

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

JADEMILSON CELESTINO DOS SANTOS

**Caracterização estrutural dos complexos entre os receptores
ativadores da proliferação de peroxissomos (PPARs) dos tipos
alfa e gama e seus agonistas**

São Carlos
2014

JADEMILSON CELESTINO DOS SANTOS

**Caracterização estrutural dos complexos entre os receptores
ativadores da proliferação de peroxissomos (PPARs) dos tipos
alfa e gama e seus agonistas**

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
2014

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)

Santos, Jademilson Celestino dos
Caracterização estrutural dos complexos entre os
receptores ativadores da proliferação de peroxissomos
(PPARs) dos tipos alfa e gama e seus agonistas /
Jademilson Celestino dos Santos; orientador Igor
Polikarpov - versão corrigida -- São Carlos, 2014.
131 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em
Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física
de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2014.

1. Receptores nucleares. 2. PPARs. 3. Agonista.
4. Descobrimto de farmacos. 5. Diabetes tipo 2. I.
Polikarpov, Igor , orient. II. Título.

*Dedico aos meus pais, **Maria Leluza e Francisco**, por serem exemplos de honestidade e perseverança em minha vida.*

e

*À minha amada **Ynaê**, cada vez mais fonte de inspiração e companheirismo.*

Amo vocês cada dia mais!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus Todo Poderoso, por me guiar nesse trabalho e por me dá forças para realização de mais um sonho;

À toda minha família, especialmente, meus pais e minhas irmãs, que em seu inesgotável apoio me guiaram para mais uma grande conquista;

À minha noiva e futura esposa Ynaê, que sempre me apoiou nesse projeto chamado Doutorado, mesmo que pelo custo de ficarmos dois anos distantes um do outro. Obrigado por ser paciente;

À Amanda Bernardes e Ana Puhl por toda a ajuda com os receptores nucleares e também por tornar as coletas no LNLS mais divertidas;

Ao meu orientador Igor Polikarpov;

Aos meus colaboradores Rosa Amoroso e Alessandro Nascimento;

Aos professores com quem tive aulas durante esse meu período de pós-graduação, em especial aos professores: Richard C. Garratt, Cristina Kurachi, Ricardo de Marco, Eduardo Horjales, Otávio Thiemann, Ilana Camargo, Leandro Martinez, Nelma Regina e Maria Teresa (UFSCAR);

Aos técnicos do nosso lab Livia Manzine, Maria Auxiliadora, Suzana e Josimar;

À todos os Funcionários do IFSC principalmente o pessoal da gráfica, da pós-graduação e Biblioteca;

Ao LNLS e todos seus funcionários por sempre nos receber e possibilitar as medidas de difração de raios-x e fluorescência;

Aos amigos do lab Marco Kadowaki, César, Daiana, Fernando Bachega, Livia Faim Fer Costa, Maluf, Vanessa, André, Jéssica, Ivan, Marisa, Fran, Tavin, Carol, Dani Trivella, Nicoli, Ricardo, Wally, Evandro, Udi e Flávio;

Ao Carlos Marek por me receber e alojar-me nos primeiros dias em São Carlos;

Aos Amigos de SanCa Pastor Jarbas e irmã Luci, Marcelo e Amanda Eler, Fernando Zuher, Marcos Felipe, Débora, Simei, Leos Cristino, Medrano e Peres, Bruno Colossi, Olibário, Danilo e Jú, Daniels, Anderson, Henrique e Aline, Eg, Jarbinhas, Martinha, Naiara, Noeli, Maira e todos da PIBSC;

À FAPESP, pelo belo suporte financeiro.

Em fim, à todas as pessoas, que colaboraram de forma direta ou indireta para que esse trabalho tenha sido realizado, ofereço um enorme agradecimento.

"I do not think our civilization has succeeded in discovering and explaining all the principles acting in the universe. I include the concept of God among these principles. I am happy to accept the concept without trying to define it precisely. I know that the concept of God helped me to master many questions in life; it guides me in critical situations and I see it confirmed in many deep insights into the beauty of the functioning of the living world."

Werner Arber
Prêmio Nobel em Medicina em 1978

RESUMO

SANTOS, J. C. **Caracterização estrutural dos complexos entre os receptores ativadores da proliferação de peroxissomos (PPARs) dos tipos alfa e gama e seus agonistas.** 2014. 131p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

Os receptores ativadores da proliferação de peroxissomos (PPARs) são fatores de transcrição dependentes da ligação de ligante e possuem um papel chave no controle do metabolismo dos lipídios e da glicose. Existem três isotipos desse receptor: PPAR α , PPAR β e PPAR γ . O PPAR γ é alvo molecular para os compostos TZDs, os quais são fármacos usados clinicamente no controle da diabetes do tipo 2, aumentando a sensibilidade à insulina. Enquanto que os fibratos são os fármacos que atuam no PPAR α e são utilizados para diminuir os níveis de triglicerídeos. A maioria dos pacientes que sofrem com a diabetes do tipo 2 apresentam desordens no metabolismo de lipídios. Mesmo com a existência de fármacos capazes de controlar estas desordens metabólicas, a busca de um agonista dual para os PPAR α e PPAR γ é um grande desafio no controle da síndrome metabólica, uma vez que este composto pode combinar os dois efeitos terapêuticos em uma única molécula. O GL479 é um agonista dual que foi sintetizado com dois grupos farmacóforos, ligando-se tanto ao PPAR α quanto ao PPAR γ . Dentro desse contexto, este estudo apresenta as bases estruturais de interação do agonista dual GL479 aos PPARs por meio da determinação estrutural dos complexos PPAR α -LBD:GL479 e PPAR γ -LBD:GL479. A análise detalhada desses complexos revelou diferentes modos de interação do ligante em cada receptor, porém em ambos os casos o GL479 interage com a Tyr da H12. Na estrutura do PPAR α -LBD, o ligante adquiriu a característica de um agonista total e no caso do PPAR γ -LBD, o GL479 adotou características de um agonista parcial dependente da interação com a H12. Além das análises do agonista dual, 16 compostos foram identificados por *docking* como ligantes do PPAR γ . Três desses ligantes (**8**, **10** e **15**) foram caracterizados por ThermoFluor e fluorescência de polarização com valores de IC₅₀ menor que 10 μ M. Adicionalmente, um dos compostos identificados no *docking* (**16**) foi co-cristalizado com PPAR γ -LBD. A conformação adotada pelo ligante não permitiu que ele interagisse diretamente com a H12, sugerindo que este composto possa atuar como um agonista parcial independente da H12. Todas estas descobertas podem ser exploradas no desenho de novos moduladores dos PPARs com menores efeitos adversos ou até mesmo na busca de agonistas duais PPAR α/γ , que combine os efeitos terapêuticos no tratamento da diabetes do tipo 2 e da dislipidemia.

Palavras-chave: Receptores nucleares. PPARs. Agonista dual. Descobrimiento de fármacos.
Diabetes tipo 2.

ABSTRACT

SANTOS, J. C. **Structural characterization of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) types alpha and gamma complexes and its agonists.** 2014. 131p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) are ligand-dependent transcription factors that control various functions in human organism and they play key roles in the control of glucose and lipid metabolism. There are three different PPAR isotypes: PPAR α , PPAR β e PPAR γ . PPAR γ is a molecular target of TZD agonists, which are clinically used drugs in the control of type 2 diabetes by increasing insulin sensitivity. Whereas fibrates are drugs that act on PPAR α and are used to lower serum triglyceride levels. Most of these patients who have type 2 diabetes also display lipid metabolism disorders. Even with the existence of drugs that can control these metabolic disorders, the search of dual agonist for PPAR α and PPAR γ is a major challenge in the control of metabolic syndrome, because this compound could combine both therapeutic effects in a single molecule. GL479 is a dual agonist that was synthesized based on a combination of two key pharmacophores, with the ability to bind in the both PPARs, α and γ . Thus, this study reveals the structural basis for this dual agonist GL479 by structural determination of the complexes PPAR α -LBD:GL479 and PPAR γ -LBD:GL479. The detailed analysis of these complexes showed different ligand binding modes for each receptor, however, in both cases the GL479 interacted with the Tyr of H12. In the PPAR α -LBD structure the ligand acquired the features of full agonist and in the case of PPAR γ -LBD, GL479 adopted features of a partial agonist dependent of H12 interaction. In addition to the dual agonist analysis, sixteen compounds were identified as PPAR γ ligand by docking. Three of these ligands were characterized by ThermoFluor and fluorescence polarization, which resulted in IC₅₀ values smaller than 10 μ M. Additionally, one of the compounds, identified by docking, was co-crystallized with PPAR γ . The ligand conformation adopted did not allow it a direct interaction with the H12. These contacts were mediated by one water molecule, suggesting this compound might also act as a partial agonist, independent of H12 interaction. All these findings may be explored for the design of PPARs novel modulators with lower side effects, as well, in the exploration of dual agonists PPAR α/γ that combines the therapeutic effects in the treatment of type 2 diabetes and dyslipidemia.

Keywords: Nuclear receptors. PPARs. Dual agonist. Drug discovery. Type 2 diabetes.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Distribuição mundial da diabetes entre os anos de 2000-2010. Os valores dos boxes superiores e do meio representam o número de pessoas em milhões com diabetes nos anos de 2000 e 2010, respectivamente. Os valores dos boxes inferiores indicam a percentagem do aumento de casos nesse intervalo de tempo para cada continente. Na parte inferior da figura são demonstrados os valores globais dos casos de diabetes. 30
- Figura 2- Organização funcional e estrutural dos receptores nucleares. (A) Representação intacta da estrutura do PPAR γ e seus domínios, incluindo o DBD em lilás, a *hinge* em verde, o LBD em vermelho. A região N-terminal da estrutura está omissa devido a sua alta mobilidade (PDB 3DZU). (B) As cinco regiões características divididas em domínios, formam um receptor nuclear típico. 33
- Figura 3- Desenho esquemático do LBD em dois diferentes estados conformacionais. O esquema da esquerda representa o RXR na forma apo, com a H12 na conformação inativa. À direita temos o RXR ligado a um agonista, o qual provocou uma mudança da proteína para a conformação ativa. Em ambas as estruturas, a H12 está colorida em azul. 35
- Figura 4- Esquema para a dimerização dos receptores nucleares e sequências de ligação ao DNA. Da esquerda para direita: receptores homodímeros (palíndromo repetido), heterodímeros do RXR (sequência hexanucleotídica direta espaçada) e receptor órfão monomérico. A seta indica a sequência consenso de reconhecimento dos receptores nucleares (AGGTCA) ou uma variante. 36
- Figura 5- Esquema da regulação molecular da transcrição positiva dos PPARs. Após a ativação pelo ligante, os PPARs heterodimerizam com o RXR. A heterodimerização é essencial para o recrutamento de coativadores, o qual inicia o processo de transcrição recrutando toda a maquinaria transcricional, incluindo a RNA polimerase e os coativadores da histona acetiltransferase. Isso faz com que ocorra a remodelação da cromatina e, conseqüentemente, o aumento da transcrição. 38
- Figura 6- Enovelamento e alinhamento do LBD dos PPARs. Na figura superior está a representação em tubos das 13 hélices- α que formam o enovelamento característico do LBD dos PPARs. Essa nomenclatura das estruturas secundárias foi baseada na estrutura do RXR. Uma das diferenças mais evidentes entre o enovelamento dos PPARs para os demais receptores nucleares é a presença de uma hélice- α extra (H2'). Na parte inferior da figura, está presente o alinhamento dos três isotipos e os resíduos que compõem as suas respectivas estruturas secundárias. As estrelas em destaque mostram os resíduos polares que formam as principais ligações de hidrogênio com os ligantes no LBP dos PPARs..... 39

Figura 7-	Algumas funções metabólicas dos PPARs. O PPAR α no fígado tem a função de captação e oxidação dos ácidos graxos; o PPAR β diminui a produção de glicose; e o PPAR γ aumenta a lipogênese e a sensibilidade à insulina. No músculo esquelético, todos os PPARs participam na regulação da oxidação e transporte de ácidos graxos. No tecido adiposo, aumentam a sensibilidade à insulina, termogênese e a diferenciação celular, participando diretamente na prevenção da obesidade. Todos os isotipos podem atuar na diminuição de citocinas inflamatórias inibindo a cascata do processo inflamatório. Nas artérias, os PPARs têm participado no aumento do colesterol HDL e na diminuição dos triglicerídeos. Além disso, a ativação do PPAR β no coração aumenta função contrátil e pode melhorar a cardiomiopatia.	40
Figura 8-	Estruturas químicas dos agonistas do PPAR α utilizados clinicamente.	45
Figura 9-	Estruturas químicas dos TZDs do PPAR γ	46
Figura 10-	Estruturas químicas de alguns agonistas duais do PPAR α/γ	48
Figura 11-	Esquema dos componentes de um agonista típico dos PPARs. A parte superior indica os grupos químicos necessários para a formação de um agonista dos PPARs. Esses agonistas são formados principalmente por três diferentes grupos: grupo carboxílico, um centro aromático e uma cauda lipofílica. Esses grupos são conectados por grupos químicos chamados de <i>linkers</i> . Os <i>linkers</i> atuam diretamente na afinidade e potência destes agonistas. A estrutura química acima corresponde ao GL479 e suas partes correspondentes a um agonista de PPAR.	60
Figura 12-	Estruturas químicas dos ligantes selecionados pelo <i>docking</i> molecular. Há uma alta diversidade estrutural de moléculas, que variam de muito volumosas (11 e 14) à outras menos volumosas (2 e 3). Na maioria das estruturas o grupo polar ácido carboxílico está presente. No entanto, alguns ligantes com o anel tetrazol foram selecionados (3 , 8 e 16).	63
Figura 13.	Representação esquemática do ensaio de ThermoFluor. Inicialmente temos a formação do complexo proteína:ligante. À medida que ocorre o aumento da temperatura a proteína é desnaturada, expondo seus sítios hidrofóbicos. Nestes sítios ocorre a ligação da sonda SYPRO Orange, que é detectada através da fluorescência emitida pela sonda. No gráfico são apresentadas duas medidas diferentes em lilás a medida é referente à proteína nativa e em laranja é referente ao complexo proteína ligante. Observa-se que a proteína nativa apresenta T _m menor que a proteína complexada ao ligante. O significado físico-químico deste experimento é que o ligante é capaz de aumentar a estabilidade da proteína quando formado o complexo.	64
Figura 14-	Esquema do ensaio de fluorescência de polarização. A figura acima mostra o perfil competitivo do ensaio. Inicialmente o ligante fluorescente liga-se no sítio ativo da proteína emitindo uma alta polarização. Após a adição do ligante testado, ocorre uma competição pela ligação ao PPAR γ e, à medida que o deslocamento do ligante fluorescente acontece a polarização diminui.	66

