixo y e x, respectivamente. Em amarelo o DAM do monômero; em preto o modelo de corpo rígido do hPPAR γ DBD-LBD; em magenta o DAM do heterodímero e em preto e cinza o modelo de corpo rígido gerado para o heterodímero hPPAR γ /hRXR α DBD-LBD. **C.** Superposição do modelo de corpo rígido (em tons de rosa) com a estrutura cristalográfica (PDB 3DZU, em preto), mostrando as diferenças entre as posições dos DBDs do modelo de corpo rígido e da estrutura cristalográfica. Os DBDs foram transladados e a distância entre a posição inicial e final dos mesmos está representada pelas linhas tracejadas em vermelho para DBDs do PPAR em azul para os DBDs do RXR.

Para a comparação dos dados experimentais com os modelos estruturais de alta resolução foram computadas curvas para os mesmos. Tanto para o monômero quanto para o heterodímero foram observadas discrepâncias entre as curvas (Figura 26), incluindo os valores de $D_{\text{máx}}$ que aparentavam maiores valores para os DAMs (Tabela 5), indicando que a proteína em solução é mais alongada que na forma cristalina.

Modelos de corpos rígidos foram gerados com o intuito de minimizar a discrepância observada e foram sobrepostos aos DAMs (Figura 27A e B). Para o monômero o *hinge* foi mantido e os domínios separados em dois corpos rígidos que foram posicionados um pouco mais distantes um do outro. O mesmo procedimento foi realizado com o heterodímero, porém as interfaces conhecidas de dimerização entre os domínios foram mantidas e os DBDs e LBDs posicionados a uma distância maior entre eles. Entretanto, a interface observada na estrutura cristalográfica entre o DBD do PPAR e o LBD e o *hinge* do RXR não pode ser mantida. Os DBDs do PPAR e RXR foram transladados do modelo inicial (PDB 3DZU), respectivamente, 46,9 e 47,6 Å (Figura 27C). O modelo de corpo rígido foi capaz de descrever as curvas de espalhamento de raios-X à baixos ângulos, que resultou em uma melhora no ajuste entre as curvas quando comparada a estrutura cristalográfica do complexo.

Medidas de SAXS com o complexo proteico (PPAR+RXR) na presença do DNA também foram realizadas, porém não obtivemos curvas satisfatórias e observamos uma maior instabilidade da amostra utilizada. Por esse motivo, os resultados foram omitidos.

5.2.3 Análise da dinâmica da proteína e formação do complexo através da troca de hidrogênio por deutério avaliada por espectrometria de massas

O comportamento dinâmico em solução da proteína hPPAR γ DBD-LBD e as regiões protegidas das interfaces do complexo heterodimérico PPAR/RXR foram analisados por experimentos de troca de hidrogênio por deutério, observada por espectroscopia de massa (H/D-Ex MS). Nos experimentos de H/D-Ex MS do complexo hPPAR γ /hRXR α , foram identificados 51 peptídeos para hPPAR γ , cobrindo 92% da sua sequência de aminoácidos. Além disso, através de medidas de diferentes tempos de incubação com deutério, verificamos que a cinética de incorporação de deutério é rápida e que entre 10 e 30 minutos de incubação não foi observada qualquer variação expressiva na incorporação.

As diferenças na incorporação de deutério entre o hPPAR γ , o complexo hPPAR γ /hRXR α e o complexo hPPAR γ /hRXR α na presença de seu elemento responsivo DR-1 foram analisadas e, como esperado, o monômero apresentou mais regiões flexíveis e maior

exposição ao solvente quando comparado aos complexos (Figura 28). O DBD expôs alto grau de troca de H/D, principalmente na região que compreende a primeira hélice (aa 123-143). Surpreendentemente, o *hinge* apresentou mais proteção do que o esperado, uma vez que essa região é justamente a responsável pela mobilidade entre os domínios. Porém, isso pode ser explicado pelo posicionamento próximo ao corpo de receptor, como revelado pelo modelo de SAXS. O LBD é com certeza a região mais estruturada e rígida do receptor, mostrando baixa troca de H/D (incorporação menos que 40%) e o núcleo principal do enovelamento (H1, H3, H5, H6 e H9) com alta proteção.

Figura 28 - Grau de deuteração do monômero de PPAR e de seus complexos com o RXR e com o DNA (DR-1). A porcentagem de deuteração está disposta em função da sequência de aminoácidos do PPAR, mostrando assim as características dinâmicas da proteína em solução. Cada bloco de três linhas representa uma preparação de amostra (PPAR monômero, complexo PPAR+RXR, na ausência e presença do DR-1) em três períodos de incubação com deutério (3, 10 e 30 minutos). A sequência foi colorida de acordo com a troca de H/D, sendo azul para 0-10%, verde para 11-30%, amarelo 31-50% e vermelho quando a troca era acima de 50%.

No geral, o heterodímero é mais protegido do que o monômero (Figura 28) e as regiões de proteções no DBD condizem com a interface de dimerização descrita para DBD e com o arranjo para a ligação em repetições diretas (DR-1) no DNA. O *hinge* é mais flexível, desordenado ou exposto ao solvente nos complexos, quando comparados ao PPAR sozinho, indicativo de regiões proteicas desordenadas, o que pode ser necessário para a interação entre

os domínios nos complexos. As principais diferenças entre o heterodímero PPAR/RXR e monômero PPAR estão localizadas no LBD. O núcleo do LBD (H1, H3, H5, H6) torna-se mais estruturado e compacto, com muitas áreas protegidas. A interface de dimerização tem um nível médio de incorporação de deutério (31% a 50%), a H7 está fortemente protegida e a H11 é mais acessível, indicando a assimetria desta interface, de acordo com o nosso modelo de SAXS para o hPPAR γ /hRXR α LBD (Figura 28 e 29).

Em conjunto com as análises de SAXS, que sugerem que o DBD do RXR e o LBD do PPAR estão afastados e incapazes de formar uma interface, este resultado representa uma evidência adicional de que a terceira interface não é formada em solução e na ausência de DNA, e o heterodímero hPPAR γ /hRXR α adota um estado intermediário, mais compacto do que o encontrado nas proteínas separadas, mas menos empacotado do que o complexo cristalográfico (hPPAR γ /hRXR α + DR-1).

A presença de DNA induz a uma conformação mais protegida do solvente ao complexo (Figura 29C), o que é mais consistente com a estrutura. Os DBDs e o *hinge* de ambas as subunidades dos heterodímeros tornam-se mais protegidas. Um exemplo, é uma região do *hinge* (resíduos 154-195), que exibe uma mobilidade menor, presumivelmente devido às suas possíveis interações com o DNA.

O núcleo do LBD é também significativamente mais protegido de solvente. Possui uma dinâmica de troca expressivamente mais baixa, em comparação com as outras amostras (com menos de 10% de incorporação de D₂O), principalmente em sua interface (H9 e H11). Isto pode indicar que a interface torna-se maior e mais assimétrica e, por conseguinte, o heterodímero ligado ao DNA parece ser mais compacto e mais estabilizado devido à adição de DNA.

Além das regiões protegidas pertencentes aos núcleos dos domínios, a região que compreende *loops* formados pelos resíduos 110-120 do DBD e 378-385 e 422-431 do LBD apresentaram maior proteção na troca de H/D. As análises da estrutura cristalográfica do complexo hPPAR γ /hRXR α intacto revelam que estas partes da estrutura tornam-se mais internalizadas na presença de DNA. Isto não acontece na ausência do mesmo, devido à conformação estendida do heterodímero. Estas observações são concordantes com a hipótese de que a presença do DNA desencadeia alguns rearranjos conformacionais do dímero hPPAR γ /hRXR α para um estado mais compacto.

Figura 29 - Modelos da estrutura do hPPAR γ DBD-LBD coloridos de acordo com os dados de H/D-Ex MS. As regiões protegidas e expostas ao solvente foram coloridas como indicativo do grau de deuteração, sendo azul para 0-10%, verde para 11-30%, amarelo 31-50% e vermelho quando a troca era acima de 50%. Dados das amostras de **A.** hPPAR γ ; **B.** hPPAR γ /hRXR α , com o quadro mostrando detalhes da interface de dimerização (H10-11) **C.** hPPAR γ /hRXR α +DR-1, com o quadro preto mostrando a interface de dimerização (H10 e H11) e o quadro laranja a terceira interface de dimerização (H7).

A terceira interface de heterodimerização também exibe uma maior proteção, em comparação com um complexo sem DNA, como pode ser visto na H7, por exemplo, assim como algumas outras partes do LBD ao redor desta interface (H6 e H3). Em conjunto, estes resultados sugerem que há um aumento da compacidade global e reorganização no complexo proteico quando o DNA é adicionado.

As diferenças observadas na incorporação de deutério entre as preparações refletem na flexibilidade dos complexos que se tornam mais estruturados na presença do DNA e/ou parceiro de heterodimerização, em comparação com o hPPAR γ sozinho.

5.3 Conclusão

A importância de se estudar o estado oligomérico de um receptor nuclear está no fato de sua ativação ser influenciada pela oligomerização. Para alcançar a ativação, a maioria dos membros dessa superfamília necessitam heterodimerizar com o RXR. Além disso, já foi visto que a forma homodimérica do TR recruta correpressores de maneira mais eficiente¹⁰³. Sendo assim, formas oligoméricas podem indicar um nível adicional de regulação da atividade do receptor.

As curvas de SAXS geradas para os PPARs em estudo e para seus complexos PPAR/RXR, assim como as funções de distribuição de distâncias e os modelos gerados mostram a diferença nos padrões de espalhamento, indicando que a proteína em todas as concentrações testadas apresenta apenas a forma monomérica e que na presença do hRXR α , ocorre a formação do complexo. Esses resultados mostram que diferente de outros membros da superfamília de receptores nucleares (RXR, TR, NGFI), que apresentam diversas formas oligoméricas, incluindo dímeros e tetrâmeros^{100;104-106}, o PPAR não forma oligômeros. Entretanto, é capaz de apresentar sua forma funcional ao heterodimerizar.

Embora a estrutura cristalográfica do complexo intacto de hPPAR γ /hRXR α seja conhecida, as alterações estruturais induzidas pela formação de heterodímero e os contatos com o DNA em solução não são bem compreendidos. A comparação de nossos modelos de SAXS com os de alta resolução revelou diferenças surpreendentes na organização do heterodímero em solução e no cristal. Os resultados de SAXS sugerem que o heterodímero hPPAR γ /hRXR α DBD-LBD é assimétrico e que adota uma conformação mais estendida e alongada quando comparada à estrutura cristalográfica. Este formato alongado é, em parte, induzido pela separação dos DBDs dos LBDs.

Os resultados dos experimentos de espectrometria de massas também revelaram diferenças entre o complexo hPPAR γ /hRXR α na ausência e na presença do DNA em termos de acessibilidade ao solvente. Nossos resultados indicaram que, na ausência de DNA, o complexo representa uma forma intermediária de compactação, que será estabilizada pela ligação ao DNA, que induzirá a formação da terceira interface de dimerização, verificada na estrutura cristalográfica²². Entretanto, a conformação estendida e mais compacta do complexo permanecem em um equilíbrio dinâmico.

Nossos estudos renderam uma maior compreensão de como ocorre a formação do heterodímero funcional PPAR/RXR e do comportamento do PPAR em solução. Com base em nossos resultados, nós propusemos um modelo de ativação do PPAR (Figura 30).

Figura 30 - Esquema representativo do mecanismo de heterodimerização e ligação ao DNA. Após a ativação, o PPAR recruta o RXR, formando um heterodímero intermediário, que possui os LBDs e os DBDs em uma conformação estendida. Com a ligação ao DNA, o heterodímero sofre alterações conformacionais, tornando-se mais compacto e menos exposto ao solvente.

De acordo com este modelo, quando o PPAR é ativado ele recruta o RXR, formando um heterodímero intermediário, menos flexível que o PPAR sozinho, mas com as superfícies relativamente abertas em comparação ao modelo cristalográfico. Os DBDs apresentam conformações estendidas, separadas dos LBDs, como revelado por nosso modelo SAXS. Após a ligação com o DNA, este heterodímero intermediário sofre alterações conformacionais adicionais causadas pelas interações entre os receptores e o DNA, tornando-se mais compacto, capaz de adotar uma conformação similar à revelada pelo modelo cristalográfico²². Assim, nossos dados confirmam que a ligação ao DNA pode induzir alterações significativas nas interações entre os domínios, que concordam com as previsões de que o DNA atua como um ligante alostérico, induzindo reorganizações generalizadas na conformação dos receptores¹⁰⁷.

CAPÍTULO 6

Resultados e Discussão

*Análises Estruturais e Funcionais
do hPPAR α LBD em Complexo
com o Ligante WY14643*

6 Análises Estruturais e Funcionais do hPPAR α LBD em Complexo com o Ligante WY14643

6.1 Introdução

O PPAR α está envolvido na mediação de numerosos efeitos fisiológicos em humanos, incluindo o metabolismo da glicose e de lipídeos. Por esse motivo, os seus ligantes efetivamente tratam dislipidemias e possuem significantes atividades anti-inflamatória e antiaterosclerótica. Esses efeitos e sua atividade dependente da ligação de ligantes fazem dos PPARs alvos certos no desenho de moléculas em diversas áreas terapêuticas.

Muitos ligantes sintéticos e naturais de PPAR têm sido identificados⁴⁴ e estruturas tridimensionais de ligantes ligados aos receptores têm fornecido fundamentos para uma melhor compreensão das bases estruturais envolvidas no modo de ativação do PPAR α ¹⁰⁸ e sobre as alterações conformacionais provocadas pela formação do complexo - incluindo a estabilização da região C-terminal, a H12 (AF-2). Além disso, proporcionam também o entendimento de como a ligação de pequenas moléculas no interior do receptor pode levar à heterodimerização com o RXR¹⁰⁹ e causar o recrutamento de coativadores, promovendo a transcrição gênica^{37;59}.