- Figura 15- Esquema para cristalização de proteínas por difusão em vapor. (A) O diagrama de fases é dividido em quatro zonas. Zona estável ou solúvel, metaestável, nucleação e precipitação. O eixo y representa a concentração da proteína e o eixo x representa a concentração do agente precipitante. Outros parâmetros de solubilidade podem também ser utilizados, tais como: temperatura, pH, etc. À medida que a concentração do agente precipitante aumenta, a solubilidade da proteína diminui. (B) Experimento de difusão de vapor com a gota sentada. Nesse método a gota fica sentada em uma plataforma e a cristalização ocorre após a proteína atingir o equilíbrio com a solução do poço. (C) Na difusão de vapor por gota pendurada, a gota fica pendurada em uma lamínula siliconizada. Após atingir o equilíbrio, os cristais da proteína crescem na gota. 67
- Figura 16- Gel de poliacrilamida 15% com diferentes passos da purificação em (A) PPAR α -LBD e (B) PPAR γ -LBD. **MM** Marcador de massa molecular (66 kDa, 45 kDa, 36 kDa, 29 kDa, 20 kDa e 12 kDa). As bandas mais abundantes entre **1** pelet, **2** sobrenadante e de **3-8** correspondem aos PPARs em diferentes passos da purificação. Gel corado com Comassie Blue..... 73
- Figura 17- Cromatogramas de cromatografia por exclusão molecular de (A) PPAR α -LBD e (B) PPAR γ -LBD. Os picos de maior intensidade correspondente ao volume inicial de 60 mL são os picos das proteínas. No gel, **MM** representa o marcador de massa molecular (66 kDa, 45 kDa, 36 kDa, 29 kDa, 20 kDa e 12 kDa). Em **1** e **2** frações coletadas da proteína pura. Gel de poliacrilamida 15% corado com Comassie Blue. 74
- Figura 18- Gel de poliacrilamida 15% da clivagem da cauda de histidina corado com Comassie Blue (A) PPAR α -LBD e (B) PPAR γ -LBD. **MM** Marcador de peso molecular (66 kDa, 45 kDa, 36 kDa, 29 kDa, 20 kDa e 12 kDa); **1** Antes da clivagem e **2** Depois da clivagem. 74
- Figura 19- Cristais e padrão de difração da proteína PPAR α -LBD complexada com o GL479. (A) A gota superior representa os primeiros cristais em forma de agulhas finas do complexo PPAR α -LBD:GL479 utilizando a técnica da gota sentada com *kits* de cristalização. Na gota inferior estão os cristais utilizados na difração por raios-X, estes cristais cresceram utilizando a técnica de difusão de vapor com a gota pendurada e foram otimizados a partir dos primeiros cristais obtidos. A condição de cristalização continha 27% PEG 20000, 100 mM Tris-HCl pH 7,0. (B) Padrão de difração do complexo PPAR α -LBD:GL479, com a resolução máxima obtida de 2,30 Å..... 76
- Figura 20- Estrutura do PPAR α -LBD ligado ao GL479. O esquema representa uma visão geral do monômero do PPAR α -LBD:GL479. O ligante está sendo mostrado em *ball e stick*, envolto por uma superfície em amarelo. A H12 apresenta conformação ativa e foi colorida em lilás..... 78
- Figura 21- Cristais e padrão de difração da proteína PPAR γ -LBD complexado com GL479. (A) Cristais utilizados na difração por raios - X. Esses cristais cresceram utilizando a técnica de difusão de vapor com a gota pendurada. A condição de cristalização continha 1,1 M de citrato de sódio tribásico, 100

- mM Hepes pH 7,5. (B) Padrão de difração do complexo PPAR γ -LBD:GL479, a resolução máxima obtida foi de 1,77 Å..... 79
- Figura 22- Estrutura do PPAR γ -LBD complexado com GL479. Representação do dímero na unidade assimétrica do PPAR γ -LBD com o GL479. As hélices em ambas as cadeias estão representadas em azul, com exceção das H12 que estão em lilás. O GL479 está representado em *ball e stick* predominantemente ciano, envolta por uma superfície também em ciano..... 80
- Figura 23- Caracterização do sítio ativo dos PPARs. O monômero do PPAR α -LBD (laranja) foi superposto ao monômero ativo do PPAR γ -LBD (azul-claro). As esferas demonstram os três braços que compõe o sítio ativo. O braço I representa o braço polar do sítio e foi colorido em vermelho, o braço II e III foram coloridos em azul e verde, respectivamente e representa a parte apolar do LBP..... 81
- Figura 24- Caracterização estrutural do GL479 no PPAR α -LBD. (A) O *omit map* do GL479 para o complexo em *2Fo-Fc*, o contorno mostrado para o ligante é de 1,0 σ . (B) Ligações de hidrogênio envolvidas na estabilização do ligante, observe que o GL479 possui na sua cabeça polar um grupo carboxílico que faz interações com os resíduos polares do braço I do LBP do PPAR α . Os resíduos que fazem estes contatos estão em *stick*. Uma destas interações envolve a Tyr464 da H12 (lilás), essa interação resulta na estabilização da conformação ativa da H12..... 82
- Figura 25- Caracterização estrutural do GL479 no PPAR γ -LBD na conformação ativa (A) O *omit map* do GL479 para o complexo em *2Fo-Fc*, o contorno mostrado para o ligante é de 1,0 σ . (B) Ligações de hidrogênio envolvidas na estabilização do ligante, observe que o GL479 possui na sua cabeça polar um grupo carboxílico que faz interações com os resíduos polares do braço I do LBP do PPAR γ . Os resíduos que fazem estes contatos estão em *stick*. Uma destas interações envolve a Tyr473 da H12 (lilás), essa interação resulta na conformação ativa da H12..... 83
- Figura 26- Sobreposição dos complexos PPAR α -LBD:GL479 (laranja) e PPAR γ -LBD:GL479 (azul). O GL479 ocupa o LBP dos PPAR α e γ em distintas configurações. O grupo carboxílico adota essencialmente a mesma conformação em ambas as estruturas. No entanto, a cauda hidrofóbica do ligante alterna em duas configurações. No modo de ligação do PPAR α , a cauda hidrofóbica foi dobrada em direção à região do braço III do LBP. No segundo modo de ligação, dentro LBP do PPAR γ , a cauda hidrofóbica do GL479 fica dobrada para baixo em direção ao braço II do LBP. O GL479 das duas estruturas estão mostrados em *ball e stick*, em amarelo está o GL479 para o PPAR α e em azul para o PPAR γ 84
- Figura 27- Detalhes atômicos do reconhecimento do GL479 pelo PPAR γ -LBD na conformação inativa (Cadeia B). (A) *Omit map* em *2Fo-Fc* mostrado em um contorno de 1.0 σ em torno do ligante. (B) Ligações de hidrogênio envolvida na estabilização do ligante, na cadeia B o ligante não interage com a H12. 85

- Figura 28- Comparação estrutural entre os modelos do LBD dos PPAR α e PPAR γ . (A) Sobreposição do GL479 ligado ao PPAR α (laranja) e PPAR γ (azul). Somente os resíduos que estão envolvidos nas interações apolares são mostrados. A posição da Ala292 no PPAR γ é substituída por uma Thr273 no PPAR α , este último resíduo apresenta uma cadeia lateral mais volumosa (*dots*) que a Ala, impedindo que o anel pertencente à cauda hidrofóbica do ligante acomode-se para formar o complexo na mesma região que a do PPAR γ . (B) Em todas as estruturas complexadas com o PPAR α -LBD, os ligantes adotam uma conformação em forma de U no LBP. Essa conformação também foi a ocupada para o GL479 (em *ball* e *stick* amarelo). (C) A maioria dos agonistas do PPAR γ -LBD estão na conformação em forma de U, porém alguns agonistas adotam a conformação na forma de S, o GL479 está na conformação em S (*ball* e *stick* em ciano). 87
- Figura 29- Dinâmica do GL479 ilustrada através da variação dos B-fatores. Na esquerda está a barra de distribuição dos valores dos B-fatores do GL479 ligado ao PPAR α -LBD e a direita a do GL479 ligado ao PPAR γ -LBD. Observa-se que em ambas estruturas a cabeça polar é mais bem estabilizada em relação a cauda lipofílica do ligante. Essa estabilização acontece devido as ligações de hidrogênio que a cabeça polar do ligante realiza com as cadeias laterais dos PPARs. 88
- Figura 30- Estabilização induzida pela o GL479 em diferentes regiões do PPAR α e PPAR γ . A largura das representações e a coloração são proporcionais à mobilidade térmica das regiões. (A) PPAR γ -LBD:GL479. (B) PPAR α -LBD:GL479. 89
- Figura 31- Sobreposição do GL479 nos monômeros ativos dos agonistas duais PPAR α/γ com estruturas resolvidas. O GL479 é o único agonista dual com estruturas resolvidas que apresenta modos de ligações diferentes. No PPAR α em azul, o GL479 ocupa os braços I e II do LBP. O PPAR γ está em amarelo e ocupa os braços I e III. 90
- Figura 32- Gráfico do ThermoFluor para os compostos identificados como ligantes do PPAR γ . A primeira derivada dos dados de fluorescência de ThermoFluor (dF/dT) versus a temperatura para os treze compostos solúveis, rosiglitazona (controle positivo) e o receptor na forma apo. A linha vertical marca o ponto de inflexão dos compostos **10** (T_M=49°C), **15** (T_M=53°C) e rosiglitazona (T_M=49°C). 96
- Figura 33- Gráficos dos ensaios de competição de fluorescência de polarização. Os dados são referentes à rosiglitazona (superior a esquerda), ligante **7** (superior a direita), ligante **8** (inferior a esquerda) e ligante **15** (inferior a direita). 97
- Figura 34- Interações preditas por *docking* molecular entre o ligante **16** e o receptor nuclear PPAR γ . As ligações de hidrogênios são mostradas em linhas pretas pontilhadas. 98
- Figura 35- Cristais e padrão de difração da proteína PPAR γ -LBD complexado com o ligante **16**. (A) Cristais utilizados na difração por raios-X. Estes cristais

cresceram utilizando a técnica de difusão de vapor com a gota pendurada e a condição de cristalização continha 0,9 M de citrato de sódio tribásico, 100 mM hepes pH 7,0. (B) Padrão de difração do complexo PPAR γ -LBD:**16**, a resolução máxima obtida foi de 2,2 Å. 99

Figura 36- Estrutura do PPAR γ -LBD complexada ao ligante **16**. Representação do dímero na unidade assimétrica do PPAR γ -LBD com o ligante **16**. As hélices- α da cadeia A (conformação ativa) estão representadas em azul e as da cadeia B (conformação inativa) em amarelo, as H12 são mostradas em lilás. O ligante **16** em ambas as cadeias estão representados em verde e *sticks*. 101

Figura 37- Detalhes estruturais do complexo PPAR γ -LBD:**16** na conformação ativa. A estrutura do ligante em linhas representa a conformação do *docking*, enquanto as em *sticks* representa a conformação cristalográfica com a densidade experimental em torno do ligante. O *omit map* também é mostrado em $2Fo-Fc$ com $1,0\sigma$ em torno do ligante. A H12 está colorida em ciano. 102

Figura 38- Detalhes estruturais do complexo PPAR γ -LBD:**16** na conformação inativa. Cadeia B do complexo PPAR γ :**16**. Apenas a Arg288 realiza ligações de hidrogênio com o ligante **16**. O *omit map* também é mostrado em $2Fo-Fc$ com $1,0\sigma$ em torno do ligante. A H12 está colorida em ciano. 103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Lista dos compostos selecionados após os resultados do <i>docking</i> molecular.	62
Tabela 2- Estatísticas cristalográficas da coleta e refinamento do PPAR α -LBD e PPAR γ -LBD complexados com o agonista dual GL479.....	77
Tabela 3- Valores experimentais do IC ₅₀ para fluorescência de polarização extraídos dos gráficos da Figura 33.	98
Tabela 4- Estatísticas cristalográficas da coleta e refinamento do PPAR γ -LBD complexado com o ligante 16	100

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

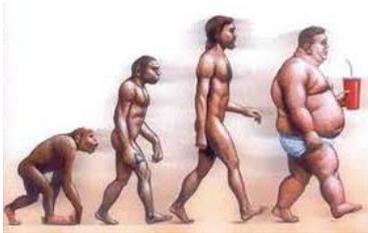
AF-1	Função de Ativação 1 (<i>Activation Function-1</i>)
AF-2	Função de Ativação 2 (<i>Activation Function-2</i>)
AP1	Proteína Ativadora 1 (<i>Activator Protein 1</i>)
AR	Receptor de Andrógeno (<i>Androgen Receptor</i>)
Cdk5	Quinase Dependente da Ciclina 5 (<i>Cyclindependent Kinase 5</i>)
DBD	Domínio de Ligação ao DNA (<i>DNA Ligand Domain</i>)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DR-1	Repetição Direta com Espaçamento de 1 Nucleotídeo (<i>Direct Repeat Motif Spaced by One Nucleotide</i>)
DR-2	Repetição Direta com Espaçamento de 2 Nucleotídeo (<i>Direct Repeat Motif Spaced by two Nucleotide</i>)
DTT	Ditiotreitol
ER	Receptor de Estrógeno (<i>Estrogen Receptor</i>)
FABP	Proteína Transportadora de Ácidos Graxos (<i>Fatty Acids Binding Protein</i>)
GL479	2-metil-2-(4-(2-(4-(fenildiazenil)fenóxi)etil)fenóxi) ácido propanoico
GLUT4	Transportador de Glicose do Tipo 4 (<i>Glucose Transporter Type 4</i>)
GR	Receptor Glicocorticóide (<i>Glucocorticoid Receptor</i>)
HAT	Histona Acetiltransferase (<i>Histone Acetyltransferase</i>)
HDAC	Histona Desacetilase (<i>Histone Deacetylase</i>)
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade (<i>High-density Lipoprotein</i>)
HNF-4	Fator 4 Nuclear de Hepatócito (<i>Hepatocyte nuclear factor 4</i>)
HSP	Proteínas de Choque Térmico (<i>Heat Shock Proteins</i>)
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzível (<i>Inducible nitric oxide synthase</i>)
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídeo
LBD	Domínio de Ligação ao Ligante (<i>Ligand Binding Domain</i>)

LBP	Bolso de Ligação do Ligante (<i>Ligand Binding Pocket</i>)
MM	Marcador de Massa Molecular
MR	Receptor Mineralocorticoide (<i>Minerolocorticoid Receptor</i>)
NTD	Domínio N-terminal (<i>N-Terminal Domain</i>)
PDB	Banco de Dados de Proteínas (<i>Protein Data Bank</i>)
PMSF	Fluoreto de Fenilmetilsulfonil (<i>phenylmethylsulfonyl fluoride</i>)
PPAR	Receptor Ativador da Proliferação de Perioxossomos (<i>Peroxisome Proliferator-activated Receptor</i>)
PPRE	Elementos Responsivos aos PPARs (<i>Peroxisome Proliferator Response Element</i>)
PR	Receptor da Progesterona (<i>Progesterone Receptor</i>)
RAR	Receptor de Ácido Retinóico (<i>Retinoic Acid Receptor</i>)
RMSD	Raiz Quadrada do Desvio Médio Quadrático (<i>Root-Mean-Square Deviation</i>)
RXR	Receptor X Retinóide (<i>Retinoid X Receptor</i>)
SPPAR γ Ms	Moduladores Seletivos do PPAR γ
SRC-1	Coativador 1 do Receptor Esteroide (Steroid Receptor Coactivator-1)
TLS	Translação/Libração/Parafuso (<i>Translation/Libration/Screw</i>)
TR	Receptor do Hormônio Tireoidiano (<i>Thyroid Hormone Receptor</i>)
VDR	Receptor de Vitamina D (<i>Vitamine D Receptor</i>)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	29
1.1 Síndrome Metabólica	29
1.2 Diabetes	29
1.3 Obesidade	31
1.4 Receptores nucleares	32
1.5 Os PPARs e seu mecanismo de ação	37
1.5.1 PPARα	40
1.5.2 PPARβ	42
1.5.3 PPARγ	43
1.5.4 Moduladores Terapêuticos dos PPARs	45
1.5.4.1 Fibratos.....	45
1.5.4.2 Tiazolidinedionas (TZDs).....	46
1.5.4.3 Agonista dual PPAR-LBD α/γ	47
2 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA	53
3 METODOLOGIA	57
3.1 Expressão dos domínios LBDs das proteínas PPARα e PPARγ	57
3.2 Purificação por cromatografia de afinidade	57
3.3 Cromatografia por exclusão de tamanho	58
3.4 Clivagem da Cauda de Histidina	59
3.5 Obtenção dos ligantes	59
3.5.1 Derivados sintéticos do ácido clofibrico	59
3.5.2 Identificação de ligantes por <i>docking</i> molecular	61
3.6 ThermoFluor	64
3.7 Ensaio competitivo	65
3.8 Cristalização dos complexos	66
3.8.1 PPARα-LBD:GL479	68
3.8.2 PPARγ-LBD-GL479	69
3.9 Coleta de dados e determinação estrutural	69
3.10 Refinamento e análise estrutural	70
4 Glitazars como monoterapia para o diabetes do tipo 2 e dislipidemia	73

4.1 Resultados	73
4.1.1 Expressão e purificação das proteínas PPARα-LBD e PPARγ-LBD	73
4.1.2 Cristalização, coleta de dados e determinação estrutural dos complexos com o agonista dual PPARα/γ-LBD:GL479	75
4.1.3 A ocupação do LBP dos PPARs versus o agonismo parcial/total	85
4.2 Discussão	90
5 Moduladores seletivos do PPARγ	95
5.1 Resultados	95
5.1.1 Identificação dos ligantes	95
5.1.2 ThermoFluor	95
5.1.3 Ensaio competitivo	96
5.1.4 Cristalização e coleta de dados do complexo PPARγ-LBD:16	98
5.1.5 Determinação estrutural e refinamento	100
5.2 Discussão	103
6 CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS	109
REFERÊNCIAS	111
ANEXOS	127



Capítulo 1

“The best way to have a good idea is to have lots of ideas.”

Linus Pauling

Prêmio Nobel em Química (1954) e da Paz em 1962.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Síndrome Metabólica

O conceito inicial de síndrome metabólica surgiu nas primeiras décadas do século XX e, desde então, tem ganhando mais atenção na comunidade médica e científica. Inicialmente, a síndrome metabólica estava associada a pacientes que apresentavam fatores de riscos relacionados com a hipertensão, hiperglicemia e gota. Passadas algumas décadas, o conceito inicial evoluiu para pacientes que apresentam desordens metabólicas, as quais resultam no aumento da prevalência da obesidade¹. Geralmente, estas desordens metabólicas estão associadas a resistência à insulina, dislipidemia (elevados níveis de triglicerídeos e baixas taxas do colesterol HDL), hipertensão e doenças na artéria coronária². O resultado de todas essas alterações por meio da síndrome metabólica causa uma disfunção no endotélio, levando a uma cascata de eventos inflamatórios. Todas estas mudanças tornam os pacientes com síndrome metabólica mais propício a desenvolver o diabetes do tipo 2 e complicações vasculares. As mudanças mais preocupantes são as associadas com as doenças da artéria coronária³.

A prevalência da síndrome metabólica tem aumentado em todo o mundo. Entretanto, estima-se que a ocorrência é dependente do sexo, idade e etnia. Outros fatores como o estilo de vida e a condição socioeconômica também influenciam na prevalência da síndrome metabólica. Apesar de existir um conjunto de doenças associadas à síndrome metabólica, a resistência à insulina e o acúmulo de tecido adiposo visceral continuam sendo os principais componentes em pacientes portadores desta síndrome^{1;4}.

1.2 Diabetes

Por um longo tempo, a diabetes foi considerada uma doença com pouca importância para a saúde mundial. Contudo, nos últimos anos, essa doença se posiciona como uma das principais ameaças à saúde humana no século XXI. Esse aumento explosivo de pessoas diagnosticadas com diabetes vem ocorrendo há aproximadamente duas décadas. Estudos

epidemiológicos indicaram que no ano 2000 a percentagem de pessoas com diabetes era de apenas 2,8 % da população. Entretanto, estima-se que esse valor aumentará com o passar dos anos, chegando a 4,8 % de uma população diabética em 2030⁵. A Figura 1 mostra a evolução da doença entre os anos de 2000 e 2010⁶. Em números mais compreensivos, a população diabética que em 2000 era de 171 milhões, passará até 2030 a 366 milhões. Os fatores que mais têm contribuído para o aumento da população com diabetes são as mudanças acentuadas no ambiente, sedentarismo e estilo de vida⁵.

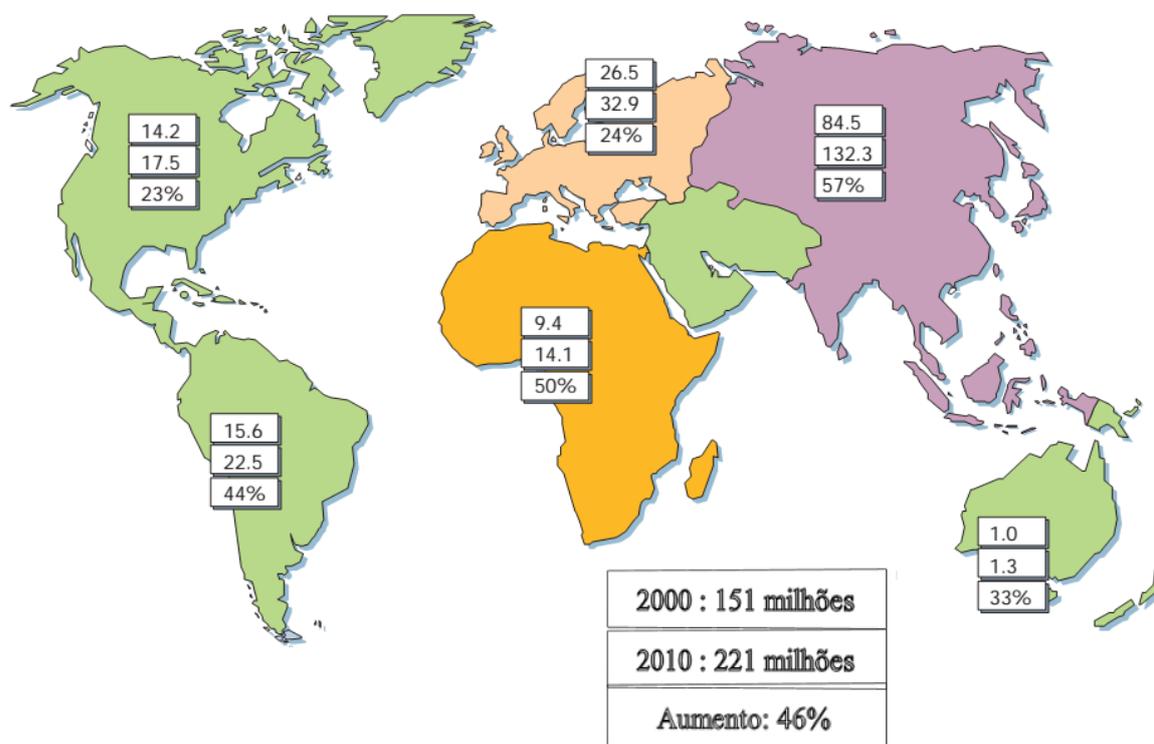


Figura 1- Distribuição mundial da diabetes entre os anos de 2000-2010. Os valores dos boxes superiores e do meio representam o número de pessoas em milhões com diabetes nos anos de 2000 e 2010, respectivamente. Os valores dos boxes inferiores indicam a percentagem do aumento de casos nesse intervalo de tempo para cada continente. Na parte inferior da figura são demonstrados os valores globais dos casos de diabetes.

Fonte: Adaptada de Zimmet *et al.*⁶.

O diabetes é um distúrbio metabólico crônico caracterizado por níveis elevados de glicose, devido a deficiência de insulina ou a resistência à insulina. Existem dois tipos principais de diabetes: a diabetes do tipo 1 e a diabetes tipo 2. A diabetes do tipo 1, previamente conhecida como diabetes insulino-dependente, tem sua ocorrência caracterizada

pela destruição auto-imune das células B do pâncreas, a qual resulta em absoluta deficiência do hormônio insulina. Pessoas com diabetes do tipo 1 recorrem a insulina exógena para a sobrevivência, prevenindo o desenvolvimento da cetoacidose diabética. Sua frequência é relativamente baixa em relação a diabetes do tipo 2, a qual responde por mais de 90% dos casos mundiais de diabetes. Por sua vez, a diabetes do tipo 2, também conhecida por diabetes não insulino-dependente, é caracterizada pela resistência à insulina e/ou secreção anormal da insulina. Pessoas com a diabetes do tipo 2 geralmente são obesas e não dependem de insulina exógena. A princípio o tratamento é dietético, contudo os agentes hipoglicemiantes tornam-se habitualmente necessário para o controle dos níveis de glicose no sangue⁷.

1.3 Obesidade

O excesso de peso é o sexto maior fator de risco que contribui para a carga global de doenças em todo o mundo. Aproximadamente 1,1 bilhão de adultos e 10% das crianças são consideradas acima do peso ou obesas. A obesidade é uma consequência direta de uma alimentação inadequada rica em carboidratos simples e do progressivo aumento do estilo de vida sedentário, o que leva a um acúmulo excessivo de tecido adiposo. Por definição, sobrepeso e obesidade são existentes quando o índice de massa corporal (IMC) são superiores a 25 e 30 kg/m², respectivamente⁸⁻⁹.