Os determinantes que influenciam na afinidade de ligantes do PPAR α ainda não foram esclarecidos e muitas moléculas da classe dos fibratos, que são os conhecidos agonistas do PPAR α , são usadas atualmente no tratamento de dislipidemia e hipertrigliceridemia¹¹⁰, ou em combinação com outros fármacos utilizados em terapias anti-diabéticas¹¹¹. Estes, no entanto, só exibem afinidades fracas para o PPAR α e, por isso, há um crescente interesse em novos fibratos ou de seus análogos que possuam uma potência aumentada e maior seletividade para o isotipo α do PPAR. O ácido pirinixico (também conhecido como WY14643), é um análogo de fibrato, que foi utilizado como um agente anti-hipercolesterolêmico¹¹² e responsável por promover a proliferação de peroxissomos¹¹³. Essa molécula é um potente e seletivo ligante de PPAR α ¹¹⁴. Apesar do seu amplo uso como uma ferramenta de pesquisa para estudos que envolvem o PPAR α , o seu modo de ligação e ativação, incluindo os fatores responsáveis pela seletividade, não foram ainda resolvidos.

Além das funções no metabolismo lipídico, o PPAR α também regula respostas inflamatórias¹¹⁵⁻¹¹⁶. Os ligantes desse receptor exibem propriedades anti-inflamatórias em aterogênese e hepatite¹¹⁷. No tecido ocular, a inflamação crônica, resultante de lesão e/ou

infecção do epitélio da córnea, pode derivar em perda da transparência do tecido, comprometendo assim a visão¹¹⁸. Até o presente, não houve qualquer avaliação dos efeitos de ligantes de PPAR α em modelos de inflamação da córnea. Apenas alguns estudos mostraram que o WY14643 pode ser um agente pró-inflamatório, ao invés de anti-inflamatório e, portanto, com restrição à aplicação terapêutica em oftalmologia¹¹⁹. Entretanto, análises adicionais são necessárias para discernir a viabilidade dos agonistas de PPAR α como agentes anti-inflamatórios oftalmológicos.

6.2 Resultados e discussão

6.2.1 Cristalografia

6.2.1.1 Ensaios de cristalização

Ensaios de cristalização conduzidos com a proteína hPPAR α LBD complexada a diferentes ligantes foram realizados inicialmente com conjuntos comerciais de soluções de cristalização. A observação das placas de cristalização, após 2-3 dias, indicou o aparecimento de aglomerados de agulhas e pequenos cristais em várias condições testadas e para vários complexos proteína:ligante diferentes.

As condições que mais apresentavam indícios de formação de cristais dos complexos eram aquelas que continham Tris-HCl como tampão em pHs que variavam de 6,5 a 7,5 e PEG como agente precipitante. Inicialmente foram obtidas agulhas e cristais muito pequenos ou deformados em certas condições. A otimização dessas condições resultou na formação de cristais maiores e morfologicamente mais regulares do complexo hPPAR α LBD+WY14643 (Figura 31).

A condição na qual os cristais do complexo foram obtidos é composta por: 100 mM Tris-HCl pH 7,5 e 25% PEG 20000. O ligante escolhido é um composto análogo ao clorofibrato, da classe dos fibratos, que compreendem os fármacos mais utilizados no tratamento de hipertrigliceridemia e na prevenção de aterosclerose, além disso são moléculas descritas como agonistas de PPAR α ^{114;120}.

Figura 31 - Cristais obtidos do receptor hPPAR α complexado ao ligante WY14643 através da técnica de difusão à vapor e sob a condição composta por 100 mM Tris-HCl pH 7,5 e 25% PEG 20000. Esses cristais foram submetidos aos experimentos de difração de raios-X para posterior obtenção do modelo de alta resolução da estrutura do receptor.

6.2.1.2 Coleta e processamento de dados de difração de raios-X

Para a coleta de dados, os cristais e as agulhas foram imersos em solução crioprotetora contendo 15% (v/v) de etileno glicol adicionada à solução do reservatório. Seguidamente, os mesmos foram resfriados diretamente no vapor de nitrogênio líquido a 100 K, sendo mantidos nessa temperatura durante toda a coleta. Para todos os cristais dos complexos citados acima foram obtidos padrões de difração que apresentavam rede cristalina única e imagens bem definidas resultantes do espalhamento de raios-X.

Após a coleta, indexação, integração e escalonamento das imagens de difração, foram obtidos os parâmetros estatísticos desses processos, que estão listados na Tabela 6.

O número de moléculas constituintes da unidade assimétrica foi estimado considerando a massa molecular do LBD do PPAR α como sendo aproximadamente 31 kDa. Isso resultou na presença de duas moléculas para o complexo com WY14643 e o conteúdo de solvente no cristal de 56%.

Para o conjunto de dados do complexo hPPAR α LBD+WY14643 o programa *phenix.xtriage*⁹⁰ identificou a presença de *twinning*. Isso é resultado do processo de formação do cristal que, durante o seu crescimento, alguns núcleos podem começar a crescer simultaneamente em orientações completamente diferentes, de maneira dirigida, mas que viola a simetria do cristal. O produto é um espécime que é composto por dois ou mais “domínios” cristalinos, com a orientação de cada um diferindo de maneira especial¹²¹. O operador de *twinning* identificado foi k, h, -l e a porcentagem de 36%.

As moléculas de água foram introduzidas nos últimos passos de refinamento, através do *phenix.refine*⁹⁰, sob critérios de distância mínima e máxima de 1,8 e 3,2 Å, fator de

temperatura menor que 50 Å² e em mapa de densidade eletrônica com nível de contorno de 3 σ no mapa diferença, além disso, essas moléculas introduzidas foram inspecionadas visualmente no programa COOT⁹².

Tabela 6 - Parâmetros e estatísticas da coleta, processamento e refinamento dos dados cristalográficos do hPPAR α LBD complexado ao ligante WY14643.

Parâmetros	hPPAR α LBD +WY14643
Grupo espacial	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Moléculas de proteína na unidade assimétrica	2
Parâmetros da célula unitária	
<i>a</i> (Å)	62,39
<i>b</i> (Å)	62,68
<i>c</i> (Å)	180,05
Intervalo de resolução (Å)	36,56-2,51 (2,65-2,51)
Número de imagens	370
$\Delta\phi$ (°)	0,25
Mosaicidade (°)	0,66
Número de reflexões únicas	22365
Redundância	3,6 (3,5)
Completeza (%)	89,9 (98,7)
$R_{merge}^{\dagger}$	0,104 (0,497)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	7,7 (2,1)
$R_{factor}^{\S}$ (%)	17,31
$R_{free}^{\S}$ (%)	21,57
B-fatores (Å²) (n° moléculas)	
Proteína (2)	47,11
Ligante (4)	48,57
Água (79)	37,02
RMSD do ideal	
Comprimento das ligações (Å)	0,011
Ângulo das ligações (°)	1,350
Ramachandran outliers	0
PDB ID	4BCR

[†] $R_{merge} = \sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle|$, onde $I_i(hkl)$ é a intensidade observada para $I(hkl)$ e $\langle I(hkl) \rangle$ é a média das intensidades. Entre parênteses os valores referentes a camada mais externa de resolução.

[§] $R_{factor}/R_{free} = \sum_{hkl} |F_{obs} - F_{calc}| / \sum_{hkl} |F_{obs}|$ onde F_{obs} e F_{calc} são os fatores de estrutura observados e calculados; 5% das reflexões foram incluídas nos testes de ajuste para o cálculo do R_{free} .

O refinamento foi dado como encerrado quando não foi mais possível a melhora dos índices R_{factor} e R_{free} (Tabela 6). O modelo final consiste em: 2 cadeias polipeptídicas do LBD do PPAR α , 4 moléculas de WY14643, 79 moléculas de água e duas moléculas de etileno glicol (adicionadas na amostra através da solução crioprotetora) (Figura 32).

Figura 32 - Modelo de alta resolução do complexo hPPAR α LBD+WY14643 obtido através de experimentos de difração de raios-X. A figura apresenta as duas moléculas de proteína, cada uma ligada a duas moléculas de ligante, uma molécula de etileno glicol e moléculas de água, representando o conteúdo da unidade assimétrica designada para o cristal. As duas moléculas proteicas estão representadas em ciano, porém com diferentes tonalidades e o mesmo padrão assinala em rosa as moléculas de ligante, laranja o etileno glicol e em azul moléculas de água.

O enovelamento das cadeias polipeptídicas é globular, característico do observado para o LBD dos membros da superfamília de receptores nucleares, constituído por 12 α -hélices e uma pequena folha composta por 3 fitas- β .

As validações dos modelos estruturais foram realizadas com a ferramenta MolProbity⁹³, cujos diagramas construídos demonstraram a qualidade dos modelos finais das estruturas sendo: 98% dos resíduos na regiões favoráveis do Ramachandran e nenhum resíduo em regiões não permitidas.

6.2.2 Análise do modelo cristalográfico do complexo hPPAR α LBD+WY14643 com o auxílio de ensaios funcionais

Para esse conjunto de dados foram encontradas duas cadeias de PPAR α LBD na unidade assimétrica com o enovelamento e posições dos ligantes idênticos, por essa razão, a discussão será em função de apenas uma das cadeias do modelo cristalográfico. Durante o

refinamento da estrutura, a densidade eletrônica encontrada no interior do sítio de ligação foi interpretada como uma molécula de WY14643. Em outra região da proteína foi observada uma segunda densidade também capaz de acomodar uma molécula do ligante (Figura 33), região esta denominada neste trabalho como o segundo sítio e que não foi encontrada em nenhuma outra estrutura do hPPAR α LBD depositada no PDB.

Figura 33 - Estrutura do hPPAR α LBD ligada a duas moléculas de WY14643. **A.** LBD do receptor indicando a região do primeiro e segundo sítio. **B.** Detalhes das interações no primeiro sítio, com destaque ao resíduo Tyr464 da H12. **C.** Interações do ligante no segundo sítio. Representado em tracejado preto as ligações de hidrogênio e em círculos pontilhados resíduos envolvidos nas interações hidrofóbicas.

A interação do ligante no sítio ativo é estabilizada com base em interações polares e contatos hidrofóbicos. Os resíduos S280 (H3), Y314 (H5), H440 (H11) e Y464 (H12) formam uma organizada rede de ligações de hidrogênio com a cabeça polar do ligante (Figura 33B). Em adição as interações do ácido carboxílico do ligante com os resíduos da parte superior do bolsão de ligação do PPAR α , o WY14643 também faz muitas interações hidrofóbicas com a região inferior do bolsão (Figura 33B), envolvendo os resíduos C276, T279, I317 e M330. Como já identificado para outros agonistas¹²², a ligação de hidrogênio envolvendo a Y464 é muito importante para a manutenção da proteína na conformação ativa, pois esse resíduo está

localizado na H12 e a configuração fechada dessa hélice é crucial para a regulação do recrutamento de coativadores¹²³.

A região ocupada pelo segundo ligante fica entre a H2' e H3, próxima ao Ω -loop, uma região bastante flexível desse domínio e a presença do ligante estabiliza essa região da estrutura proteica. Diferentemente do ligante no sítio ativo, o segundo ligante é estabilizado basicamente por interações hidrofóbicas com a participação dos anéis heterocíclicos do ligante e dos resíduos I241, L247 (H2'), V255, I263, R271 (H3), I272 (H3), H274 (H3) e C275 (H3). Outra contribuição para a estabilização do ligante nessa região inédita da proteína são as pontes salinas: i. entre o nitrogênio da região central do ligante e o resíduo E251 (H2') e ii. entre o grupo carboxílico do ligante e os resíduos K266 (Ω -loop), H274 (H3) e D453 (loop H11-H12), formando assim uma rede de pontes salinas, conectando simultaneamente o Ω -loop, a H3 e o loop H11-H12. (Figura 33C). Esses resíduos básicos também interagem entre si.

6.2.2.1 Análise da seletividade do WY14643 pelo isotipo α do PPAR

Como se trata de um ligante utilizado exclusivamente para o PPAR α , a estrutura cristalográfica foi analisada em detalhes para se verificar como o ligante em questão poderia gerar tal seletividade a esse isotipo do receptor. Para confirmar essa seletividade foram realizados ensaios de transativação, que mostraram maior potência para o PPAR α (Figura 34A), que pode ser interpretada através dos valores de EC₅₀ obtidos: 6,73 μ M para o PPAR α ; 26 mM para o PPAR β e 17 mM para o PPAR γ . Para esses dois últimos a afinidade foi muito baixa, com curvas que não apresentavam platô nem mesmo em altas concentrações e, portanto, os valores de EC₅₀ podem ser ambíguos.

Para verificar as diferenças estruturais que justificassem a seletividade do ligante WY14643 pelo subtipo α , foi realizado um alinhamento estrutural do modelo da estrutura hPPAR α LBD+WY14643 com estruturas do PDB dos diferentes subtipos β e γ , (PDBs 3ET2 e 3ET0, respectivamente)¹²⁴ (Figura 34B). Entre os resíduos envolvidos em interações com o ligante, verificou-se que não está presente o resíduo Y314 no PPAR β e no PPAR γ , que é substituído por um resíduo de H287 e H323, respectivamente. O fato desse resíduo interagir com o ligante pode indicar que ele seja o responsável pela seletividade. Para o PPAR β e PPAR γ , o WY14643 teria que se acomodar de maneira diferente dentro do sítio ativo para interagir com os resíduos de histidina, pois na mesma posição ocupada no α , o ligante não

estaria próximo o suficiente para fazer tal interação com as histidinas e a perda de interações reflete na diminuição da potência do ligante (maior valor de EC₅₀). Esse resíduo já foi descrito como um dos motivos da seletividade para outros ligantes⁵¹.