Pessoas obesas geralmente têm sua expectativa de vida diminuída, pois para a maioria dos casos essa doença mórbida está associada a diabetes do tipo 2, doenças cardiovasculares e vários tipos de câncer. A obesidade crônica desregula grande parte dos processos metabólicos, os quais incluem o metabolismo da insulina, dos ácidos graxos e lipídios, afetando diretamente o controle da glicemia, pressão arterial e colesterol. Esse conjunto de fatores leva a um ciclo interativo entre a obesidade, a diabetes do tipo 2 e a síndrome metabólica⁸⁻⁹.

A relação entre diabetes e obesidade merece algumas ressalvas. Embora a maioria das pessoas com diabetes sejam obesas ou acima do peso. O inverso fica limitado quando a obesidade é do periférica e não visceral, o qual nem sempre apresenta um quadro diabético, contrariando a obesidade visceral que está associada com a resistência à insulina e a outras doenças cardiovasculares¹⁰.

Alguns estudos consideram a obesidade como um processo inflamatório crônico de baixo grau. O fígado e, em particular, o tecido adiposo são os locais onde ocorrem essas

respostas inflamatórias. A obesidade leva a um aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias pelo tecido adiposo, fígado e os macrófagos recrutados. Essas citocinas por sua vez, inibem a sinalização local e sistemática da insulina, levando a um quadro de resistência à insulina. Nos últimos anos, um grande número de estudos demonstrou que muitos membros da superfamília dos receptores nucleares participam de anormalidades associadas com os processos que levam à obesidade, e conseqüentemente, à síndrome metabólica e o diabetes do tipo 2¹¹.

Receptores Nucleares

Os receptores nucleares compreendem uma superfamília estruturalmente conservada de fatores de transcrição, que ativam a expressão de genes alvos em resposta a ligação de moléculas sinalizadoras lipofílicas. Diversas moléculas possuem a capacidade de ativar essa superfamília, porém merecem destaque os hormônios lipofílicos, ácidos graxos e seus metabólitos, ácidos biliares, oxisteróis e algumas dezenas de ligantes sintéticos¹²⁻¹⁴. O avanço das técnicas de genoma permitiu identificar 48 genes que codificam diferentes receptores nucleares em humanos e 49 em ratos¹⁵. Devido a sua ampla participação no desenvolvimento fisiológico e metabólico, estes receptores têm sido explorados constantemente desde a sua descoberta como alvos terapêuticos para doenças como o câncer, inflamação, distúrbios endócrinos e metabólicos. Muitas das doenças cardiovasculares são atribuídas ao mau funcionamento ou a presença de mutações em alguns destes receptores nucleares. Essas doenças são representadas principalmente pelo diabetes do tipo 2, dislipidemia e aterosclerose¹⁶.

De forma semelhante aos demais fatores de transcrição, os receptores nucleares exibem uma estrutura modular organizada em regiões (Figura 2A). Um receptor nuclear típico apresenta cinco diferentes domínios: o N-terminal (NTD), domínio de ligação ao DNA (*DBD-DNA-Binding Domain*), *hinge*, domínio de ligação ao ligante (*LBD-Ligand-Binding Domain*) e a região C-terminal, (Figura 2B). O comprimento e a sequência de cada domínio variam entre os diferentes tipos de receptores nucleares, sem que ocorra a perda da função. Aliado a essa variação estrutural, também ocorrem as alterações funcionais¹⁷⁻¹⁸.

O NTD é o domínio mais variável em tamanho e sequência. Dentre os receptores nucleares, a classe dos esteroides representados principalmente pelos receptores de andrógeno

(AR), glicocorticoide (GR), mineralocorticoide (MR) e progesterona (PR) apresentam os maiores NTD, variando entre 400-600 resíduos de aminoácidos. Enquanto que os pertencentes à classe não esteroide, tais como, o receptor do ácido retinóico (RAR), receptor X retinóide (RXR), receptor da vitamina D (VDR) e receptor do hormônio tireoidiano (TR) são os que apresentam os menores NTD. O VDR possui um dos menores NTD, com apenas 24 resíduos aminoácidos¹⁷.

Na região do NTD também se encontra a de função de transativação 1, denominada de AF-1 (*Activation Function 1*), a qual é responsável por promover a ativação da transcrição na ausência do ligante¹⁹. Recentemente, a estrutura intacta dos receptores nucleares HNF-4 e PPAR γ foram resolvidas, mas infelizmente o NTD por ser altamente móvel não aparece nas estruturas cristalográficas²⁰⁻²¹.

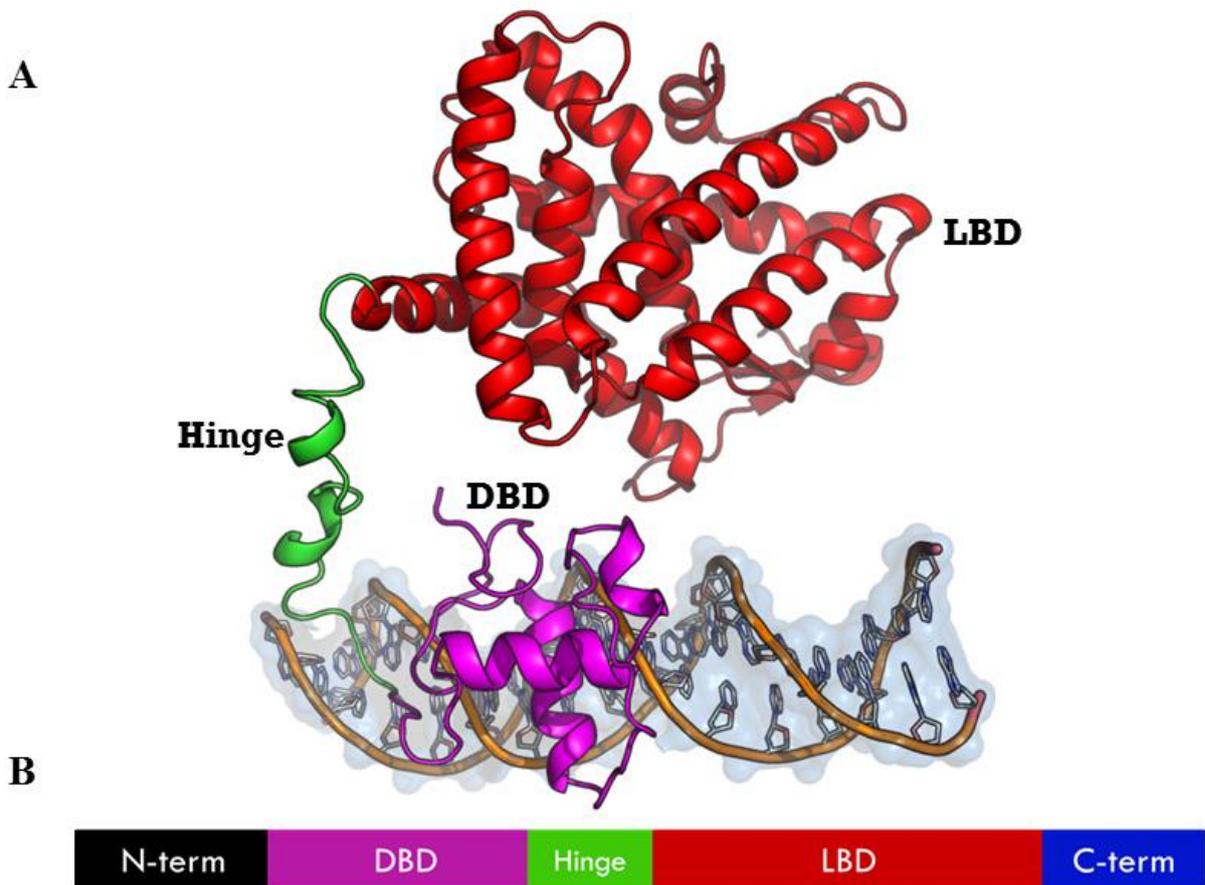


Figura 2- Organização funcional e estrutural dos receptores nucleares. (A) Representação intacta da estrutura do PPAR γ e seus domínios, incluindo o DBD em lilás, a *hinge* em verde, o LBD em vermelho. A região N-terminal da estrutura está omissa devido a sua alta mobilidade (PDB 3DZU). (B) As cinco regiões características divididas em domínios, formam um receptor nuclear típico.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O DBD consiste de aproximadamente 70 resíduos aminoácidos, sendo o domínio mais conservado entre os membros da superfamília dos receptores nucleares e as suas interações com o DNA têm sido bem caracterizadas^{19;22}. Estruturalmente, o DBD é composto por dois motivos de dedos de zinco (Zn-I e Zn-II), onde cada um é coordenado por quatro resíduos de cisteína. O enovelamento do DBD é formado por hélices- α que constitui o núcleo do DBD. É na hélice- α do primeiro dedo de zinco que ocorrem as interações com sequências específicas de DNA, chamadas de elementos responsivos. Os primeiros elementos responsivos dos receptores nucleares foram caracterizados para o receptor de estrógeno (ER) e GR. O segundo dedo de zinco tem a função de homo- ou heterodimerização com o outro receptor nuclear²³. Análises estruturais têm demonstrado que o DBD é estruturalmente definido na presença e na ausência do DNA, podendo ligar-se ao DNA para formar dímeros²⁴.

Os domínios DBD e LBD estão conectados pela *hinge*, uma região altamente flexível e pouco conservada que está associada com a localização do receptor nuclear²⁵. Para muitos receptores nucleares a *hinge* contém sítios para eventos de modificações pós-traducionais, tais como, fosforilação, acetilação, metilação e sumoilação²⁶⁻²⁷. A *hinge* também é capaz de promover a interação do receptor com correpressores¹⁷ e supostamente age como uma dobradiça, permitindo o movimento entre os dois módulos para a ligação ao DNA²⁸.

O LBD situa-se na porção C-terminal da proteína e está envolvido em diversas funções reguladas pela ligação ao ligante, como a liberação do receptor do complexo de proteínas de choque térmico (HSPs), translocação para o núcleo, homodimerização, heterodimerização, ativação da transcrição de genes alvo e sua associação com correpressores¹⁷ e coativadores²⁹⁻³¹. É nesse domínio que agem os agonistas e antagonistas promovendo ou bloqueando a transcrição³². Ele possui a função de transativação 2, também chamada de AF-2 (*Activation Function 2*), que é a região onde ocorre a interação com proteínas coreguladoras, os quais incluem os membros da família do SRC-1, CREB, GRIP, TRAP entre outras³³⁻³⁴.

A determinação de diferentes estruturas cristalográficas do domínio LBD dos receptores nucleares, na presença e ausência de ligantes, ajudou a revelar um mecanismo estrutural para essa superfamília de receptores³⁵⁻³⁶. Esse mecanismo ficou conhecido como modelo da ratoeira (*mouse trap*) e relata uma mudança estrutural deste domínio em complexo com um ligante (*holo*) e na forma livre (*apo*). Em resumo, esse mecanismo envolve uma mudança e conformação da H12, a hélice mais flexível das 12 presentes no enovelamento característico do LBD dos receptores nucleares. Quando o receptor nuclear se encontra na forma *apo*, a H12 adota uma conformação estendida, afastando-se do LBD. Esta conformação

é tipicamente chamada de conformação aberta e é considerada a conformação inativa dos receptores nucleares. Nas estruturas *holo*, a presença do ligante estabiliza a H12 provocando uma mudança em sua conformação, trazendo-a na direção do bolso de ligação do ligante (LBP). Esta conformação é dita como conformação fechada e representa o modelo ativo para os receptores nucleares (Figura 3)³⁷.

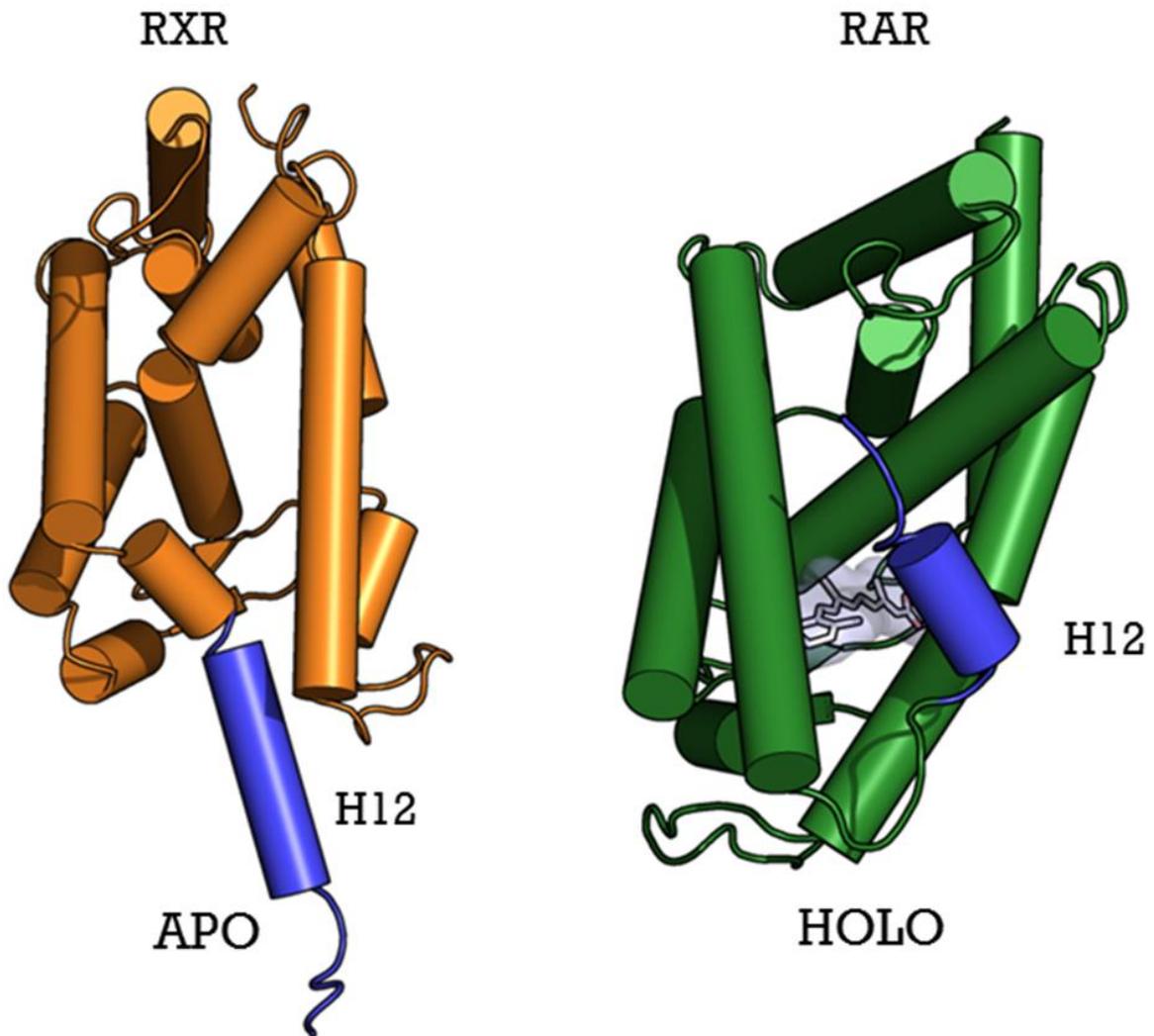


Figura 3- Desenho esquemático do LBD em dois diferentes estados conformacionais. O esquema da esquerda representa o RXR na forma apo, com a H12 na conformação inativa. À direita temos o RAR ligado a um agonista, o qual provocou uma mudança da proteína para a conformação ativa. Em ambas as estruturas, a H12 está colorida em azul.

Fonte: Elaborada pelo autor

Os receptores nucleares podem ser agrupados em três classes de acordo com as suas propriedades de dimerização e sequências de ligação ao DNA (elementos responsivos) (Figura 4). A primeira é caracterizada pela formação de homodímeros organizados como

palíndromos ou palíndromos invertidos, nos quais incluem os receptores de esteroides clássicos como o ER, MR, AR, GR e PR. Esses receptores são especificamente ativados por ligantes de alta afinidade. Com exceção do receptor ER, todos os demais receptores esteroides em sua forma apo são geralmente encontrados no citoplasma, formando um complexo com uma HSP. A ligação do ligante a essa classe de receptores induz a uma mudança conformacional no receptor, o qual resulta na dissociação do complexo citoplasmático e, conseqüentemente, o transporte para o núcleo, onde o receptor pode ligar-se aos elementos responsivos e ativar a transcrição de genes alvos (Figura 5)³⁸.

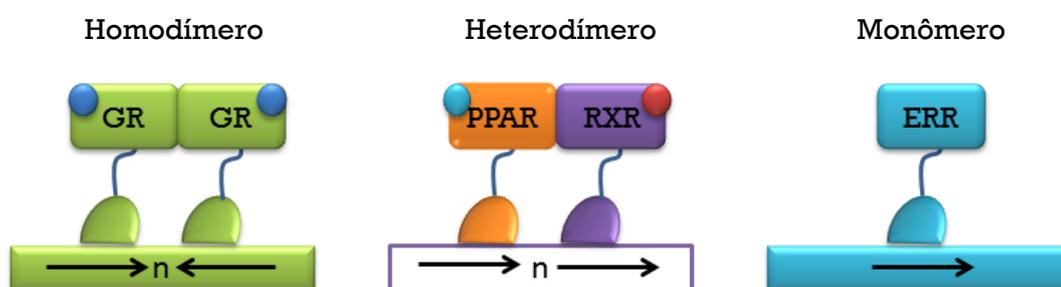


Figura 4- Esquema para a dimerização dos receptores nucleares e seqüências de ligação ao DNA. Da esquerda para direita: receptores homodímeros (palíndromo repetido), heterodímeros do RXR (seqüência hexanucleotídica direta espaçada) e receptor órfão monomérico. A seta indica a seqüência consenso de reconhecimento dos receptores nucleares (AGGTCA) ou uma variante.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A segunda classe dos receptores é caracterizada pela ligação a elementos responsivos, a qual é constituída de duas seqüências hexanucleotídicas diretas, espaçadas por 1-5 pares de bases com formação imprescindível de heterodímeros com o RXR. Neste grupo incluem os receptores endócrinos como o TR, VDR, RAR, RXR, que são ativados por ligantes hormonais, e os PPAR, ativados por metabólicos lipofílicos²³. A terceira classe é representada pelos receptores órfãos, para os quais ainda não foi identificado o seu ligante natural. Essa classe pode apresentar a forma monomérica e se ligar a seqüências hexanucleotídica ou a forma dímica interagindo com elementos compostos que os compõem³⁹.

Os PPARs e seu mecanismo de ação

Os PPARs são membros de uma subfamília dos receptores nucleares e atuam como fatores de transcrição ativados por ligantes. Dentre os ligantes já identificados, destacam-se os ácidos graxos e seus metabólitos. No entanto, para que ocorra a ativação dos PPARs é necessário a heterodimerização com o seu parceiro RXR⁴⁰. Essa heterodimerização é essencial para o recrutamento de cofatores, os quais podem iniciar o processo de transcrição ao recrutar coativadores ou suprimir este processo ao recrutar correpressores⁴¹.

Quando o PPAR não está ligado ao ligante, ele forma um complexo com uma proteína correpressora que inibe a transcrição dos genes alvo. Após o ligante atravessar a membrana plasmática pelo auxílio de uma proteína transportadora de ácidos graxos (FABP), o ligante liga-se ao PPAR provocando uma mudança estrutural que libera proteínas correpressoras, como a histona desacetilase (HDAC). Essa mudança estrutural os torna aptos para a heterodimerização com o RXR⁴².

Em seguida, a RNA polimerase II e as proteínas coativadoras, como a histona acetiltransferase (HAT), são ativadas e formam novos complexos que reconhecem especificamente a sequência dos elementos responsivos aos PPARs (PPREs). Um PPRE consiste de duas repetições diretas de seis nucleotídeos separadas por um ou dois nucleotídeos, sendo conhecidos como DR-1 e DR-2, respectivamente⁴³. Esta interação entre o ligante, RXR, PPAR e coativador, promove a remodelagem da cromatina e, conseqüentemente, aumenta a transcrição dos genes alvos (Figura 5)⁴⁴⁻⁴⁵.

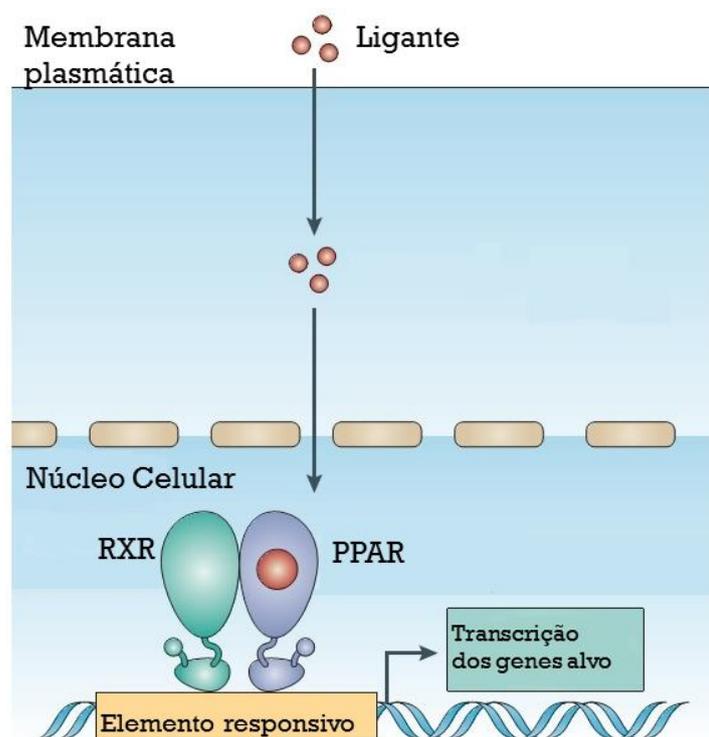


Figura 5- Esquema da regulação molecular da transcrição positiva dos PPARs. Após a ativação pelo ligante, os PPARs heterodimerizam com o RXR. A heterodimerização é essencial para o recrutamento de coativadores, o qual inicia o processo de transcrição recrutando toda a maquinaria transcricional, incluindo a RNA polimerase e os coativadores da histona acetiltransferase. Isso faz com que ocorra a remodelação da cromatina e, conseqüentemente, o aumento da transcrição.

Fonte: Adaptada de Glass e Ogawa⁴¹.

Os PPARs têm sido classificados como sendo pertencentes a uma subfamília de receptores nucleares que incluem os RARs e os TRs. A família de PPARs consiste de três isotipos codificados por três diferentes genes: PPAR α (NR1C1), PPAR β (NR1C2) e PPAR γ (NR1C3)⁴⁶. O LBD dos PPARs possui uma estrutura globular com 13 hélices- α e quatro fitas- β . A nomenclatura dos elementos da estrutura secundária é baseada na estrutura cristalográfica do RXR α -LBD. Algumas características extras são observadas no LBD dos PPARs em relação aos demais receptores nucleares. Uma dessas diferenças é que os PPARs possuem em suas estruturas uma hélice- α extra entre a primeira fita- β e a H3. Também é observado que as hélices H10 e H11 são de fato uma hélice contínua (Figura 6)⁴⁷.

Apesar de não ser o domínio mais conservado nos PPARs, o LBD possui uma similaridade de 68% de identidade entre os três isotipos. Na região polar do bolsão de ligação do ligante (LBP), os resíduos que formam ligações de hidrogênio com a cabeça polar dos agonistas dos PPARs são bem conservados (Figura 6)⁴⁸.

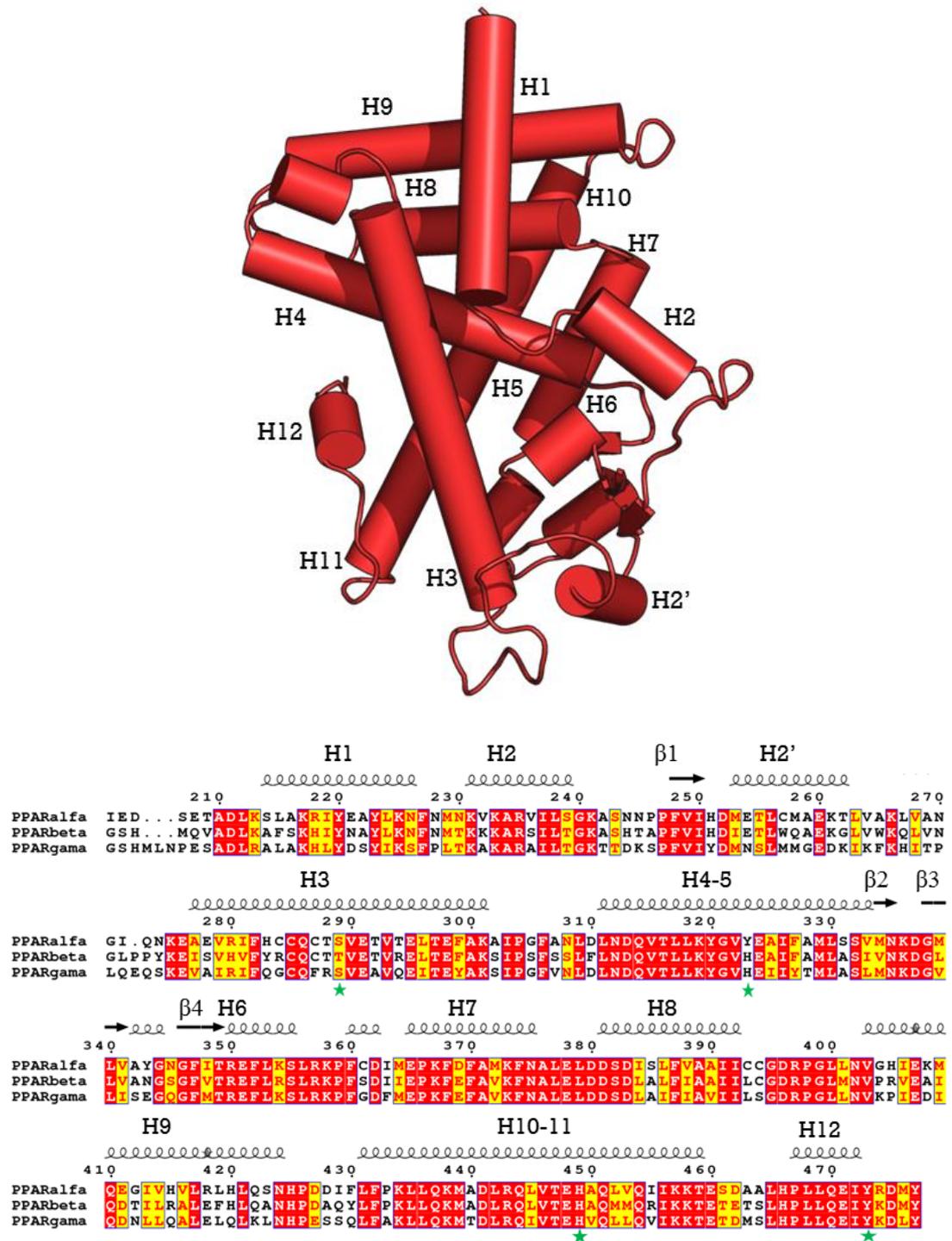


Figura 6- Enovelamento e alinhamento do LBD dos PPARs. Na figura superior está a representação em tubos das 13 hélices- α que formam o enovelamento característico do LBD dos PPARs. Essa nomenclatura das estruturas secundárias foi baseada na estrutura do RXR. Uma das diferenças mais evidentes entre o enovelamento dos PPARs para os demais receptores nucleares é a presença de uma hélice- α extra (H2'). Na parte inferior da figura, está presente o alinhamento dos três isotipos e os resíduos que compõem as suas respectivas estruturas secundárias. As estrelas em destaque mostram os resíduos polares que formam as principais ligações de hidrogênio com os ligantes no LBP dos PPARs.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A nomenclatura para os PPARs se baseou no fato de compostos conhecidos como fibratos induzirem a proliferação dos peroxissomos em células de roedores. Atualmente, sabe-se que nenhum membro da família dos PPARs em células humanas consegue induzir a proliferação de peroxissomos. Porém, mesmo incorreto, o nome para este receptor vem sendo tradicionalmente mantido⁴⁹. A ativação dos PPARs melhoram vários aspectos da síndrome metabólica através de efeitos específicos em tecidos e células. Algumas das principais funções para estes receptores estão descritas na Figura 7.