Figura 34 - Análise da seletividade do ligante WY14643 frente aos três subtipos de PPAR. **A.** Curva dose-resposta do ligante WY14643 comparando as atividades relativas da luciferase dos três receptores. **B.** Sobreposição das estruturas cristalográficas, destacando o resíduo de Y314 do hPPAR α LBD+WY14643 em ciano, H287 do hPPAR β LBD (PDB 3ET2) em alaranjado e H323 do hPPAR γ LBD (PDB 3ET0) em verde. WY14643 em magenta. RMSD entre PPAR α e β : 0,546 Å; RMSD entre PPAR α e γ : 0,655 Å.

O fato de um único aminoácido justificar a seletividade do ligante é curioso. Todavia, algumas outras características do sítio de ligação dos PPARs também precisam ser consideradas, como é o caso da diferença observada na topologia desses bolsões. O PPAR α e γ possuem cavidades significativamente mais largas do que o PPAR β , que possui um estreitamento próximo a H12. O bolsão do PPAR α é mais lipofílico e menos exposto ao solvente⁵¹.

O papel da α Y314 na seletividade é corroborado por estudos de *Structure Activity Relationship* (SAR), que demonstraram que os resíduos aromáticos volumosos ligados à posição- α do grupo carboxílico do WY14643 reduz a seletividade ao PPAR α e aumenta a ligação ao PPAR γ ¹²⁵. A preferência de ligação ao PPAR γ de compostos volumosos também pode ser similarmente explicada pela substituição dos resíduos citados (α Y314 - γ H323), pois a tirosina do PPAR α ocupa mais espaço, prejudicando assim o alojamento de substituintes grandes. Os ligantes menores, contudo, são capazes de formar interações mais fortes com o receptor PPAR α do que com o PPAR γ . Contudo, verificou-se que assim como outros agonistas, a seletividade desse ligante é gerada pela substituição Y314H e pequenas mudanças na posição do ligante dentro dos diferentes formatos e características inerentes dos bolsões.

Quanto ao segundo sítio, a análise sobre as diferenças estruturais entre os subtipos não nos forneceu muitas informações. Os principais resíduos que interagem com o segundo ligante foram observados nas três proteínas, como é o caso do E251, o único resíduo que participa de uma interação polar com o ligante, está presente no PPAR α , β e γ , além disso se trata de uma região bastante móvel formada por *loops* que poderiam adotar diferentes conformações, se necessário, para acomodar o segundo ligante.

6.2.2.2 Funcionalidade do segundo sítio de ligação

A presença da segunda molécula de ligante, ligada a uma região inesperada no hPPAR α LBD, levanta questões sobre a funcionalidade desse segundo sítio de ligação: a segunda molécula serve somente para estabilizar a proteína na forma cristalina? Ou é necessária para que a proteína alcance a conformação mais ativa? Uma indicação da funcionalidade do segundo sítio é que o ligante, nessa posição, ocupa uma região semelhante à ocupada por outros ligantes sintéticos de alta afinidade pelo hPPAR α ^{51;122;126-132} (Figura 35A). Essa mesma região é descrita para o PPAR γ pela ocupação por agonistas parciais, ligantes que não interagem com a H12, entretanto são capazes de promover uma ativação parcial comparada a de agonistas totais (Figura 35B)¹³³⁻¹³⁴.

Figura 35 - Regiões ocupadas pelo segundo ligante WY14643. **A.** Alinhamento de todas as estruturas do hPPAR α LBD depositadas no PDB. Todos os ligantes presentes no sítio ativo da proteína (esferas azuis) ocupam a região do primeiro ligante e parte da região do segundo ligante (região indicada pela seta preta). **B.** Alinhamento de algumas estruturas do hPPAR γ LBD complexadas a agonistas parciais, região representada por esferas verdes, e que coincide com parte da região ocupada pelo segundo ligante WY14643 (região indicada pela seta vermelha).

Para examinar a função da segunda molécula ligada ao receptor, foram realizadas mutações sítio dirigidas de resíduos que interagiam somente com ela, com a intenção de dificultar a ligação do ligante nessa região, mas não a ligação no sítio ativo. Os mutantes escolhidos foram: E251A, para impedir a formação da ligação polar e uma dupla mutação V255A/I263A (Figura 36B), que são os resíduos mais envolvidos na estabilização do ligante por interações hidrofóbicas.

Após as mutações serem checadas por sequenciamento, os experimentos de transativação foram iniciados para verificar a influência das mutações na atividade dos receptores. Os ensaios foram feitos com o WY14643 e com outro ligante: o GW7647. Esse último foi utilizado como um controle da funcionalidade da proteína, pois além de possuir alta afinidade espera-se que interaja somente com o sítio ativo.

Com a titulação dos ligantes WY14643 e GW7647 foram obtidas curvas dose-resposta para a proteína nativa e mutante V255A/I263A que permitiram a avaliação da atividade proteica e o cálculo dos valores de EC_{50} (Tabela 7). O mutante E251A levou à completa perda de atividade para os dois ligantes testados. Como não foi obtido nenhum resultado positivo para os dois ligantes, não foi possível garantir que o clone do mutante E251A estivesse funcional, porém isso poderia ser um indício da importância do segundo sítio, uma vez que todas as mutações foram empregadas em *loops* e regiões que não deveriam causar o enovelamento incorreto da proteína ao ponto de modificar drasticamente sua estabilidade.

Tabela 7 - Valores de EC_{50} obtidos para o PPAR α e seus mutantes dos ligantes WY14643 e GW7647, calculados através das curvas dose-resposta.

Clone	EC_{50} (M) – WY14643	EC_{50} (M) – GW7647
Nativo	$5,38 \times 10^{-6}$	$8,13 \times 10^{-8}$
E251A	-	-
V255A/I263A	$\sim 0,73$ (ambíguo)	$5,27 \times 10^{-8}$

O mutante V255A/I263A apresentou resultados que podem contribuir na determinação da funcionalidade do segundo sítio. Para o ligante WY14643, a mutação modificou a sua ativação que ocorreu somente em maiores doses e, devido à ausência de platô na curva, não foi possível o cálculo correto do valor de EC_{50} . Para o ligante GW7647 o ensaio apresentou praticamente o mesmo valor de EC_{50} , mostrando que a proteína estava ativa (Figura 36).

Figura 36 - Análise da atividade do hPPAR α nativo e do mutante V255A/I263A na presença de WY14643. **A.** Curva dose-resposta do receptor nativo hPPAR α (em ciano) e de seu mutante V255A/I263A (em vermelho) através da titulação do ligante WY14643 e **B.** Ilustração do segundo sítio e em destaque os resíduos modificados através de mutações sítio dirigidas.

Através desses dados podemos constatar que a mutação dificultou somente a ligação do segundo ligante WY14643 e que este pode ser importante para a ativação completa do receptor, ou seja, que o segundo sítio possa ser funcional.

6.2.3 A segunda molécula de WY14643 promove a estabilização da região AF-2

A funcionalidade desse segundo ligante pode estar envolvida nos mesmos mecanismos de ativação de agonistas parciais que exercem sua função através da estabilização da conformação fechada da H12 mesmo sem contatos diretos¹³³. Isso ocorre devido à interação na região próxima a essa hélice induzindo mudanças conformacionais em resíduos importantes ao redor da mesma, diminuindo a dinâmica da estrutura, o que estabiliza a interação com coativadores¹³⁵. Fatores que estabilizam a H12 usualmente reduzem a taxa de dissociação do ligante¹³⁶. Mesmo possuindo um ligante interagindo diretamente com a hélice 12, a interação na segunda região estabiliza, de maneira mais efetiva, a conformação da proteína mais propícia a interações com os elementos transcrpcionais.

Além disso, interações adicionais na região próxima à H12 foram verificadas no modelo cristalográfico, envolvendo a formação de pontes salinas entre os resíduos H274 (H3) e K266 (Ω -loop) e o grupo carboxilato da segunda molécula de WY14643. Esses resíduos também estão próximos ao D453 (loop H11/H12) podendo assim estabelecer interações. Portanto, as interações formadas por esse conjunto de resíduos carregados pode ser

importante para a atividade da proteína, uma vez que diferenças no empacotamento do Ω -loop e do loop H11/H12 afetam diretamente a dinâmica da H12.

Para testar essa hipótese, foram realizadas algumas simulações de dinâmica molecular pelo Prof. Dr. Munir Skaf e seus alunos Paulo C. T. Souza e Dra. Clarisse G. Ricci do Instituto de Química da UNICAMP. As simulações foram realizadas com a proteína complexada a um e dois ligantes separadamente, pois se as interações geradas pela segunda molécula de WY14643 fossem importantes, mudanças na mobilidade e/ou estabilidade da estrutura do hPPAR α LBD seriam observadas.

A análise do alinhamento de *snapshots* extraídos da simulação e dos RMSF correspondentes mostra a mobilidade do hPPAR α LBD (Figura 37). Esses resultados indicam que a presença de uma molécula extra no segundo sítio de ligação estabiliza fortemente a região do Ω -loop e do loop entre as H2 e H2' (Figura 37A) quando comparada à proteína na presença de somente uma molécula de ligante no sítio ativo (Figura 37B).

Figura 37 - Influência da segunda molécula de WY14643 na mobilidade da cadeia principal do hPPAR α LBD. As mobilidades são mostradas como *snapshots* alinhados e derivados das trajetórias da dinâmica molecular. A coloração segue uma escala em que: azul = baixa mobilidade ($\text{RMSF} \leq 0,5 \text{ \AA}$); verde mobilidade intermediária ($\text{RMSF} \leq 1,75 \text{ \AA}$); e vermelho = alta mobilidade ($\text{RMSF} \leq 3,0 \text{ \AA}$). Esses resultados sugerem que o receptor é estabilizado pela presença de um ligante extra no segundo sítio **A**, quando comparado ao receptor na presença de um único ligante **B**. As maiores diferenças podem ser observadas na região do Ω -loop, no loop H2/H2' e na H12.

Além do Ω -loop e do loop H2/H2', a H12 apresentou maior estabilização na presença do segundo ligante, tal como indicado pela distribuição de RMSD na Figura 38, que é um

pouco mais estreito e deslocado para valores menores na presença de dois ligantes. As parcelas bidimensionais de valores de RMSD da H12 contra o RMSD do Ω -loop e loop H2/H2' (Figura 38B), indicam que a mobilidade da H12 está diretamente correlacionada à mobilidade das duas outras regiões citadas. Não foram observadas alterações significativas na estrutura ou na dinâmica de outras regiões do hPPAR α LBD, apoiando a ideia de que o segundo ligante WY14643 fortemente estabiliza o Ω -loop e o loop H2/H2' e indiretamente promovendo uma estabilização mais sutil da H12.

Figura 38 - Mobilidades da H12, Ω -loop e loop H2/H2' computadas através de trajetórias essenciais. **A.** Distribuição RMSD da H12 computada considerando a sua estrutura média, que mostra sua baixa mobilidade na presença de dois ligantes (azul) quando comparada na presença de apenas um ligante (vermelho). **B.** RMSD da H12 graficado em função do Ω -loop e do loop H2/H2', através dos cálculos das trajetórias essenciais.

Observando a Figura 38, podemos conferir que há uma correlação linear positiva entre as mobilidades destas regiões, tal como confirmado pelos coeficientes de correlação (R) resultante da análise de regressão linear. Estes coeficientes sistematicamente aumentam na presença de dois ligantes, em comparação com apenas um ligante. Não existe uma correlação evidente entre o Ω -loop e o loop H2/H2', na presença de um ligante só ($R = 0,24$), mas eles parecem tornar-se ligeiramente correlacionados com a presença do segundo ligante ($R = 0,55$) (não mostrado).

Os dados de dinâmica molecular também mostraram que a estabilização da região citada é também causada pelas interações adicionais entre os resíduos carregados H274 (H3), K266 (Ω -loop) e D453 (loop H11-H12), que por formar interações carregadas diretamente com ligante promovem uma estabilização adicional da região na presença da segunda molécula de WY14643.

6.2.4 Ensaios de duplo-híbrido em células de mamíferos para análise de interações proteína:coativador/correpressor

Os ensaios de duplo-híbrido foram utilizados com o desígnio de analisar interações proteicas, principalmente dos PPAR com seus coativadores e correpressores, além de checar a heterodimerização com o RXR no ambiente celular.

Inicialmente foi testada a interação dos três subtipos de PPAR com o coativador SRC-1 (Figura 39A), utilizando apenas uma concentração de um ligante específico para cada subtipo. Para o PPAR α foi usado 10 μ M de GW7647, para o PPAR β 10 μ M de GW0742 e para o PPAR γ 10 μ M de Rosiglitazona.

Quando havia interação entre o receptor e seu correpressor, ocorria um aumento na luminescência. Desta maneira, para o coativador SRC-1 verificou-se que o PPAR α e o PPAR γ eram capazes de complexar a ele, apresentando 3,5 vezes de ativação, aproximadamente. Entretanto, o PPAR β não apresentou diferença de ativação após a adição de ligante (Figura 39A), o que pode indicar a falta de interação, como foi constatado também por experimentos de fluorescência realizados em nosso grupo (dados não mostrados), ou o sinal era muito baixo, impossibilitando a aferição pelo equipamento utilizado.

Figura 39 - Análise das interações dos PPARs. Interação com **A.** coativador SRC-1; e com **B.** RXR, provocadas após a adição dos ligantes. Resultados obtidos com a técnica de duplo-híbrido em células de mamíferos. Os valores no eixo y são apresentados como vezes de ativação, ou seja, o controle sem o ligante é uma vez e o valor obtido de luminescência com o ligante é dividido pelo valor de luminescência do controle. Em ciano o PPAR α , em alaranjado o PPAR β e em verde o PPAR γ .

Outras interações testadas incluíram a formação do complexo PPARs + RXR, (Figura 39B). O sinal do PPAR γ é bastante expressivo (quase 20 vezes), ficando difícil visualizar a

ativação dos outros no gráfico apresentado, mas eles apresentaram no mínimo 2 vezes de ativação, o que já indica interação.

Outra metodologia utilizada foi para verificar a ligação do coativador e o desligamento do correpressor através da titulação de um ligante específico. Para isso, foi utilizado o PPAR α , titulação do ligante WY14643 e possível interação com o GRIP-1 e desligamento do NCOR-1 (Figura 40).

Figura 40 - Análise das interações entre o PPAR α com GRIP-1 e NCOR-1, geradas após a titulação do ligante. Resultados obtidos com a técnica de duplo-híbrido em células de mamíferos. Os valores no eixo y são apresentados como valores de luminescência obtidos.

Através da curva de titulação do ligante foi constatado que na mesma concentração em que a ligação do receptor com o coativador é detectada, também verifica-se o desligamento do correpressor.

Esta técnica, apesar de apresentar um sinal inferior ao observado para os ensaios de transativação, proporciona uma maneira prática de analisar interações entre proteínas e, por se tratar de proteínas humanas, o ambiente é ainda mais propício.

6.2.5 Ensaios funcionais verificaram a atividade anti-inflamatória do WY14643

Experimentos com células humanas da córnea foram realizados para verificar a atividade anti-inflamatória do ligante WY14643, tendo como alvo o hPPAR α LBD. Esses experimentos foram realizados em colaboração com o Dr. Peter Reinach e sua aluna Dra. Nili Parekh do *Department of Biological Sciences, College of Optometry, State University of New York, NY – EUA*.

Inicialmente, foi checada a expressão do PPAR α nas células de interesse, no caso as células humanas da córnea (HCEC), através do uso de anticorpos específicos. Primeiramente, foi aplicado o anticorpo anti-PPAR α policlonal IgG, seguido do anti-PPAR α anti-IgG-TR e coloração com o corante SYTO®16. Esses ensaios de imunohistoquímica validaram a utilização da linhagem celular, pois possibilitou a visualização da distribuição e localização da proteína em questão. O receptor PPAR α apresentou alta expressão no núcleo das células, como o esperado (Figura 41A).

Figura 41 - Experimentos de imunohistoquímica. **A.** Esses experimentos confirmaram a presença da expressão do PPAR α nas células HCEC, principalmente na região referente ao núcleo celular, como esperado. **B.** Mudanças na expressão das citocinas IL-6 e IL-8 induzidas pela modulação da atividade do PPAR α através da adição do ligante WY14643, sob condições hipertônicas (450 mOsm).

Com o objetivo de averiguar os efeitos anti-inflamatórios do ligante WY14643, mediados pela interação com o PPAR α , utilizamos experimentos capazes de identificar mudanças na expressão das citocinas IL-6 e IL-8. Para ocorrer maior expressão das citosinas citadas e caracterizar um efeito inflamatório, as HCEC foram então submetidas à condições hipertônicas (450 mOsm). Esse modelo simula a exposição às lágrimas hipertônicas, que são encontradas em alguns tipos de doenças oculares, como a doença do olho seco. Os indivíduos com essa doença apresentam elevada expressão de citocinas como biomarcadores do processo inflamatório (IL-6 e IL-8)¹³⁷, que contribuem então para a inflamação ocular.

O tratamento com o ligante WY14643 diminuiu consideravelmente os níveis de expressão de citocinas nas HCEC sob o *stress* causado pelo meio hipertônico (Figura 41B). Dessa maneira podemos considerar o efeito anti-inflamatório do ligante WY14643, mediado por sua interação com o receptor PPAR α e, conseqüentemente, considerar sua utilização no tratamento de doenças oculares inflamatórias.

6.3 Conclusão

O ligante WY14643 é frequentemente utilizado como um controle positivo da ativação PPAR α . No entanto, os elementos moleculares envolvidos no reconhecimento do ligante pelo PPAR α não eram ainda conhecidos. Nesse trabalho, nós relatamos a estrutura do hPPAR α LBD em complexo com o WY14643, mostrando que este agonista seletivo apresenta a ligação em um sítio inédito da proteína, o que acarreta um melhoramento de sua potência de ativação do PPAR α . Estes resultados podem contribuir para o desenho de novos fármacos mais eficazes.

A estrutura cristalina do PPAR α complexado ao WY14643 sugere que este análogo de fibrato induz a ativação deste receptor nuclear por meio de um mecanismo não convencional e bipartido, envolvendo tanto à estabilização direta da H12 como um modo alternativo de estabilização da estrutura proteica, que requer um segundo ligante complexado. O primeiro ligante interage diretamente com a H12, tal como muitos outros agonistas de PPAR, formando interações semelhantes com os resíduos polares, que são importantes para a estabilização da maioria dos ligantes descritos para esta proteína alvo. Estas interações incluem uma ligação de hidrogênio com um resíduo localizado na AF-2, promovendo a estabilização da conformação ativa da proteína. Esta configuração do complexo também proporciona uma estabilização adicional da cauda hidrófoba do ligante por resíduos não polares na região interna do sítio ativo.

A observação da sobreposição das estruturas dos três subtipos de PPAR forneceu uma explicação para o fato de que o WY14643 preferencialmente ativa o PPAR α . A substituição de um único resíduo da proteína em conjunto com as características inerentes de bolsão de ligação podem modular a seletividade dos ligantes, como observado anteriormente^{138; 139}.

O refinamento do modelo cristalográfico também identificou outra molécula WY14643 ligada à proteína. A importância deste segundo sítio de ligação foi confirmada com base em uma combinação de ensaios de mutagênese dirigida e de simulações de dinâmica

molecular. Através das simulações de dinâmica molecular, verificou-se que a segunda molécula de ligante estabiliza, de maneira efetiva, regiões da proteína próximas a H12, incluindo o Ω -loop, o loop H11/H12 e o loop H2/H2'. Assim, sugerimos que este sítio de ligação pode atuar como um modulador da atividade do PPAR α através da estabilização de regiões importantes da proteína, previamente implicadas nas ações de agonistas parciais e de modificação pós-traducional do PPAR γ ¹⁴⁰.

Estudos futuros poderão ser realizados para refinar a identidade das regiões do LBD que necessitam ser estabilizadas, a fim de otimizar ainda mais a afinidade de ligação e ativação dos PPARs.

Os ensaios de duplo-híbrido mostraram eficiência na verificação de interações entre proteínas, o que os torna uma ferramenta poderosa para o estudo de receptores nucleares, pois os agonistas induzem o recrutamento de coativadores e dessa maneira é possível verificar se um determinado composto pode ser classificado como um ligante de PPAR. E também verificar heterodimerização com outros receptores nucleares que podem indicar diferentes mecanismos de regulação das funções controladas por eles.

Uma vez que demonstramos que o WY14643 pode exibir atividade anti-inflamatória mediada pelo PPAR α , em pelo menos um contexto e, portanto, poderá ser uma alternativa viável para reduzir a inflamação na doença do olho seco.

Com base nos métodos acima mencionados, sugerimos que a ligação de uma molécula de WY14643, no segundo sítio de ligação, desempenha um papel crítico na manutenção da atividade funcional o PPAR α . Além disso, este modo único de ligação proporciona um novo modo de reconhecimento do ligante e bases estruturais para o desenho de agonistas, com melhoria na afinidade de ligação e também em sua seletividade para um determinado alvo.

CAPÍTULO 7

Resultados e Discussão

*Mecanismos Moleculares Envolvidos
na Ativação do hPPAR α LBD
por seus Ligantes Naturais*

7 Mecanismos Moleculares Envolvidos na Ativação do hPPAR α LBD por seus Ligantes Naturais

7.1 Introdução

Os ácidos graxos e seus derivados são metabólitos celulares essenciais, cuja concentração intracelular deve ser cuidadosamente regulada, pois níveis alterados dessas moléculas estão associados com a obesidade, aterosclerose, hipertensão e diabetes. Isto implica que os circuitos de regulação existentes devem ser capazes de detectar mudanças nos níveis dessas moléculas. Nesse contexto, o PPAR α é funcional na regulação da homeostase de lipídeos e é transcricionalmente ativado por uma grande variedade de ácidos graxos e seus derivados, sendo considerado, então, um sensor molecular no desenvolvimento e tratamento dessas desordens¹⁴¹. Porém, ainda não se sabe de que maneira estes compostos, estruturalmente diversos, podem ativar os três isotipos de PPAR. Além disso, os ácidos graxos diferem bastante na afinidade de ligação aos diferentes isotipos e as estruturas tridimensionais dos receptores complexados a eles podem gerar mais entendimentos das bases estruturais e modo de ação dos agonistas naturais.

O que se sabe é que as distintas ações dos moduladores dependem do contexto celular¹⁴² e das distintas conformações adotadas pelos receptores e, conseqüentemente, das diferentes interações gênicas¹⁴³. Dessa maneira, os ácidos graxos podem ser considerados moduladores seletivos, uma vez que a interação com os receptores não resultam, necessariamente, em uma ativação procedida de transcrição dos genes alvos¹⁴¹.

Essas considerações levantam a questão de que alterações dos tipos de ácidos graxos presentes nos tecidos podem alterar a atividade dos PPARs e, assim, os genes que controlam os seus efeitos terapêuticos benéficos, resultantes da ativação desses receptores. O conteúdo de ácidos graxos nos tecidos é dependente da dieta dos indivíduos e, já foi descrito que, dietas ricas em ácidos graxos poliinsaturados ômega-3, docosahexaenóico e eicoapentaenóico garantem uma baixa incidência de câncer¹⁴⁴. Essas dietas também proporcionaram um sucesso modesto no tratamento de câncer avançado em humanos¹⁴⁵ e têm sido amplamente utilizadas na inibição de carcinogênese e progressão de tumores em alguns modelos animais¹⁴⁶. O entendimento da habilidade de específicos ácidos graxos de gerar atividades diferenciadas na regulação da transcrição de genes condicionados pelos PPARs, possuem um grande número de importantes implicações. Primeiramente, poderemos estabelecer as conexões existentes

entre o metabolismo e o controle transcricional, crucial para discernirmos o papel da dieta de ácidos graxos nas desordens ocasionadas pelos níveis de lipídeos, além do controle do desenvolvimento de cânceres.

Adicionalmente, entender o padrão de interação dessas moléculas pode gerir informações da capacidade de possuir os mesmos efeitos farmacológicos de ligantes sintéticos, apesar de apresentarem baixa afinidade ao receptor quando comparada à deles.

7.2 Resultados e discussão

7.2.1 Cristalografia

7.2.1.1 Ensaios de cristalização

Como descrito no item 6.2.1.1, os ensaios de cristalização realizados após a otimização das condições cristalizantes, determinadas pelo método da matriz esparsa automatizado, resultaram no aparecimento de cristais, com crescimento maior em certas dimensões e, portanto, designados como agulhas da proteína de estudo em complexo com diferentes ácidos graxos. Foram intensas as tentativas de otimização da morfologia dessas agulhas, porém continuamos obtendo essa forma nas amostras cristalinas. Entretanto, algumas delas foram adequadas aos experimentos de difração de raios-X. Os ácidos graxos são os ligantes naturais desse receptor e estavam presentes nas amostras provenientes da expressão heteróloga da proteína em bactérias⁵⁶. As agulhas com maior espessura do receptor hPPAR α LBD complexado a ácidos graxos de diferentes tamanhos obtidas serão designadas como:

- hPPAR α LBD+2AG (Figura 42A), com dois ácidos graxos ligados e a condição de cristalização composta por 100 mM Tris-HCl pH 7,0 e 35% PEG 20000);
- hPPAR α LBD+AG10C (Figura 42B). Proteína complexada a um ácido graxo de 10 carbonos e complexo cristalizado na condição: 100 mM Tris-HCl pH 6,8 e 30% PEG 20000);
- hPPAR α LBD+AG16C (Figura 42C), complexo esse formado pela proteína de estudo e um ácido graxo de 16 carbonos. A condição de cristalização foi 100 mM Tris-HCl pH 7,0 e 30% PEG 35000.

Figura 42 - Cristais obtidos do receptor hPPAR α complexado a ácidos graxos através da técnica de difusão à vapor e sob as condições descritas acima. **A.** hPPAR α LBD+2AG; **B.** hPPAR α LBD+AG10C; e **C.** hPPAR α LBD+AG16C.

Todas as condições de cristalização dos complexos PPAR:ácidos graxos apresentaram grandes semelhanças, o que pode explicar a morfologia muito parecida das agulhas obtidas.

7.2.1.2 Coleta e processamento de dados de difração de raios-X

As coletas de dados cristalográficos, através de experimentos de difração de raios-X dos cristais supracitados, foram realizadas após a imersão dos mesmos em uma solução crioprotetora, sob temperatura baixa (100 K) com o intuito de minimizar os danos causados pela radiação na amostra cristalina.

Os cristais apresentavam morfologia de aglomerados de agulhas e por esse motivo necessitavam de uma manipulação cuidadosa para que conseguíssemos prosseguir os experimentos utilizando apenas cristais únicos. Todas as amostras submetidas à difração de raios-X apresentaram padrões de difração característicos de redes cristalinas únicas e pontos bem definidos.

Após a coleta, indexação, integração e escalonamento das imagens de difração, foram obtidos os parâmetros estatísticos desses processos, que estão listados na Tabela 8.

O número de moléculas constituintes da unidade assimétrica foi estimado adotando a massa molecular do LBD do PPAR α como sendo aproximadamente 31 kDa, o que indicou a presença de apenas uma molécula na unidade assimétrica e em torno de 35% de solvente nos cristais. As análises dos conjuntos de dados através do *phenix.xtriage* exibiu a ausência de patologias.

Tabela 8 - Parâmetros e estatísticas da coleta, processamento e refinamento dos dados cristalográficos do hPPAR α LBD complexado a diferentes ácidos graxos.