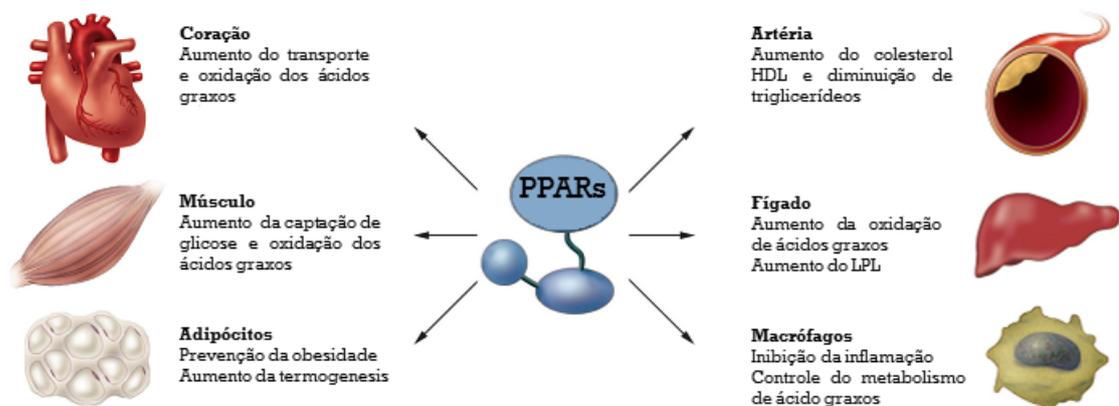


Figura 7- Algumas funções metabólicas dos PPARs. O PPAR α no fígado tem a função de captação e oxidação dos ácidos graxos; o PPAR β diminui a produção de glicose; e o PPAR γ aumenta a lipogênese e a sensibilidade à insulina. No músculo esquelético, todos os PPARs participam na regulação da oxidação e transporte de ácidos graxos. No tecido adiposo, aumentam a sensibilidade à insulina, termogênese e a diferenciação celular, participando diretamente na prevenção da obesidade. Todos os isotipos podem atuar na diminuição de citocinas inflamatórias inibindo a cascata do processo inflamatório. Nas artérias, os PPARs têm participado no aumento do colesterol HDL e na diminuição dos triglicerídeos. Além disso, a ativação do PPAR β no coração aumenta função contrátil e pode melhorar a cardiomiopatia.

Fonte: Adaptada de Barish *et al.*³

1.5.1 PPAR α

O gene que codifica o PPAR α foi inicialmente clonado em 1990 a partir do cDNA do fígado de um rato⁵⁰. Em humanos, o PPAR α é encontrado em tecidos com altas taxas de atividades metabólicas. Este receptor é expresso predominantemente no fígado, mas também

pode facilmente ser encontrado no tecido adiposo marrom, músculo esquelético e coração. O PPAR α tem um papel fundamental na regulação da β -oxidação⁵¹. A nível mitocondrial este receptor regula tanto a β -oxidação quanto o transporte dos ácidos graxos para dentro da mitocôndria. Em adição, a ativação do PPAR α estimula a absorção de ácidos graxos pelo aumento da expressão da FABP e da translocase de ácido graxo (FAT). Além destes processos, o PPAR α regula a expressão das apolipoproteínas apoA-I e apoA-II, que controlam o transporte reverso do colesterol⁴⁵.

O PPAR α é alvo molecular dos fibratos, uma classe de fármacos hipolipidêmicos usados no tratamento da dislipidemia em humanos. A ativação do PPAR α pela administração de fibratos diminui os níveis de triglicerídeos, além de aumentar o colesterol HDL através do metabolismo dos ácidos graxos⁵². Estudos clínicos têm demonstrado que os fibratos reduzem a incidência de possíveis eventos cardiovasculares e aterosclerose⁵³. Contudo, a ativação do PPAR α não ocorre apenas pelos ligantes exógenos.

Os ligantes endógenos, que são os ligantes naturais deste receptor, também são capazes de ativar o PPAR α . Neste caso, os principais são os ácidos graxos insaturados, eicosanoides, o mediador inflamatório leucotrieno B₄, ácidos hidroxieicosatetranoicos, carbaprostaciclina e as prostaglandinas D₁ e D₂. Acredita-se que a ativação do receptor por ligante endógeno ocorre principalmente durante os períodos de jejum, onde há uma grande quantidade de ácidos graxos livres no plasma sanguíneo. O consumo alimentar de ácidos graxos específicos também pode ser uma alternativa de ativação do PPAR α ⁵⁴⁻⁵⁵.

Apesar do PPAR α possuir um papel primordial no metabolismo de lipídios, o mesmo se mostrou importante em alguns processos inflamatórios. Entretanto, a sua participação na expressão de genes inflamatórios ainda não está totalmente compreendida. Diversos mecanismos são propostos e acredita-se que alguns deles envolvam a interação direta com os fatores de transcrição NF- κ B e AP1, alterações no receptor de citocinas ativadas por macrófagos e a sinalização do fator de crescimento⁵³. Outros estudos reforçam essa proposta, entretanto consideram um mecanismo no qual o PPAR α inibe a expressão de algumas moléculas inflamatórias em células vasculares do endotélio, tais como a IL-6 e a ciclooxigenase-2, bem como o aumento da expressão da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS)⁴⁵. Contudo, estes resultados sugerem que ligantes para este receptor possam atuar como moduladores anti-inflamatórios na parede do endotélio vascular^{53;56}.

1.5.2 PPAR β

O PPAR β também é conhecido como PPAR δ ou PPAR β/δ e foi originalmente clonado por Wahli e colaboradores em oócitos de *Xenopus laevis*⁵⁷. A expressão ocorre em tecidos e células com alta atividade metabólica como o fígado, intestino, pele e tecido adiposo. Porém, pode também ser encontrado em baixos níveis em outros tecidos⁴⁴. Por um longo tempo desde sua clonagem, a atenção dada ao PPAR β foi bem menor quando comparada aos demais isotipos dos PPARs. Isso ocorreu principalmente devido a sua expressão ubíqua e a indisponibilidade de ligantes seletivos capazes de ativá-lo. Recentemente, grandes avanços têm sido feitos em estudos genéticos e com agonistas/antagonistas sintéticos desenvolvidos seletivamente para o PPAR β . Essas novas descobertas têm levado a um aumento de projetos de pesquisa que envolvam este receptor⁵⁸.

A habilidade do PPAR β em aumentar o colesterol HDL, o catabolismo dos ácidos graxos no músculo esquelético e o metabolismo da glicose são as funções mais bem estabelecidas para este receptor⁵⁹. Porém, o maior interesse neste receptor está voltado para o seu papel em diferentes tipos de câncer. Os mecanismos moleculares que poderiam explicar a atuação do PPAR β em células cancerígenas ainda permanecem controversos. Por exemplo, quando ativado por determinados agonistas, o PPAR β aumenta a proliferação de linhagens de células cancerígenas no fígado, mama e próstata. Por outro lado, outros agonistas do PPAR β induziram a diferenciação terminal e inibiram a inflamação inata, sugerindo um efeito anticâncer. Em adição a esses estudos, o PPAR β parece estar mais intimamente interligado com certos tipos de câncer, pois quando seus níveis de expressão estão baixos em pacientes com câncer colorretal a expectativa de vida desses pacientes também é diminuída⁴².

Como um alvo molecular para atuação de fármacos, o PPAR β é o único entre os três isotipos que não apresenta um fármaco em uso clínico. Entretanto, como o controle de diversos processos metabólicos estão sendo atribuídos ao PPAR β , incluindo o metabolismo de lipídios, aterosclerose, metabolismo da glicose e sensibilidade à insulina, este receptor tornar-se um potencial candidato a alvo molecular para o desenvolvimento de novos fármacos para a síndrome metabólica^{3;59}.

1.5.3 PPAR γ

Outro membro da superfamília dos receptores nucleares é o PPAR γ . A expressão deste receptor ocorre em níveis elevados no tecido adiposo, monócitos e colón, e em níveis mais baixos nos demais tecidos⁴⁵. A primeira descrição para este receptor ocorreu em *Xenopus* e logo após, em diversas espécies de mamíferos, incluindo o humano. A clonagem foi realizada baseada na similaridade com o PPAR α ⁶⁰. Em humanos são descritas três isoformas de PPAR γ , sendo elas o PPAR γ 1, PPAR γ 2 e PPAR γ 3. Estas isoformas diferem apenas nos primeiros exóns. Uma das principais diferenças ocorre no PPAR γ 2, onde há a presença de 30 aminoácidos a mais no seu domínio N-terminal. O PPAR γ 1 pode ser traduzido do seu próprio mRNA ou da iniciação da tradução do mRNA para o códon 31⁶¹. A expressão das diferentes isoformas do PPAR γ é tecido dependente. A isoforma PPAR γ 1 é expressa abundantemente nos tecidos adiposos, fígado e no coração. Porém, no tecido esquelético muscular a sua expressão é detectada em baixos níveis. O PPAR γ 2 é restrito ao tecido adiposo e o PPAR γ 3 é abundante em macrófagos, intestino grosso e tecido adiposo⁴⁵.

Dentre os receptores nucleares, o PPAR γ foi o primeiro a ter seus fatores de transcrição reconhecidos, atuando fundamentalmente no metabolismo humano. O PPAR γ também foi o primeiro receptor nuclear a ter a sua estrutura cristalográfica determinada na forma intacta (Figura 2)²⁰. Por controlar a expressão de diferentes genes, diversas funções fisiológicas são relacionadas com o PPAR γ . Das muitas funções atribuídas a este receptor, algumas estão bem caracterizadas e merecem destaque: o controle do metabolismo da glicose⁶², a regulação da diferenciação de adipócitos⁶³ e a regulação da resposta inflamatória têm sido algumas destas funções⁶⁴⁻⁶⁵. Em todos os casos, a resposta ocorre somente na presença de ligantes.

A resistência a insulina tem um papel central no desenvolvimento da diabetes do tipo 2 e está associada a fatores genéticos, idade, obesidade e principalmente a um estilo de vida sedentário⁶⁶. O PPAR γ participa do controle da expressão de diversos genes que afetam a ação da insulina, levando a resistência à insulina. Um destes genes é o do TNF- α , uma citocina pró-inflamatória que é expressa pelos adipócitos e que participa deste processo diminuindo a tradução da sinalização da insulina. Estudos *in vivo* demonstraram que os agonistas do PPAR γ aumentam a sensibilidade à insulina por um efeito oposto ao do TNF- α em adipócitos⁴⁴. Outra proteína que pode ser regulada por agonistas do PPAR γ é a proteína transportadora de glicose 4 (GLUT4). A GLUT4 é uma das proteínas que atuam na captação da glicose e o seu mau

funcionamento pode levar a um quadro de resistência à insulina. Alguns agonistas do PPAR γ , tais como a rosiglitazona podem aumentar a expressão desta proteína em células de adipócitos, facilitando o mecanismo de captação da glicose. Por outro lado, a resistina, uma molécula secretada pelos adipócitos que tem como uma das suas funções elevar o nível de glicose sanguínea, demonstrou ser inibida pela ação das tiazolidinedionas (TZDs)⁴⁵.

O tecido adiposo está no centro da síndrome metabólica e tem um papel primordial no controle do balanço energético do corpo e da homeostase lipídica⁶⁷. Apesar de muitas proteínas participarem desse processo, está claro que o PPAR γ é o regulador primordial da adipogênese, controlando a diferenciação celular de pré-adipócitos em adipócitos⁶⁸. Recentemente, em um estudo realizado com ratos com obesidade induzida por uma dieta hiperlipídica, foi observado que esse ganho de peso ocorre quando a proteína quinase Cdk5 é ativada no tecido adiposo. No entanto, para que ocorra essa ativação é necessário a fosforilação da Ser273 do PPAR γ . A modificação da Ser273 não altera as propriedades adipogênicas do PPAR γ , mas conduz a desregulação de uma grande quantidade de genes cuja expressão também está alterada em pacientes obesos⁶⁹⁻⁷⁰.