Parâmetros	hPPAR α LBD +2AG	hPPAR α LBD +AG10C	hPPAR α LBD +AG16C
Grupo espacial	P4 ₁ 2 ₁ 2	P4 ₁ 2 ₁ 2	P4 ₁ 2 ₁ 2
Moléculas de proteína na unidade assimétrica	1	1	1
Parâmetros da célula unitária			
a (Å)	62,05	65,00	64,97
b (Å)	62,05	65,00	64,97
c (Å)	118,23	123,10	123,48
Intervalo de resolução (Å)	42,80-2,21 (2,33-2,21)	45,96-2,18 (2,30-2,18)	36,86-2,40 (2,53-2,40)
Número de imagens	60	145	137
$\Delta\phi$ (°)	2	1	1
Mosaicidade (°)	0,53	0,79	0,56
Número de reflexões únicas	12228	14427	10740
Redundância	6,4 (5,2)	5,3 (5,3)	16,0 (16,4)
Completeza (%)	99,9 (99,6)	100,0 (99,3)	98,7 (97,7)
$R_{\text{merge}}^{\dagger}$	0,139 (0,685)	0,113 (0,717)	0,129 (0,684)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	8,6 (2,0)	8,6 (2,1)	16,9 (4,9)
$R_{\text{factor}}^{\S}$ (%)	18,85	19,78	22,28
$R_{\text{free}}^{\S}$ (%)	23,25	24,89	26,58
B-fatores (Å²)			
Proteína	37,54	45,71	39,97
Ligante	50,57	43,68	39,33
Água/nº moléculas	42,30/77	51,70/151	40,17/65
RMSD do ideal			
Comprimento das ligações (Å)	0,008	0,007	0,008
Ângulo das ligações (°)	1,217	1,111	1,281
Ramachandran outliers	0	0	0

[†] $R_{\text{merge}} = \sum_{\text{hkl}} \sum_i |I_i(\text{hkl}) - \langle I(\text{hkl}) \rangle|$, onde $I_i(\text{hkl})$ é a intensidade observada para $I(\text{hkl})$ e $\langle I(\text{hkl}) \rangle$ é a média das intensidades. Entre parênteses os valores referentes a camada mais externa de resolução.

[§] $R_{\text{factor}}/R_{\text{free}} = \sum_{\text{hkl}} |F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}| / \sum_{\text{hkl}} |F_{\text{obs}}|$ onde F_{obs} e F_{calc} são os fatores de estrutura observados e calculados; 5% das reflexões foram incluídas nos testes de ajuste para o cálculo do R_{free} .

O refinamento seguiu considerando a minimização da discrepância entre o modelo e os dados experimentais, através da verificação dos índices R_{factor} e R_{free} . Quando não era mais possível a minimização desses índices, o refinamento foi dado como encerrado. As moléculas de água e de ligante foram inseridas em passos finais do refinamento com o intuito de descrever densidades eletrônicas observadas ao redor das cadeias polipeptídicas.

7.3 Análises dos modelos de alta resolução dos complexos formados pelo hPPAR α LBD e ácidos graxos

Como as moléculas de ácidos graxos são hidrocarbonetos com um grupo carboxila terminal, sendo os carbonos dos ácidos graxos saturados conectados por ligações covalentes simples, as estruturas cristalográficas do receptor complexado a ácidos graxos apresentou densidades eletrônicas contínuas e alongadas no interior do sítio ativo. Essas moléculas não haviam sido adicionadas às amostras proteicas em nenhum passo anterior, porém como sabemos que os ligantes endógenos descritos dessa proteína são os ácidos graxos, acredita-se que os mesmos, provenientes da bactéria (empregada na expressão heteróloga), possam ter se ligado à proteína e permanecido no interior do sítio ativo durante os passos de purificação e cristalização. Reforçando essa hipótese, outras estruturas de PPARs, porém de outros isotipos, já possuem modelos depositados no PDB dos receptores complexados a ácidos graxos provenientes do sistema de expressão proteica^{56; 147}.

Em todos os casos, a cristalização ocorreu sob condições similares, apresentando o mesmo grupo espacial e com as mesmas dimensões das células unitárias.

Na busca dos melhores modelos que descrevessem as densidades eletrônicas, encontradas no interior do sítio ativo, foram modeladas, em todas as estruturas cristalográficas aqui descritas, moléculas de ácidos graxos com cadeias de diferentes tamanhos (modeladas de acordo com a densidade eletrônica observada). Os modelos finais consistem em complexos formados por:

- hPPAR α +2AG: hPPAR α LBD complexado simultaneamente a um ácido graxo de 9 carbonos e outro ácido graxo com 16 carbonos (Figura 43);

Figura 43 - Estrutura cristalográfica do hPPAR α LBD complexado a ácidos graxos de 9 e 16 carbonos. **A.** LBD do receptor indicando a região de ligação dos dois ácidos graxos no interior do bolsão de ligação da proteína. **B.** Detalhes do sítio ativo e posição do ácido graxo de 9 carbonos (AG 9C). Em destaque os resíduos que participam de ligações de hidrogênio com o ácido graxo (resíduos nomeados) e, em destaque também, os resíduos que fazem interações hidrofóbicas (*dots*). **C.** Detalhes do sítio ativo e posição do ácido graxo de 16 carbonos (AG 16C). Em destaque o resíduo que faz uma ligação de hidrogênio com o oxigênio da cabeça polar do ácido graxo (resíduo nomeado) e os resíduos que fazem interações hidrofóbicas (*dots*). Representado em tracejado preto as ligações de hidrogênio.

- hPPAR α +AG10C: hPPAR α LBD complexado a um ácido graxo com 10 carbonos (Figura 44);

Figura 44 - Estrutura do hPPAR α LBD complexado ao ácido graxo de 10 carbonos (AG 10C). **A.** LBD do receptor com a densidade eletrônica em torno do ligante. **B.** Detalhes do sítio ativo e a posição do ligante. Em destaque os resíduos que fazem ligações de hidrogênio com o ácido graxo (resíduos nomeados e tracejado em preto as ligações de hidrogênio).

- hPPAR α +AG16C: hPPAR α LBD em complexo com um ácido graxo modelado com 16 carbonos (Figura 45).

Figura 45 - Modelo cristalográfico do hPPAR α LBD complexado ao ácido graxo de 16 carbonos (AG16C). **A.** LBD do receptor e densidade eletrônica em torno do ligante. **B.** Detalhes do sítio ativo e posição do ligante. Em destaque os resíduos que fazem ligações de hidrogênio com o ácido graxo (resíduos nomeados e tracejado preto para as ligações de hidrogênio).

Em todos os casos, o enovelamento das cadeias polipeptídicas é globular, característico do observado para o LBD de outros membros da superfamília de receptores nucleares, constituído por 12 hélices- α e uma pequena folha composta por 3 fitas- β .

Todas as estruturas foram examinadas cuidadosamente para identificarmos eventuais mudanças conformacionais na cadeia polipeptídica, ocasionadas pela ligação dos ácidos graxos e também para identificar todos os resíduos envolvidos na interação com os mesmos.

A diferença mais marcante entre os modelos cristalográficos obtidos são os distintos tamanhos dos ácidos graxos que puderam ser modulados no interior do sítio ativo da proteína. Essa característica possibilita estudar posições alternativas de ligantes, verificando como isso poderia afetar a conformação global da proteína e, conseqüentemente, em sua atividade. Através de um alinhamento entre os três modelos cristalográficos verificamos que a cadeia polipeptídica não sofreu grandes alterações, apesar de apresentarem diferentes tamanhos de ácidos graxos complexados (Figura 46A).

Embora exista uma conservação no enovelamento proteico, o modelo que apresenta dois ácidos graxos ligados exhibe uma alteração na conformação do Ω -loop, justamente para possibilitar o alojamento do segundo ácido graxo (Figura 46B). Esse segundo ácido graxo apresenta uma interação polar com a cadeia principal do resíduo A333 localizado no loop H2-H2', em uma região mais interna do sítio de ligação, ou seja, ocupando a região designada como braço III do bolsão de ligação da proteína (Figura 43C). Devido ao grande bolsão de ligação do PPAR α é que foi possível alojar mais de um ácido graxo em seu interior.

Nas três estruturas, os ligantes são estabilizados principalmente por ligações de hidrogênio entre a cabeça polar dos ácidos graxos e os resíduos S280, Y314, H440 e Y464. Através dessas interações, os ligantes compartilham uma região de ocupação comum entre eles, que faz parte do braço I do bolsão, localizado no início do mesmo, próximo à hélice 12 (AF-2) (Figura 46C). Esse posicionamento do ligante garante sua interação com o resíduo Y464 que está localizado na AF-2. A interação direta com esse resíduo obriga a hélice 12 a se posicionar sobre o bolsão de ligação adotando assim a conformação ativa capaz de alojar coativadores que interagem com o receptor em uma região próxima a ela. Além dessas interações polares, a longa cadeia alquílica saturada dos ligantes estão localizadas em regiões com muitos resíduos apolares pertencentes às regiões do braço II e III do bolsão de ligação, o que auxilia na estabilização dessas moléculas.

Figura 46 - Alinhamento dos modelos estruturais dos complexos formados pelo LBD do PPAR α e os diferentes tipos de ácidos graxos. **A.** Os três modelos possuem ligantes de tamanhos e ocupação variados, mas que não modificaram drasticamente o enovelamento proteico, com somente uma alteração na região destacada em **B.** referente ao Ω -loop e H2' (vermelho), que acarretou uma acomodação diferencial e estabilização dessa região. **C.** Alinhamento destacando a região compartilhada pelos três ácidos graxos próxima a H12 (círculo vermelho) que possibilita a interação com o resíduo Y464.

As diferentes ocupações das moléculas de ácidos graxos podem levar às diferenças na estabilização da proteína como um todo, como podemos observar pelas figuras de B-fator, que mostram regiões mais dinâmicas e/ou menos ordenadas (Figura 47). A determinação dos B-fatores ou fatores de temperatura das estruturas cristalográficas provê a informação sobre a distribuição da densidade eletrônica e serve como uma indicação indireta da mobilidade da proteína.

Figura 47 - Demonstração do padrão diferenciado de distribuição dos fatores de temperatura (B-fatores) das estruturas cristalográficas dos complexos PPAR α +ácidos graxos. **A.** hPPAR α +2AG; **B.** hPPAR α +AG10; **C.** hPPAR α +AG16.

Essa análise da distribuição dos fatores de temperatura mostrou que ocorre uma estabilização diferenciada das estruturas proteicas complexadas aos diferentes ácidos graxos. As estruturas que possuem os ácidos graxos com maiores cadeias alquílicas ou dois ácidos graxos complexados (Figura 47A e C) apresentam, no geral, uma maior estabilidade se comparadas à proteína complexada à um ácido graxo de cadeia média (Figura 47B). Isso mostra que as interações hidrofóbicas envolvidas na formação do complexo, além de estabilizarem a cauda apolar dessas moléculas, também exerce um papel na estabilização de regiões específicas da estrutura proteica. E, como descrito anteriormente, a presença de padrões diferenciados de estabilização da proteína pode desencadear respostas transcricionais distintas, ocasionadas principalmente devido à estabilização da região da H12.

Na proteína existem regiões que são intrinsicamente móveis por estarem envolvidas na entrada e ou liberação dos ligantes, que é o caso, por exemplo do Ω -loop que adota também diferentes conformações com a finalidade de melhor alojar os ligantes. A flexibilidade dessa região está em concordância com fatores de temperatura experimentais e também com a não resolução desse loop em muitas estruturas. No modelo com os dois ácidos graxos verificamos que, além de uma molécula ligante interagir diretamente com a H12, ocorre a estabilização da região do Ω -loop, o que pode garantir uma firmação superior da proteína na conformação ativa e/ou estabilizar complexos com coativadores. A estrutura contendo um ácido graxo de cadeia longa possui uma estabilização maior na região do loop entre as H2 e H2', que engloba

a região das fitas- β . Essa porção da estrutura proteica é bastante descrita como a região de interação de agonistas parciais do PPAR γ ¹⁴⁰.

As regiões ocupadas por esses ligantes coincidem com as regiões exploradas por ligantes sintéticos de alta afinidade^{51; 126}, apresentando conformações em forma de U em torno da H3, com a cabeça polar se estendendo em direção a H12 para formar uma ligação de hidrogênio com a hidroxila da cadeia lateral da Y464 e, dessa forma, manter a proteína na conformação ativa. Esses ligantes de alta afinidade ocupam, com apenas uma molécula, a região dos dois ácidos graxos simultaneamente (Figura 48). Tanto a interação com a H12 quanto a ampla ocupação e o grande número de interações, podem indicar de que maneira essas moléculas podem ativar a proteína e possuir os mesmos efeitos farmacológicos de ligantes sintéticos.

Figura 48 - Alinhamento das estruturas complexadas a ácidos graxos alinhadas a duas estruturas ligadas a ligantes sintéticos de alta afinidade (em cinza e circundados por esferas vermelhas) (PDBs 3KDU e 1K7L). Os ácidos graxos ocupam as mesmas regiões exploradas por esses ligantes de alta afinidade, apresentando a mesma posição do grupo carboxila que interage com a H12 (círculo preto).

A ocupação diferenciada por ácidos graxos está recentemente sendo estudada para o receptor PPAR γ , que apresentou uma estrutura da proteína complexada a um ácido graxo de cadeia média com 10 carbonos (PDB 3U9Q). A análise dessa estrutura mostrou que ácidos graxos de cadeia média interagem de modo diferente do observado para os de cadeia longa e diferente também dos membros da classe de TZDs. Essa discrepância está intimamente relacionada com a atividade funcional da proteína em questão. Estudos funcionais mostraram

que os ácidos graxos de cadeia média melhoram a sensibilidade à glicose sem causar adipogênese e consequente ganho de peso (efeitos adversos de alguns ligantes fortes incluindo determinados TZDs)¹⁴⁸.

Isso sugere que o posicionamento dos ácidos graxos e a estabilização da conformação ativa da proteína são processos acoplados e garantem a diversidade na atividade da proteína. Além disso, a maneira como esses ácidos graxos interagem fornece bases para o desenho de novas moléculas que mimetizem a suas ações benéficas.

Outra perspectiva da importância de estudar a interação com os ácidos graxos é que podemos entender como eles regulam seletivamente cada PPAR. Já é sabido que o PPAR α é o mais promíscuo, interagindo tanto com ácidos graxos saturados como insaturados; o PPAR β também é capaz de interagir com as duas classes, porém com menor eficiência de ligação aos saturados; e o PPAR γ se mostra mais restritivo, com interação eficiente somente com poliinsaturados e fracamente com os monoinsaturados⁵¹.

7.3.1.1 Medida da atividade diferenciada dos ácidos graxos

Com o intuito de verificar a modulação da atividade proteica pelos diferentes tamanhos de cadeias alquílicas saturadas dos ácidos graxos foram realizados experimentos de transativação do gene repórter. Nesses ensaios, diferentes doses de ácidos graxos de 6 a 18 carbonos foram testadas, além do ligante GW7647, que serviu como um controle positivo da ativação do receptor em questão. Os resultados podem ser observados através do gráfico mostrado na Figura 49.

O ligante GW7647, referente ao controle positivo, como esperado, apresentou alta ativação do receptor, com altos valores de atividade relativa mesmo nas concentrações mais baixas testadas (10 μ M).

Diferentemente, os ácidos graxos iniciam uma ativação significativa do receptor somente em concentrações mais altas, como 100 μ M e 1000 μ M, mostrando que são ligantes um pouco mais fracos que os sintéticos. De modo interessante, esses ácidos graxos de diferentes tamanhos mostraram padrões bem distintos de ativação do receptor. Os ligantes naturais aqui testados que apresentaram maior ativação foram: o ácido nonanóico, decanóico e hexadecanóico, respectivamente, aqueles que possuem 9, 10 e 16 carbonos em sua configuração. Esses ligantes apresentaram ativação mediana em concentrações que já

ativavam o ligante sintético GW7647, porém esses ligantes endógenos foram capazes de alcançar a máxima ativação do receptor em doses um pouco mais altas.

Figura 49 - Ensaio de transativação do PPAR α /GAL4 realizado com diferentes concentrações de ácidos graxos e do ligante GW7647, o último usado como controle. O gráfico mostra a atividade relativa da luciferase em função do aumento da concentração das moléculas ligantes. Todos os ensaios foram realizados em três replicatas e as diferenças nas eficiências de transfecções foram normalizados pela medida da atividade da luciferase de *Renilla* no mesmo lisado celular.

Ao fazermos uma correlação desses ensaios funcionais com nossos dados cristalográficos, observamos que todos os ácidos graxos observados nas estruturas cristalográficas foram aqueles que apresentaram maior ativação no ensaio celular. Isso sugere que essas moléculas, nesses tamanhos específicos, além de serem as que possuem maior ativação dentre os ácidos graxos testados, são aquelas que proporcionam maior estabilização da estrutura proteica, garantindo, assim, a formação de cristais.

7.3.1.2 Espectrometria de massas para checar a presença de ácidos graxos na amostra cristalina

Para checar a presença de ácidos graxos nas amostras de proteína, foram enviadas alíquotas da proteína purificada (as mesmas amostras utilizadas nos ensaios de cristalização) para a análise de espectrometria de massa, por colaboradores na UNESP de Rio Claro, o aluno de pós-doutorado Dr. Daniel Saidenberg e Prof. Dr. Mario Palma. Os resultados de

espectrometria de massa mostraram que os ácidos graxos estavam presentes na amostra proteica enviada. Abaixo uma tabela mostrando os principais ácidos graxos encontrados (Tabela 9).

Tabela 9 - Ácidos graxos encontrados na amostra de hPPAR α LBD purificada através de espectrometria de massa.

Ácido Graxo	Concentração (ppm)
Ácido tetradecanóico - Ácido mirístico	0,124
Ácido hexadecanóico - Ácido palmítico	3,72
Ácido octadecanóico - Ácido esteárico	2,23

Através desses resultados, foi possível confirmar que as densidades eletrônicas encontradas nos dados cristalográficos poderiam ser de ácidos graxos.

7.4 Conclusão

Dada a grande importância do PPAR α como um fator de transcrição regulando vários processos fisiológicos e como um alvo de fármacos para dislipidemias, a busca por novas moléculas que possam interagir com esses receptores se torna cada vez mais constante.

Com esta premissa, buscamos principalmente desenvolver metodologias capazes de verificar interações de pequenas moléculas, tanto naturais quanto sintéticas, com o alvo proteico. Nessa parte do trabalho descrevemos estruturas cristalográficas obtidas do LBD proteína em estudo PPAR α complexada a seus ligantes endógenos. Essas estruturas são inéditas, pois das 14 estruturas do LBD do hPPAR α , nenhuma apresenta o receptor complexado a nenhum ligante natural já descrito. Os ácidos graxos não foram adicionados em nenhuma etapa da produção e preparação das amostras proteicas e, portanto, são oriundos do processo de expressão heteróloga em bactérias. A presença desses ligantes contaminantes aumentaram a estabilidade proteica e facilitaram o processo de cristalização.

Os modelos refinados mostraram claramente densidades eletrônicas dos ligantes no interior do sítio ativo, interagindo diretamente com a H12, o que obriga a proteína a adotar a conformação ativa. Adicionalmente, os modelos estruturais desses complexos apresentaram mudanças nas posições ocupadas por esses agonistas no interior do bolsão de ligação da proteína.

Concisamente, as estruturas cristalográficas obtidas desses complexos, apesar de todas apresentarem ácidos graxos complexados, revelam que: (a) a proteína apresenta a sua forma ativa independente do tamanho da cauda da molécula de ácido graxo; (b) o receptor pode

simultaneamente ligar mais de uma molécula de ácidos graxos; e (c) a ocupação dos mesmos pode variar no interior do sítio ativo da proteína favorecendo a formação de complexos com diferentes coativadores e, conseqüentemente, diferentes respostas no interior da célula. Por esse motivo é que os ensaios de atividade também foram realizados e as diferenças na ativação do receptor foram analisadas. Os ensaios funcionais auxiliaram a decifrar a preferência do receptor por determinados tamanhos de cadeia de ácidos graxos.

Para a confirmação da presença dessas moléculas nos cristais obtidos, experimentos de espectrometria de massas foram utilizados que, além da presença, identificaram também o comprimento da cadeia de carbonos das moléculas mais presentes na amostra.

Esses resultados nos proporcionaram um melhor entendimento de como essa importante classe de ligantes naturais pode ativar a proteína e possuir os mesmos efeitos farmacológicos de ligantes sintéticos.

CAPÍTULO 8

Conclusão e Considerações Finais

8 Conclusão e Considerações Finais

Os PPARs estão envolvidos na mediação de uma série de processos fisiológicos em humanos, incluindo a regulação da homeostase da glicose, metabolismo dos lipídeos e respostas anti-inflamatórias. Por exercer essas variadas funções através da dependência de interação com moléculas ligantes, esses receptores têm sido assinalados como importantes alvos moleculares no tratamento de doenças e na busca de novos fármacos para tratar e/ou prevenir várias disfunções patológicas associadas com a obesidade, doenças relacionadas com o envelhecimento, inflamação, dislipidemias e vários tipos de câncer. A capacidade de interagir com diferentes ligantes garante a especificidade e variedade dos sinais intracelulares, pois essas moléculas podem induzir a interações diferenciadas com cofatores, que serão traduzidas em respostas fisiológicas específicas.

Com o intuito de caracterizar o PPAR α , este trabalho envolveu a subclonagem do gene de interesse em vetor de expressão, passo essencial para o estudo pretendido do receptor. Os protocolos de expressão, purificação e clivagem da proteína foram estabelecidos com resultados bastante satisfatórios, visto que a proteína, além de apresentar um alto grau de pureza, exibiu alto rendimento, o que possibilitou o seu estudo através de diversas técnicas.

Para a análise da proteína em solução foram realizados estudos de oligomerização e estes mostraram que o PPAR α é monomérico, se comportando de maneira distinta da maioria dos membros da família dos receptores nucleares, que geralmente apresentam homooligomerização. Outro ponto que merece destaque foi a análise realizada sobre a heterodimerização com seu parceiro obrigatório que, indubitavelmente, indicou que a interação ocorre e que a proteína recombinante produzida possui características funcionais.

Além da caracterização da proteína em solução, o trabalho envolveu principalmente estudos estruturais na busca de estruturas cristalográficas complexadas a diferentes ligantes, incluindo naturais e sintéticos. A estrutura tridimensional de macromoléculas é crucial para o entendimento de processos biológicos, uma vez que a estrutura e a função de uma macromolécula são propriedades intimamente ligadas, além, é claro, de ter aplicação no planejamento racional de fármacos.

Como resultado desses esforços foram obtidas estruturas cristalográficas de complexos inéditos do hPPAR α LBD. O complexo com o ligante WY14643 foi importante pois essa molécula se trata de um potente ativador do PPAR α e já descrito como uma molécula que pode auxiliar no tratamento de dislipidemia e inflamação. As outras estruturas

obtidas apresentavam ácidos graxos ligados à proteína, os ligantes endógenos mais conhecidos dessa classe de receptores.

Apesar dos agonistas totais sintéticos apresentarem alta afinidade, muitos exibem efeitos secundários adversos e, portanto, seu uso passa a ser limitado. Por esse motivo que os produtos naturais têm demonstrado ser uma fonte valiosa de ativadores dos PPARs com uma grande significância no tratamento de doenças, evitando efeitos adversos. De fato, o estudo de ligantes naturais de PPAR representa uma abordagem promissora para mitigar síndromes metabólicas que atingem hoje proporções pandêmicas.

Os bolsões de ligação dos PPARs são largos e podem acomodar mais de um ligante, e os estudos sobre a posição desses ligantes foram desenvolvidos para entender de que maneira isso poderia afetar na conformação adotada pela proteína e, conseqüentemente, em mudanças no recrutamento da maquinaria transcricional e, além disso, auxiliar na proposição de regiões a serem exploradas através de substituintes químicos para a síntese de ligantes com maior afinidade.

Estudos funcionais com células de mamíferos proporcionaram, além do aprendizado de várias técnicas, muitos resultados significativos que ajudaram a confirmar e explicar as hipóteses geradas através das análises estruturais. As mutações sítio dirigidas seguidas de ensaios de transativação adicionaram evidências à suposição de funcionalidade do segundo sítio ocupado pelo ligante WY14643 na estrutura cristalográfica. Adicionalmente, os ensaios de transativação indicaram os ácidos graxos que melhor ativam a proteína, coincidindo com os observados nas estruturas cristalográficas. Os ensaios de duplo-híbrido foram realizados com o objetivo de verificar se os agonistas trabalhados induziam ao recrutamento de coativadores conhecidos desses receptores.

É a primeira vez que se trabalha com esse subtipo da proteína PPAR em nosso grupo e muito se tem descoberto e aprendido sobre este receptor.

REFERÊNCIAS

- 1 NAGY, L.; SCHWABE, J. W. Mechanism of the nuclear receptor molecular switch. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 29, n. 6, p. 317-24, 2004.
- 2 SONODA, J.; PEI, L.; EVANS, R. M. Nuclear receptors: decoding metabolic disease. **FEBS Letter**, v. 582, n. 1, p. 2-9, 2008.
- 3 BOOKOUT, A. L. et al. Anatomical profiling of nuclear receptor expression reveals a hierarchical transcriptional network. **Cell**, v. 126, n. 4, p. 789-99, 2006.
- 4 LAUDET, V.; GRONEMEYER, H. **The Nuclear Receptors Factbooks**. San Diego: Academic 2001.
- 5 ESCRIVA, H.; BERTRAND, S.; LAUDET, V. The evolution of the nuclear receptor superfamily. **Essays in Biochem Biochemistry**, v. 40, p. 11-26, 2004.
- 6 BAIN, D. L. et al. Nuclear receptor structure: implications for function. **Annual Review of Physiology**, v. 69, p. 201-20, 2007.
- 7 KELLER, H. et al. Fatty acids and retinoids control lipid metabolism through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimers. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, v. 90, n. 6, p. 2160-4, 1993.
- 8 KLIEWER, S. A.; GOODWIN, B.; WILLSON, T. M. The nuclear pregnane X receptor: a key regulator of xenobiotic metabolism. **Endocrine Review**, v. 23, n. 5, p. 687-702, 2002.
- 9 GRONEMEYER, H.; GUSTAFSSON, J. A.; LAUDET, V. Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 11, p. 950-64, 2004.
- 10 MOORE, J. T.; COLLINS, J. L.; PEARCE, K. H. The nuclear receptor superfamily and drug discovery. **ChemMedChem**, v. 1, n. 5, p. 504-23, 2006.
- 11 KHORASANIZADEH, S.; RASTINEJAD, F. Nuclear-receptor interactions on DNA-response elements. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 26, n. 6, p. 384-90, 2001.
- 12 WURTZ, J. et al. A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors. **Nature Structural Biology**, v. 3, n. 2, p. 206, 1996.
- 13 ARANDA, A.; PASCUAL, A. Nuclear hormone receptors and gene expression. **Physiological Reviews**, v. 81, n. 3, p. 1269-304, 2001.