A regulação da resposta inflamatória via PPAR γ pode ocorrer por diferentes mecanismos moleculares. Em um destes mecanismos, a ligação da 15-deóxi-PGJ₂ ao PPAR γ promove a expressão de genes que regula positivamente a diferenciação e ativação de macrófagos, que são células chave na defesa contra microrganismos e participam diretamente da resposta inflamatória. A ligação da 15-deoxi-PGJ₂ ao PPAR γ também foi capaz de inibir a síntese da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS). Essa enzima demonstra efeitos citotóxicos durante a invasão de microrganismos e sua produção é regulada pela ativação dos macrófagos em resposta ao interferon-gama⁶⁵. Outro mecanismo proposto para resposta inflamatória dependente do PPAR γ sugere a inibição da expressão de citocinas inflamatórias⁶⁴. Esses achados têm indicado fortemente o PPAR γ como alvo molecular para os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES)⁷¹⁻⁷².

1.5.4 Moduladores Terapêuticos dos PPARs

1.5.4.1 Fibratos

Como mencionado anteriormente, os fibratos são fármacos que atuam no PPAR α reduzindo os níveis de triglicerídeos concomitantemente ao aumento do HDL. A síntese dos primeiros fibratos ocorreu no início da década de 50 e alguns anos após, estes fármacos já estavam sendo destinados para o uso clínico. Dos mais de 80 fibratos sintetizados na época, o mais efetivo e com o mínimo de efeitos tóxicos foi o Etil- α -4-clorofenoxiisobutirato, mais conhecido como clofibrato (Figura 8)⁷³.

Ensaio *in vivo* realizados com o clofibrato mostraram uma diminuição no nível de lipídios. No entanto, o modo de ação deste fármaco era desconhecido na época. Inicialmente, o efeito hipolipidêmico foi atribuído às variações periódicas na função adrenal e tireoide. Apesar de aprovado nos EUA em 1967 como um fármaco para o tratamento de hiperlipidemias, o clofibrato teve seu mecanismo de ação identificado aproximadamente 30 anos depois, com a descoberta do PPAR α ⁷³.

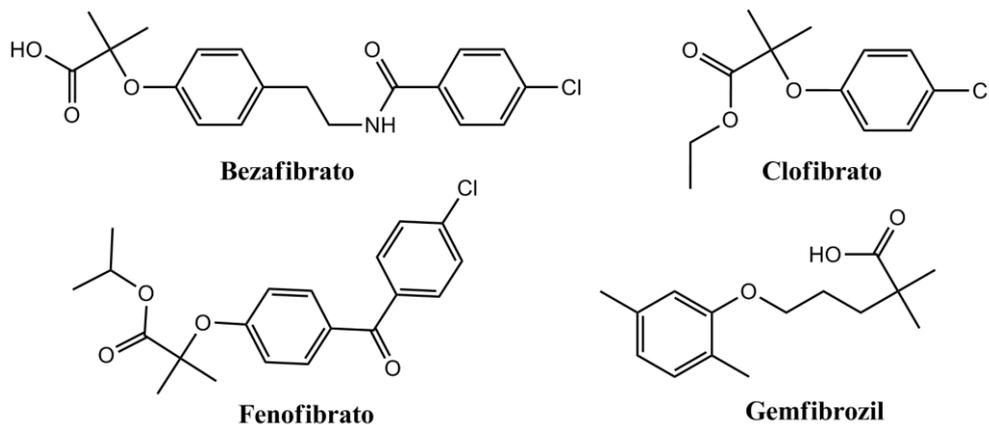


Figura 8- Estruturas químicas dos agonistas do PPAR α utilizados clinicamente.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O bezafibrato, gemfibrozil e fenofibrato estão entre os fibratos utilizados clinicamente no tratamento de dislipidemias via ativação do PPAR α (Figura 8). De forma semelhante ao clofibrato, estes fármacos produzem uma redução significativa de triglicerídeos e um modesto aumento nos níveis do colesterol HDL. Em adição a isto, a ativação do PPAR α tem produzido um aumento na sensibilização à insulina e tolerância a glicose em pacientes com diabetes do tipo 2⁷⁴. Os fibratos são bem tolerados pela maioria dos pacientes, porém alguns efeitos adversos foram relatados e, em sua maioria, de natureza gastrointestinal leve e transitória. Outros efeitos adversos incluem ansiedade, dor de cabeça, vertigem, distúrbio do sono, erupção cutânea e urticária. Devido o seu metabolismo e excreção ser por meio da via renal, os fibratos não são recomendados para pacientes que possuem problemas renais⁷⁵.

1.5.4.2 Tiazolidinedionas (TZDs)

Os fármacos de ação para o PPAR γ são os TZDs, também chamadas de glitazonas (Figura 9). Esses fármacos aumentam a sensibilidade insulínica e são utilizados clinicamente para o tratamento da diabetes do tipo 2, a qual está associada com diversas síndromes metabólicas que incluem a obesidade, hipertensão e dislipidemia^{62;76-77}. A sensibilização insulínica por meio dos TZDs pode ocorrer por vários mecanismos. Em um deles, acredita-se que os TZDs ativam o PPAR γ estimulando a diferenciação de adipócitos e apoptose^{76;78}.

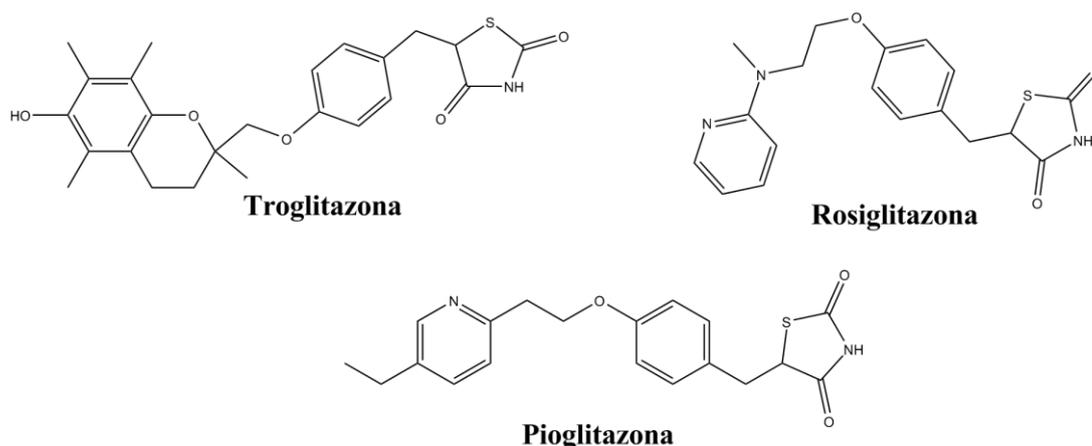


Figura 9- Estruturas químicas dos TZDs do PPAR γ .

Os principais TZDs são representados pela troglitazona, retirada do mercado por provocar hepatotoxicidade; a rosiglitazona, que tem seu uso restrito devido o grande risco de morte por eventos cardiovasculares; e a pioglitazona, atualmente o único TZD de uso clínico sem restrições (Figura 9). Mesmo com o seu uso liberado, muitos efeitos adversos são atribuídos ao uso contínuo da pioglitazona, como o aumento da incidência de fraturas ósseas distais, retenção de fluidos e ganho de peso⁷⁷. Devido à magnitude dos efeitos colaterais atribuídos aos TZDs, à busca de novos fármacos para o PPAR γ ainda se faz necessária.

Os TZDs apresentam bons resultados na manutenção do controle glicêmico em longo prazo, em comparação com os outros hipoglicemiantes consagrados, como a metformina e a sulfonilureias. Tais resultados justificam os TZDs como uma das opções terapêuticas mais utilizadas no tratamento do diabetes do tipo 2. Opcionalmente, esta classe de fármacos também tem sido utilizada no tratamento de patologias que se torna prevalente a resistência à insulina, como a síndrome dos ovários policísticos e intolerância à glicose. No caso da intolerância à glicose, o uso contínuo dos TZDs pode retardar ou até mesmo evitar o surgimento da diabetes do tipo 2⁷⁹.

1.5.4.3 Agonista dual PPAR-LBD α/γ

Os agonistas dual PPAR-LBD α/γ também conhecidos como glitazars, são compostos que geralmente combinam em uma única molécula características estruturais dos fármacos TZDs e fibratos, sendo capazes de ativar tanto o PPAR α quanto o PPAR γ ⁸⁰. Essa busca iniciou com a descoberta do KRP-297 (MK-767) (Figura 10). Esse composto foi o primeiro agonista dual PPAR α/γ descrito na literatura. A sua estrutura química tinha como principal grupo farmacofórico o núcleo TZD. Os ensaios de transativação com o KRP-297 demonstrou uma maior potência para o PPAR γ 0,8 μ M em relação ao PPAR α 1,0 μ M. Apesar de bem tolerado nos ensaios clínicos de fase I e II, o desenvolvimento do KRP-297 foi suspenso durante os ensaios clínicos de fase III por causa de seus efeitos toxicológicos⁸¹.

O insucesso do KRP-297 como agonista dual PPAR α/γ não foi uma limitação para novas tentativas da busca do tão desejado glitazar para uso clínico. Um intenso esforço ainda continua sendo realizado na busca de fármacos capazes de ativar sinergicamente o PPAR α e o PPAR γ ⁸⁰⁻⁸³, uma vez que o desenvolvimento de um fármaco com estas características oferece

uma opção terapêutica valiosa no controle dos níveis de glicose e lipídios, minimizando os efeitos colaterais do uso de dois fármacos.

Diversos agonistas duais PPAR α/γ têm sido sintetizado e testados clinicamente. Porém, devido seus acentuados efeitos colaterais, a maioria destes glitazars tiveram seus ensaios clínicos suspensos. Entre esses estão o muraglitazar e tesaglitazar (Figura 10), glitazars altamente promissores que foram retirados dos testes clínicos de fase III devido ao aumento na incidência de casos de insuficiência cardíaca e a diminuição da taxa de filtração glomerular, respectivamente⁸⁴. Recentemente, a empresa farmacêutica Roche anunciou a suspensão dos ensaios clínicos de fase III do agonista dual PPAR α/γ aleglitazar⁸⁵ (Figura 10). Os principais efeitos colaterais associados a estes fármacos foram fraturas ósseas, insuficiência cardíaca e hemorragia gastrointestinal⁸⁶.

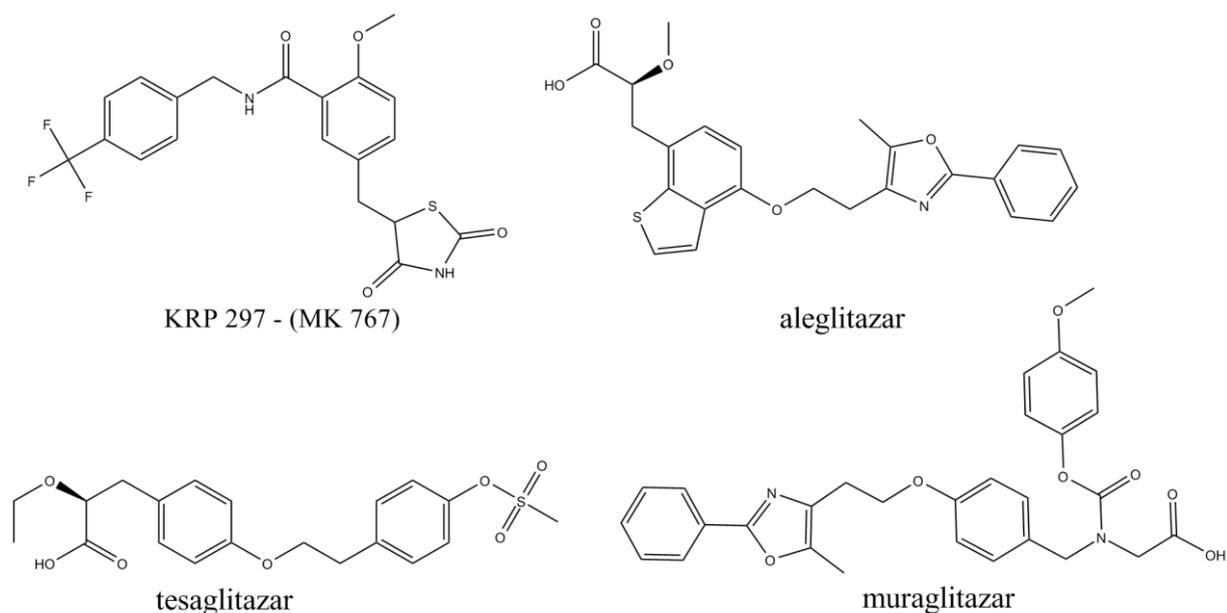


Figura 10- Estruturas químicas de alguns agonistas duais do PPAR α/γ .

Fonte: Elaborada pelo autor.

A inserção de um fármaco que aumente a sensibilidade à insulina e concomitantemente previna as complicações cardiovasculares de pacientes diabéticos, continua sendo o estado da arte na busca de moduladores dos PPARs. Portanto, aqui é apresentada a base estrutural do GL479 ligado ao LBD do PPAR α e PPAR γ . O GL479 tem

uma maior potência para o PPAR α do que para o PPAR γ (PPAR α EC₅₀ = 0.6 μ M, PPAR γ EC₅₀ = 1.4 μ M).

Este composto também influencia na expressão gênica da CPT1A, uma enzima presente no fígado que está envolvida no metabolismo de lipídios⁸⁷. Para compreender a base estrutural do agonista dual GL479 e ter um maior entendimento sobre seu modo de ligação em cada receptor, o GL479 foi co-cristalizado com PPAR α -LBD e PPAR γ -LBD, e suas estruturas foram determinadas. A análise dessas estruturas revelou um novo modo de ligação correlacionado com a atividade transcricional. Adicionalmente, estes achados oferecem pistas para projetos que explorem novos moduladores dos PPARs e suas questões metabólicas, minimizando os efeitos colaterais causados pelo uso de um ou mais fármacos.