-
- 14 TORCHIA, J.; GLASS, C.; ROSENFELD, M. G. Co-activators and co-repressors in the integration of transcriptional responses. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 10, n. 3, p. 373-83, 1998.
- 15 POWELL, E.; KUHN, P.; XU, W. Nuclear Receptor Cofactors in PPARgamma-Mediated Adipogenesis and Adipocyte Energy Metabolism. **PPAR Research**, v. 2007, p. 53843, 2007.
- 16 ROCHETTE-EGLY, C. Dynamic combinatorial networks in nuclear receptor-mediated transcription. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 38, p. 32565-8, 2005.
- 17 PLEVIN, M. J.; MILLS, M. M.; IKURA, M. The LxxLL motif: a multifunctional binding sequence in transcriptional regulation. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 30, n. 2, p. 66-9, 2005.
- 18 PERAZA, M. A. et al. The toxicology of ligands for peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR). **Toxicological Sciences**, v. 90, n. 2, p. 269-95, 2006.
- 19 TANENBAUM, D. M. et al. Crystallographic comparison of the estrogen and progesterone receptor's ligand binding domains. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, v. 95, n. 11, p. 5998-6003, 1998.
- 20 RIBEIRO, R. C. et al. Definition of the surface in the thyroid hormone receptor ligand binding domain for association as homodimers and heterodimers with retinoid X receptor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 18, p. 14987-95, 2001.
- 21 GAMPE, R. J. et al. Asymmetry in the PPARgamma/RXRalpha crystal structure reveals the molecular basis of heterodimerization among nuclear receptors. **Molecular Cell**, v. 5, n. 3, p. 545-55, 2000.
- 22 CHANDRA, V. et al. Structure of the intact PPAR-gamma-RXR-alpha nuclear receptor complex on DNA. **Nature**, p. 350-356, 2008.
- 23 BURNS, K. A.; VANDEN HEUVEL, J. P. Modulation of PPAR activity via phosphorylation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**, v. 1771, n. 8, p. 952-60, 2007.
- 24 ISSEMAN, I.; GREEN, S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. **Nature**, v. 347, n. 6294, p. 645-50, 1990.
- 25 ESCHER, P.; WAHLI, W. Peroxisome proliferator-activated receptors: insight into multiple cellular functions. **Mutation Research**, v. 448, n. 2, p. 121-38, 2000.
- 26 NIELSEN, R. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor subtype- and cell-type-specific activation of genomic target genes upon adenoviral transgene delivery. **Molecular Cell Biology**, v. 26, n. 15, p. 5698-714, 2006.

-
- 27 HARMON, G. S.; LAM, M. T.; GLASS, C. K. PPARs and lipid ligands in inflammation and metabolism. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 10, p. 6321-40, 2011.
- 28 STAELS, B. et al. Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPARalpha but not by PPARgamma activators. **Nature**, v. 393, n. 6687, p. 790-3, 1998.
- 29 MANDARD, S.; MÜLLER, M.; KERSTEN, S. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 61, n. 4, p. 393-416, 2004.
- 30 LEE, C. H. et al. Transcriptional repression of atherogenic inflammation: modulation by PPARdelta. **Science**, v. 302, n. 5644, p. 453-7, 2003.
- 31 HARMAN, F. S. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-delta attenuates colon carcinogenesis. **Nature Medicine**, v. 10, n. 5, p. 481-3, 2004.
- 32 TAN, N. et al. Critical roles of PPAR beta/delta in keratinocyte response to inflammation. **Genes & Development**, v. 15, n. 24, p. 3263-77, 2001.
- 33 SINGH, M. P. et al. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs): A Target with a broad therapeutic potencial for human diseases: an overview. **Pharmacologyonline**, p.58-89, 2011.
- 34 EVANS, R. M.; BARISH, G. D.; WANG, Y. X. PPARs and the complex journey to obesity. **Nature Medicine**, v. 10, n. 4, p. 355-61, 2004.
- 35 KIEWER, S. A. et al. Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. **Nature**, v. 358, n. 6389, p. 771-4, 1992.
- 36 IJPENBERG, A. et al. Polarity and specific sequence requirements of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)/retinoid X receptor heterodimer binding to DNA. A functional analysis of the malic enzyme gene PPAR response element. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 32, p. 20108-17, 1997.
- 37 DESVERGNE, B.; WAHLI, W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. **Endocrine Reviews**, v. 20, n. 5, p. 649-88, 1999.
- 38 TENENBAUM, A.; MOTRO, M.; FISMAN, E. Z. Dual and pan-peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) co-agonism: the bezafibrate lessons. **Cardiovascular Diabetology**, v. 4, p. 14, 2005.
- 39 DREYER, C. et al. Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. **Cell**, v. 68, n. 5, p. 879-87, 1992.

-
- 40 LEONE, T. C.; WEINHEIMER, C. J.; KELLY, D. P. A critical role for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in the cellular fasting response: the PPARalpha-null mouse as a model of fatty acid oxidation disorders. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, v. 96, n. 13, p. 7473-8, 1999.
- 41 ZHANG, L. S. et al. Scaffold-Based Pan-Agonist Design for the PPAR α , PPAR β and PPAR γ Receptors. **PLoS One**, v. 7, n. 10, p. e48453, 2012.
- 42 BERGER, J. P.; AKIYAMA, T. E.; MEINKE, P. T. PPARs: therapeutic targets for metabolic disease. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 26, n. 5, p. 244-51, 2005.
- 43 STIENSTRA, R. et al. PPARs, Obesity, and Inflammation. **PPAR Research**, v. 2007, p. 95974, 2007.
- 44 BOURGUET, W.; GERMAIN, P.; GRONEMEYER, H. Nuclear receptor ligand-binding domains: three-dimensional structures, molecular interactions and pharmacological implications. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 21, n. 10, p. 381-8, 2000.
- 45 DESVERGNE, B.; WAHLI, W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. **Endocrine Reviews**, v. 20, n. 5, p. 649-88, 1999.
- 46 MARKT, P. et al. Pharmacophore modeling and parallel screening for PPAR ligands. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 21, n. 10-11, p. 575-90, 2007.
- 47 SCHULMAN, I. G. Nuclear receptors as drug targets for metabolic disease. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 13, p. 1307-15, 2010.
- 48 RENAUD, J. P. et al. Crystal structure of the RAR-gamma ligand-binding domain bound to all-trans retinoic acid. **Nature**, v. 378, n. 6558, p. 681-9, 1995.
- 49 BOURGUET, W. et al. Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR-alpha. **Nature**, v. 375, n. 6530, p. 377-82, 1995.
- 50 SAVKUR, R. S.; BURRIS, T. P. The coactivator LXXLL nuclear receptor recognition motif. **Journal of Peptide Research**, v. 63, n. 3, p. 207-12, 2004.
- 51 XU, H. E. et al. Structural determinants of ligand binding selectivity between the peroxisome proliferator-activated receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, v. 98, n. 24, p. 13919-24, 2001.
- 52 BERGER, J.; MOLLER, D. E. The mechanisms of action of PPARs. **Annual Review of Medicine**, v. 53, p. 409-35, 2002.

- 53 MICHALIK, L. et al. International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. **Pharmacological Reviews**, v. 58, n. 4, p. 726-41, 2006.
- 54 ROTMAN, N.; WAHLI, W. Fatty acid synthesis and PPARalpha hand in hand. **Chemical Biology**, v. 16, n. 8, p. 801-2, 2009.
- 55 WOLFRUM, C. et al. Fatty acids and hypolipidemic drugs regulate peroxisome proliferator-activated receptors alpha - and gamma-mediated gene expression via liver fatty acid binding protein: a signaling path to the nucleus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, v. 98, n. 5, p. 2323-8, 2001.
- 56 XU, H. E. et al. Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors. **Molecular Cell**, v. 3, n. 3, p. 397-403, 1999.
- 57 KLIEWER, S. A. et al. Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, v. 94, n. 9, p. 4318-23, 1997.
- 58 WILLSON, T. M.; WAHLI, W. Peroxisome proliferator-activated receptor agonists. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 1, n. 2, p. 235-41, 1997.
- 59 KERSTEN, S.; DESVERGNE, B.; WAHLI, W. Roles of PPARs in health and disease. **Nature**, v. 405, n. 6785, p. 421-4, 2000.
- 60 FRUCHART, J. C.; DURIEZ, P.; STAELS, B. [Molecular mechanism of action of the fibrates]. **Journal de la Société de Biologie**, v. 193, n. 1, p. 67-75, 1999.
- 61 FLORENTIN, M. et al. Fibrate-associated adverse effects beyond muscle and liver toxicity. **Current Pharmaceutical Design**, v. 14, n. 6, p. 574-87, 2008.
- 62 LIEB, D. C.; MCCALL, A. L. Update on the safety of thiazolidinediones. **Current Diabetes Reports**, v. 10, n. 2, p. 116-23, 2010.
- 63 SHEARER, B. G.; BILLIN, A. N. The next generation of PPAR drugs: do we have the tools to find them? **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**, v. 1771, n. 8, p. 1082-93, 2007.
- 64 SHEARER, B. G.; HOEKSTRA, W. J. Recent advances in peroxisome proliferator-activated receptor science. **Current Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 4, p. 267-80, 2003.
- 65 GIAMPIETRO, L. et al. Synthesis and structure-activity relationships of fibrate-based analogues inside PPARs. **Bioorganic e Medicinal Chemistry Letters**, 2012.

- 66 MIZUNO, C. S. et al. Design, synthesis, biological evaluation and docking studies of pterostilbene analogs inside PPAR α . **Bioorganic e Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, n. 7, p. 3800-8, 2008.
- 67 SHUKLA, P. et al. Synthesis and antidiabetic activity of chalcone fibrates. **Bioorganic e Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, n. 11, p. 3475-8, 2011.
- 68 SCHULMAN, I. G. Nuclear receptors as drug targets for metabolic disease. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 13, p. 1307-15, 2010.
- 69 CHEN, T. Nuclear receptor drug discovery. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 12, n. 4, p. 418-26, 2008.
- 70 GÉHIN, M. et al. Structural basis for engineering of retinoic acid receptor isotype-selective agonists and antagonists. **Chemical Biology**, v. 6, n. 8, p. 519-29, Aug 1999.
- 71 CHEN, J. Y. et al. RAR-specific agonist/antagonists which dissociate transactivation and AP1 transrepression inhibit anchorage-independent cell proliferation. **EMBO Journal**, v. 14, n. 6, p. 1187-97, 1995.
- 72 COGHLAN, M. J. et al. A novel antiinflammatory maintains glucocorticoid efficacy with reduced side effects. **Molecular Endocrinology**, v. 17, n. 5, p. 860-9, 2003.
- 73 HERRLICH, P. Cross-talk between glucocorticoid receptor and AP-1. **Oncogene**, v. 20, n. 19, p. 2465-75, 2001.
- 74 JORDAN, V. C. Antiestrogens and selective estrogen receptor modulators as multifunctional medicines. 2. Clinical considerations and new agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 7, p. 1081-111, 2003.
- 75 BROWN, J. D.; PLUTZKY, J. Peroxisome proliferator-activated receptors as transcriptional nodal points and therapeutic targets. **Circulation**, v. 115, n. 4, p. 518-33, 2007.
- 76 SVERGUN, D. I. Mathematical methods in small-angle scattering data analysis. **Journal of Applied Crystallography**. 24 p. 485–492, 1991.
- 77 HAMMERSLEY, A. P. FIT2D: An Introduction and Overview. **ESRF Internal Report**, 1997.
- 78 GLATTER, O.; KRATKY, O. Small angle x-ray scattering. **London: Academic Press**, n. 978-0122862809, 1982.
- 79 SEMENYUK, A.; SVERGUN, D. GNOM - A program package for small angle scattering data processing. **Journal of Applied Crystallography**, v. 5, n. 24, p. 537-640, 1991.

-
- 80 KHURANA, R. et al. Is Congo red an amyloid-specific dye? **Journal Biological Chemistry**, v. 276, n. 25, p. 22715-21, 2001.
- 81 KONAREV, P. V.; PETOUKHOV, M. V.; VOLKOV, V. V.; SVERGUN, D. ATSAS 2.1, a program package for small-angle scattering data analysis. **Journal of Applied Crystallography**, 39 p.277-286, 2006.
- 82 FISCHER, H. et al. Determination of the molecular weight of proteins in solution from single small-angle X-ray scattering measurement on a relative scale. **Journal of Applied Crystallography**, p.101-109, 2010.
- 83 SVERGUN, D.; PETOUKHOV, M.; KOCH, M. Determination of domain structure of proteins from X-ray solution scattering. **Biophysical Journal**, v. 80, n. 6, p. 2946-53, 2001.
- 84 DELANO; S.; W. **The PyMOL Molecular Graphics System**. Delano Scientific 2002.
- 85 KONAREV, P. et al. ATSAS 2.1, a program package for small-angle scattering data analysis. **Journal of Applied Crystallography**, v. 39, p. 277-286, 2006.
- 86 SCHWABE, J. 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, n. 3, p. 567-78, 1993.
- 87 LESLIE, A. Integration of macromolecular diffraction data. **Acta Crystallographica section D: biological crystallography**, v. 55, n. Pt 10, p. 1696-702, 1999.
- 88 COLLABORATIVE COMPUTATIONAL PROJECT, N. M. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. **Acta Crystallographica Crystallographica section D: biological crystallography**, v. 50, n. Pt 5, p. 760-3, 1994.
- 89 MATTHEWS, B. Solvent content of protein crystals. **Journal of Molecular Biology**, v. 33, n. 2, p. 491-7, 1968.
- 90 ADAMS, P. D. et al. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. **Acta Crystallographica section D: biological crystallography** v. 66, n. Pt 2, p. 213-21, 2010.
- 91 MCCOY, A. et al. Phaser crystallographic software. **Journal of Applied Crystallography**, v. 40, n. Pt 4, p. 658-674, 2007.
- 92 EMSLEY, P.; COWTAN, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. **Acta Crystallographica section D: biological crystallography**, v. 60, n. Pt 12 Pt 1, p. 2126-32, 2004.

- 93 CHEN, V. B. et al. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. **Acta Crystallographica section D: biological crystallography**, v. 66, n. Pt 1, p. 12-21, 2010.
- 94 AMOUTZIAS, G. et al. Choose your partners: dimerization in eukaryotic transcription factors. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 33, n. 5, p. 220-9, 2008.
- 95 BUGGE, T. et al. RXR alpha, a promiscuous partner of retinoic acid and thyroid hormone receptors. **EMBO Journal**, v. 11, n. 4, p. 1409-18, 1992.
- 96 LENHARD, J. PPAR gamma/RXR as a molecular target for diabetes. **Receptors Channels**, v. 7, n. 4, p. 249-58, 2001.
- 97 RASTINEJAD, F. Retinoid X receptor and its partners in the nuclear receptor family. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 11, n. 1, p. 33-8, 2001.
- 98 FÖRSTER, F. et al. Integration of small-angle X-ray scattering data into structural modeling of proteins and their assemblies. **Journal of Molecular Biology**, v. 382, n. 4, p. 1089-106, 2008.
- 99 GASTEIGER, E. et al. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In: WALKER, J. M. (ed) **The proteomics protocols handbook**, Humana Press, 2005. p.571-607,
- 100 CALGARO, M. et al. Orphan nuclear receptor NGFI-B forms dimers with nonclassical interface. **Protein Science**, v. 16, n. 8, p. 1762-72, 2007.
- 101 KONAREV, P. V. et al. PRIMUS: a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis. Computer Programs. **Journal of Applied Crystallography**, p.1277-1282, 2003.
- 102 FIGUEIRA, A. C. et al. Low-resolution structures of thyroid hormone receptor dimers and tetramers in solution. **Biochemistry**, v. 46, n. 5, p. 1273-83, 2007.
- 103 ZAMIR, I.; ZHANG, J.; LAZAR, M. A. Stoichiometric and steric principles governing repression by nuclear hormone receptors. **Genes and Development**, v. 11, n. 7, p. 835-46, 1997.
- 104 FIGUEIRA, A. et al. Human thyroid receptor forms tetramers in solution, which dissociate into dimers upon ligand binding. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 44, n. 3, p. 453-62, 2006.
- 105 _____. Low-resolution structures of thyroid hormone receptor dimers and tetramers in solution. **Biochemistry**, v. 46, n. 5, p. 1273-83, 2007.
- 106 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. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 18, p. 16030-8, 2003.

- 107 MEIJSING, S. H. et al. DNA binding site sequence directs glucocorticoid receptor structure and activity. **Science**, v. 324, n. 5925, p. 407-10, 2009.
- 108 SAMARASINGHE, S. P. et al. Altering PPARgamma ligand selectivity impairs adipogenesis by thiazolidinediones but not hormonal inducers. **Obesity (Silver Spring)**, v. 17, n. 5, p. 965-72, 2009.
- 109 KOTA, B.; HUANG, T.; ROUFOGALIS, B. An overview on biological mechanisms of PPARs. **Pharmacological Research**, v. 51, n. 2, p. 85-94, 2005.
- 110 STAELS, B.; MAES, M.; ZAMBON, A. Fibrates and future PPARalpha agonists in the treatment of cardiovascular disease. **Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine**, v. 5, n. 9, p. 542-53, 2008.
- 111 GRUNDY, S. M. et al. Effectiveness and tolerability of simvastatin plus fenofibrate for combined hyperlipidemia (the SAFARI trial). **American Journal of Cardiology**, v. 95, n. 4, p. 462-8, Feb 2005.
- 112 SANTILLI, A. A.; SCOTese, A. C.; TOMARELLI, R. M. A potent antihypercholesterolemic agent: (4-chloro-6-(2,3-xylidino)-2-pyrimidinylthio) acetic acid (Wy-14643). **Experientia**, v. 30, n. 10, p. 1110-1, 1974.
- 113 REDDY, J. K. et al. Hepatic and renal effects of peroxisome proliferators: biological implications. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 386, p. 81-110, 1982.
- 114 BRIGUGLIO, E. et al. WY-14643, a Potent Peroxisome Proliferator Activator Receptor- α PPAR- α Agonist Ameliorates the Inflammatory Process Associated to Experimental Periodontitis. **PPAR Research**, v. 2010, p. 193019, 2010.
- 115 DELERIVE, P.; FRUCHART, J. C.; STAELS, B. Peroxisome proliferator-activated receptors in inflammation control. **Journal of Endocrinology**, v. 169, n. 3, p. 453-9, 2001.
- 116 KLEEMANN, R. et al. Evidence for anti-inflammatory activity of statins and PPARalpha activators in human C-reactive protein transgenic mice in vivo and in cultured human hepatocytes in vitro. **Blood**, v. 103, n. 11, p. 4188-94, 2004.
- 117 DEVCHAND, P. R. et al. The PPARalpha-leukotriene B4 pathway to inflammation control. **Nature**, v. 384, n. 6604, p. 39-43, 1996.
- 118 SAIKA, S. Yin and yang in cytokine regulation of corneal wound healing: roles of TNF-alpha. **Cornea**, v. 26, n. 9, p. S70-4, 2007. Supl 1.
- 119 ZHANG, J. Z.; WARD, K. W. WY-14 643, a selective PPAR{alpha} agonist, induces proinflammatory and proangiogenic responses in human ocular cells. **International Journal of Toxicology**, v. 29, n. 5, p. 496-504, 2010.

- 120 LEHMANN, J. M. et al. Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 6, p. 3406-10, 1997.
- 121 YEATES, T. O.; FAM, B. C. Protein crystals and their evil twins. **Structure**, v. 7, n. 2, p. R25-9, 1999.
- 122 BÉNARDEAU, A. et al. Aleglitazar, a new, potent, and balanced dual PPARalpha/gamma agonist for the treatment of type II diabetes. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 9, p. 2468-73, 2009.
- 123 NOLTE, R. et al. Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. **Nature**, v. 395, n. 6698, p. 137-43, 1998.
- 124 ARTIS, D. R. et al. Scaffold-based discovery of indeglitazar, a PPAR pan-active anti-diabetic agent. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, v. 106, n. 1, p. 262-7, 2009.
- 125 RAU, O. et al. Alpha-alkyl substituted pirinixic acid derivatives as potent dual agonists of the peroxisome proliferator activated receptor alpha and gamma. **Archiv der Pharmazie (Weinheim)**, v. 341, n. 3, p. 191-5, 2008.
- 126 LI, J. et al. Discovery of an oxybenzylglycine based peroxisome proliferator activated receptor alpha selective agonist 2-((3-((2-(4-chlorophenyl)-5-methyloxazol-4-yl)methoxy)benzyl)(methoxycarbonyl)amino)acetic acid (BMS-687453). **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 7, p. 2854-64, 2010.
- 127 GRETHER, U. et al. Design and biological evaluation of novel, balanced dual PPARalpha/gamma agonists. **ChemMedChem**, v. 4, n. 6, p. 951-6, 2009.
- 128 SIERRA, M. L. et al. Substituted 2-[(4-aminomethyl)phenoxy]-2-methylpropionic acid PPARalpha agonists. 1. Discovery of a novel series of potent HDLc raising agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, n. 4, p. 685-95, 2007.
- 129 CRONET, P. et al. Structure of the PPARalpha and -gamma ligand binding domain in complex with AZ 242; ligand selectivity and agonist activation in the PPAR family. **Structure**, v. 9, n. 8, p. 699-706, 2001.
- 130 WANG, W. et al. Discovery of azetidinone acids as conformationally-constrained dual PPARalpha/gamma agonists. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, n. 6, p. 1939-44, 2008.
- 131 OYAMA, T. et al. Adaptability and selectivity of human peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) pan agonists revealed from crystal structures. **Acta Crystallographica section D: Biological Crystallography**, v. 65, n. Pt 8, p. 786-95, 2009.

- 132 OON HAN, H. et al. Design and synthesis of oxime ethers of alpha-acyl-beta-phenylpropanoic acids as PPAR dual agonists. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters** v. 17, n. 4, p. 937-41, 2007.
- 133 BRUNING, J. B. et al. Partial agonists activate PPARgamma using a helix 12 independent mechanism. **Structure**, v. 15, n. 10, p. 1258-71, 2007.
- 134 MONTANARI, R. et al. Crystal structure of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) ligand binding domain complexed with a novel partial agonist: a new region of the hydrophobic pocket could be exploited for drug design. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, n. 24, p. 7768-76, 2008.
- 135 AMBROSIO, A. et al. Ajulemic acid, a synthetic nonpsychoactive cannabinoid acid, bound to the ligand binding domain of the human peroxisome proliferator-activated receptor gamma. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 25, p. 18625-33, 2007.
- 136 JOHNSON, B. A. et al. Ligand-induced stabilization of PPARgamma monitored by NMR spectroscopy: implications for nuclear receptor activation. **Journal of Molecular Biology**, v. 298, n. 2, p. 187-94, 2000.
- 137 PAN, Z. et al. TRPV1 activation is required for hypertonicity-stimulated inflammatory cytokine release in human corneal epithelial cells. **Investicative Ophthalmology & Visual Science**, v. 52, n. 1, p. 485-93, 2011.
- 138 MARTÍNEZ, L. et al. Gaining ligand selectivity in thyroid hormone receptors via entropy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, v. 106, n. 49, p. 20717-22, 2009.
- 139 BLEICHER, L. et al. Structural basis of GC-1 selectivity for thyroid hormone receptor isoforms. **BMC Structural Biology**, v. 8, p. 8, 2008.
- 140 PUHL, A. C. et al. Mode of peroxisome proliferator-activated receptor γ activation by luteolin. **Molecular Pharmacology**, v. 81, n. 6, p. 788-99, 2012.
- 141 FORMAN, B. M.; CHEN, J.; EVANS, R. M. Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, v. 94, n. 9, p. 4312-7, 1997.
- 142 SPORN, M. B.; SUH, N.; MANGELSDORF, D. J. Prospects for prevention and treatment of cancer with selective PPARgamma modulators (SPARMs). **Trends in Molecular Medicine**, v. 7, n. 9, p. 395-400, 2001.

- 143 OLEFSKY, J. M. Treatment of insulin resistance with peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. **Journal of Clinical Investigation**, v. 106, n. 4, p. 467-72, 2000.
- 144 SIDDIQUI, R. A. et al. Omega 3-fatty acids: health benefits and cellular mechanisms of action. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 4, n. 8, p. 859-71, 2004.
- 145 COLOMER, R. et al. N-3 fatty acids, cancer and cachexia: a systematic review of the literature. **British Journal of Nutrition**, v. 97, n. 5, p. 823-31, 2007.
- 146 EDWARDS, I. J.; O'FLAHERTY, J. T. Omega-3 Fatty Acids and PPARgamma in Cancer. **PPAR Research**, v. 2008, p. 358052, 2008.
- 147 WAKU, T. et al. Structural insight into PPARgamma activation through covalent modification with endogenous fatty acids. **Journal of Molecular Biology**, v. 385, n. 1, p. 188-99, 2009.
- 148 MALAPAKA, R. R. et al. Identification and mechanism of a ten carbon fatty acid as a modulating ligand of peroxisome proliferator activated receptors. **Journal of Biological Chemistry**, 2011.

Mode of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Activation by Luteolin
Ana C. Puhl, Amanda Bernardes, Rodrigo Daniel M. Saidenberg, Mario S. Palma, Daniel M. Saidenberg, Muriel S. Glatf., and I. H. Campos, Webb.
OPEN ACCESS Freely available online
PLOS ONE

Structural Insights into Human Peroxisome Proliferator Activated Receptor Delta (PPAR-Delta) Selective Ligand Binding
Amanda Bernardes^{1,2}, Fernanda A. H. Batista^{1,2}, Mario de Oliveira Neto¹, Ana Carolina M. Figueira¹, Paul Webb³, Daniel Saidenberg^{4,5}, Mario S. Palma^{1,2}, Igor Polikarpov^{1,6}
OPEN ACCESS Freely available online
PLOS ONE

Low-Resolution Molecular Models Reveal the Oligomeric State of the PPAR and the Conformational Organization of Its Domains in Solution
Amanda Bernardes^{1,2}, Fernanda A. H. Batista^{1,2}, Mario de Oliveira Neto¹, Ana Carolina M. Figueira¹, Paul Webb³, Daniel Saidenberg^{4,5}, Mario S. Palma^{1,2}, Igor Polikarpov^{1,6}
OPEN ACCESS Freely available online
PLOS ONE

ANEXO

Lista de Artigos
Publicados

Artigos publicados durante o período de doutoramento

1. BERNARDES, A.; BATISTA, F.A.; DE OLIVEIRA NETO, M.; FIGUEIRA, A.C.; WEBB, P.; SAIDEMBERG, D.; PALMA, M.S.; POLIKARPOV, I. Low-resolution molecular models reveal the oligomeric state of the PPAR and the conformational organization of its domains in solution. **PLoS One**, v. 7, n. 2, p. e31852, 2012.
DOI: 10.1371/journal.pone.0031852.

2. PUHL, A.C.; BERNARDES, A.; SILVEIRA, R.L.; YUAN, J.; CAMPOS, J.L.; SAIDEMBERG, D.M.; PALMA, M.S.; CVORO, A.; AYERS, S.D.; WEBB, P.; REINACH, P.S.; SKAF, M.S.; POLIKARPOV, I. Mode of peroxisome proliferator-activated receptor γ activation by luteolin. **Molecular Pharmacology**, v. 81, n. 6, p. 788-99, 2012.
DOI: 10.1124/mol.111.076216.

3. BATISTA, F.A.; TRIVELLA, D.B.; BERNARDES, A.; GRATIERI, J.; OLIVEIRA, P.S.; FIGUEIRA, A.C.; WEBB, P.; POLIKARPOV, I. Structural insights into human peroxisome proliferator activated receptor delta (PPAR-delta) selective ligand binding. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. e33643, 2012.
DOI: 10.1371/journal.pone.0033643.

4. BERNARDES, A.; SOUZA, P.C.T.; MUNIZ, J.R.C.; RICCI, C.G.; AYERS, S.D.; PAREKH, N.M.; GODOY, A.S.; TRIVELLA, D.B.B.; REINACH, P.S.; WEBB, P.; SKAF, M.S.; POLIKARPOV, I. Molecular Mechanism of Peroxisome Proliferator-activated Receptor α Activation by WY14643: a New Mode of Ligand Recognition and Receptor Stabilization. **Journal of Molecular Biology**, 2013, *In Press*.
DOI: 10.1016/j.jmb.2013.05.010.