Capítulo 2

“We've discovered the secret of life”.

Francis Crick

Prêmio Nobel em Medicina em 1962

2 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

O número de mortes atribuídas às doenças metabólicas tem nos últimos anos aumentado mundialmente. Nesse panorama, a diabetes tipo 2 e a dislipidemia merecem um destaque especial devido as suas altas taxas de mortalidade e morbidade. Os receptores nucleares PPAR α e PPAR γ têm sido importantes alvos farmacológicos para agonistas, pois são capazes de atuar como hipolipidêmico e sensibilizadores de insulina, respectivamente. Os atuais fármacos que atuam nestes receptores estão vinculados a diversos efeitos colaterais, que conseqüentemente levaram a suspensão para uso clínico dos fármacos rosiglitazona e troglitazona.

Mesmo com a existência de alguns fármacos em uso clínico para estas fisiopatologias, o grande número de pessoas afetadas e os efeitos colaterais associados aos fibratos e aos TZDs motivam a descoberta de novos fármacos para os PPARs que possam ser utilizados na terapia destas doenças, mas com o mínimo de efeitos colaterais. Duas classes de fármacos que possuem uma grande representatividade nesse aspecto são os glitazars ou agonistas duais PPAR α/γ e os SPPAR γ M s .

Os glitazars continuam sendo um desafio na busca de fármacos que combinem a ativação do PPAR α e do PPAR γ , complementando uma ação sinérgica no metabolismo de lipídios e na sensibilidade à insulina, com uma possível redução dos efeitos colaterais atribuídos ao não uso de uma monoterapia.

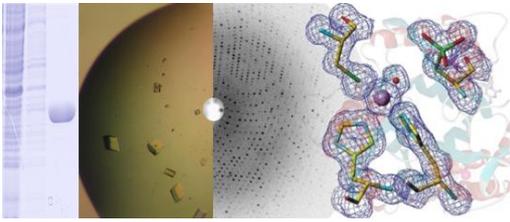
Outra estratégia que tem sido empregada pela indústria farmacêutica é a busca de moduladores seletivos dos PPARs, em especial para o PPAR γ (SPPAR γ M). Esses moduladores têm o potencial de induzir os efeitos favoráveis do metabolismo da glicose com uma diminuição dos efeitos colaterais, como exemplo o ganho de peso.

Neste contexto, o objetivo desta tese foi identificar e caracterizar novos agonistas dos PPARs. Para isso foi empregada uma abordagem em biologia estrutural e química medicinal na identificação e caracterização destes compostos. Os objetivos fundamentais dessa tese incluem:

- ✚ *Expressar e purificar em larga escala os domínios LBDs dos isotipos PPAR α -LBD e PPAR γ -LBD. O objetivo dessa etapa foi expressar as proteínas utilizando a técnica de DNA recombinante e produzi-las em grandes*

quantidades por meio da bactéria *E. coli*. Também foi empregada a bioquímica de proteínas para purificá-las por cromatografia de afinidade e por exclusão molecular;

- ✚ *Elucidar a base estrutural do agonista dual PPAR α / γ GL479, um agonista que combina dois grupos farmacofóricos diferentes.* O objetivo aqui foi desvendar as bases estruturais do modo de ligação deste agonista. Há poucos relatos de sucesso dos glitazars clinicamente. Portanto, determinar novas estruturas de agonistas duais do PPAR α / γ poderá revelar alguma particularidade que ajude no desenvolvimento desta classe de fármacos;
- ✚ *Descobrir novos moduladores seletivos do PPAR γ .* A descoberta de moduladores seletivos do PPAR γ é de grande valia para a indústria farmacêutica, em grande parte, devido a pandemia provocada pela diabetes do tipo 2. Por isso, identificar compostos seletivos e com baixos efeitos colaterais continua sendo um objetivo em qualquer projeto que envolva a descoberta de moduladores dos PPARs. Portanto, essa etapa do projeto teve o objetivo de identificar compostos baseados na estrutura tridimensional da proteína.



Capítulo 3

“In science, we must be interested in things, not in persons.”

Marie Curie

Prêmio Nobel em Física em 1903

3 METODOLOGIA

3.1 Expressão dos domínios LBDs das proteínas PPAR α e PPAR γ

O DNA correspondente à região codificadora dos domínios de ligação ao ligante (LBD) do hPPAR α (aa 195 - 468) e hPPAR γ (193 - 475) foram clonados no vetor de expressão pET 28a(+) (Novagen) e expressos em células de *Escherichia coli* BL21 (DE3) contendo em sua porção N-terminal uma cauda composta por 6 resíduos de histidinas. Inicialmente, essas células cresceram em mini-culturas (10 mL) por 15 h a 37 °C em meio Luria-Bertani (LB) (10 g triptona, 5,0 g extrato de levedura e 10g NaCl para cada litro de meio de cultura) contendo 50 μ g/mL canamicina. Em seguida, estas mini-culturas foram transferidas para 1 L de meio LB onde cresceram à 37 °C sob agitação de 190 rpm até atingir uma densidade ótica medida à 600 nm (D.O._{600nm}) entre 0,7-1,0.

As culturas foram induzidas com 1 mM de isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosideo (IPTG) por 16h à 18 °C. As células provenientes das culturas foram sedimentadas por centrifugação a 4300 xg por 45 minutos à 8 °C e ressuspensas no tampão A (10 mM imidazol, 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 mM de NaCl, 5% glicerol e 1 mM DTT). Após a ressuspensão das células, 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) e 0,1 mg/mL de lisozima foram adicionados a cada extrato e, incubado por 1 hora para prevenção da ação de proteases e ocorrência da lise enzimática, respectivamente. Para garantir que a parede celular fosse rompida por completo, após a ação da lisozima, os extratos foram sonicados com pulsos de 30 s por 5 ciclos com intervalos de 30 s em banho de gelo. Em seguida a fração solúvel foi isolada por centrifugação a 35000 xg durante 60 min.

3.2 Purificação por cromatografia de afinidade

Após a expressão, os PPARs encontram-se presentes em grande quantidade no extrato celular. Todavia, para tê-los na forma pura é necessário separá-los das demais proteínas celulares contidas no extrato. Para isso, foram utilizadas duas técnicas cromatográficas. No primeiro passo, o método de escolha foi a purificação por cromatografia de afinidade. Na

cromatografia por afinidade, a cauda de histidina presente na porção N-terminal dos PPARs proveniente do vetor pET28a (+) confere uma afinidade pelos metais (Ni^{2+} e Co^{2+}).

Devido a essa afinidade da proteína pelo metal, ambos os PPARs foram purificados utilizando uma coluna de alto desempenho de 5 mL HiTrap™ (GE Healthcare) pré-equilibrada com o tampão A (10 mM imidazol, 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 mM de NaCl, 5% glicerol e 1 mM DTT). As amostras foram injetadas na coluna, seguida de uma extensiva lavagem com o tampão A. As proteínas foram eluídas da coluna de afinidade por meio de um gradiente crescente de 10-500 mM de imidazol.

3.3 Cromatografia por exclusão de tamanho

Para garantir uma melhor qualidade da purificação e separar possíveis estados oligoméricos, a cromatografia por exclusão molecular foi adicionada ao processo de purificação proteica. Este tipo de cromatografia é também conhecido como gel filtração e é utilizada para separar proteínas com base no seu tamanho. A coluna utilizada na cromatografia por exclusão de tamanho foi uma Superdex 75 16/60 (GE Healthcare) que foi diretamente acoplada a um cromatógrafo do tipo AKTA Purifier (Amersham Bioscience).

Em resumo, a coluna foi previamente equilibrada com 3 volumes de coluna (VC) do tampão B (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM DTT, 150 mM NaCl e 5% glicerol) para o PPAR α e igual VC do tampão C (20 mM Tris pH 7,5, 1 mM DTT, 100 mM NaCl e 5% glicerol) para PPAR γ . Após a ser coluna equilibrada com seus respectivos tampões, amostras de 3 mL foram injetadas no sistema montado, empregando um fluxo contínuo de 1 mL/min. Todas as eluições foram realizadas com 2 VC do tampão B no caso do PPAR α e tampão C para o PPAR γ . Em ambas as corridas, a temperatura da coluna foi mantida por banho térmico a 8 °C. Os cálculos da massa molecular dos picos obtidos a 280 nm foram realizados de acordo com uma curva de calibração previamente elaborada, injetando-se na coluna proteínas de massas moleculares conhecidas e disponíveis no manual do fabricante (Sigma-Aldrich).

3.4 Clivagem da Cauda de Histidina

A cauda de histidina, proveniente do vetor pET-28a(+), foi removida utilizando a serino-protease trombina de fonte bovina (Sigma-Aldrich). A trombina reconhece a sequência consenso formada por LVPRGS e cliva a ligação peptídica entre os resíduos R e G. Para a clivagem total da cauda de histidina foram adicionadas 8 unidades de trombina por miligrama de proteína pura e incubadas por 12 horas a 10 °C. A perda dessa cauda causa uma diminuição de, aproximadamente, 1.8 kDa (17 aminoácidos) no produto final.

As amostras de todos os processos de purificação e clivagem da cauda de histidina foram monitoradas através de SDS-PAGE e coradas em *Coomassie Blue* (0,25% de *Coomassie brilliant blue*, 90% de etanol absoluto e 10% de ácido acético glacial). Os resultados da purificação do PPAR γ -LBD serão descritos somente no capítulo 4 desta tese.

3.5 Obtenção dos ligantes

Inicialmente, este projeto tinha como objetivo investigar a classe dos compostos flavonoides como agonistas dos PPARs. Porém, ensaios de viabilidade celular demonstraram que a maioria destes compostos ativam os PPARs em concentrações que provocam a morte celular (dados não demonstrados). Devido a essa toxicidade, os próximos ligantes a serem testados foram selecionados de forma racional e seletiva. Como o laboratório de Biotecnologia Molecular (IFSC-USP) não tem experiência em síntese orgânica medicinal foram mantidas colaborações com pesquisadores que trabalham no planejamento e síntese de novos moduladores dos PPARs. Para uma melhor compreensão, estas moléculas serão agrupadas em dois diferentes tópicos e seus resultados descritos em diferentes capítulos.

3.5.1 Derivados sintéticos do ácido clofíbrico

Em colaboração com a pesquisadora Rosa Amoroso do Departamento de Farmácia da *Universidade degli Studi G. d'Annunzio* - Itália, alguns agonistas duais do PPAR α/γ foram

cedidos para os ensaios de cristalização.

Os glitazars têm sido extensivamente estudados pela indústria farmacêutica nos últimos anos, pois combinam dois efeitos terapêuticos em um único composto. No caso do glitazar estudado neste projeto, a síntese foi realizada pelo grupo da pesquisadora Amoroso. Este ligante combinou dois grupos farmacóforos, o primeiro é formado pelo esqueleto do ácido clofibrico, o metabólito ativo do fármaco clofibrato, e o segundo é um grupo lipofílico derivado do produto natural estilbena. O grupo lipofílico do estilbena foi escolhido devido às suas já conhecidas propriedades antioxidantes, antilipidêmica e antiplaquetária⁸⁷.

O composto selecionado para os ensaios de cristalização possui uma estrutura química compatível com a estrutura geral dos agonistas dos PPARs. Para facilitar a descrição, o composto agonista dual será denominado como GL479 (Figura 11). O GL479 inclui um grupo carboxílico em uma de suas extremidades, seguido de um anel aromático e uma cauda lipofílica, sendo conectados por *linkers*. A natureza destes grupos afetam diretamente a potência e a seletividade em cada isotipo⁸⁷.

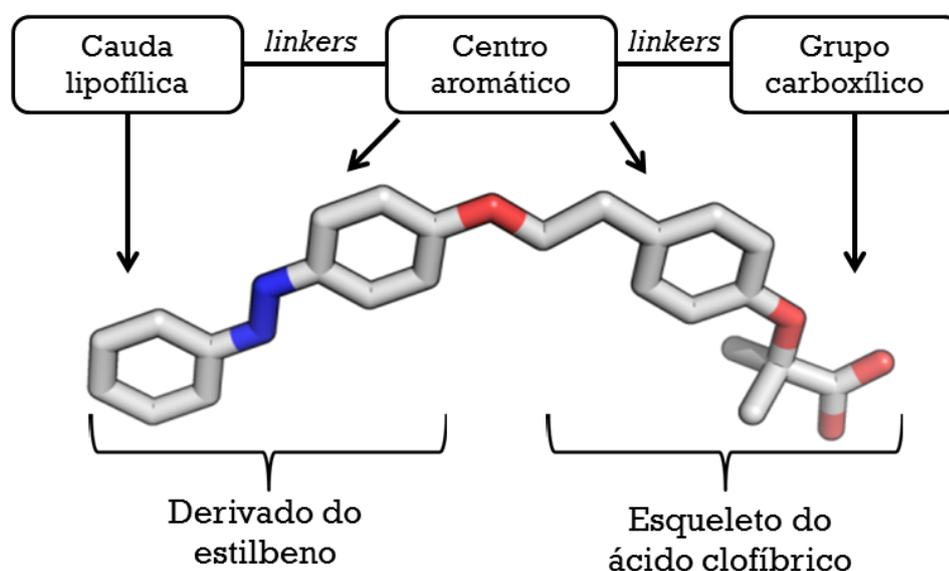


Figura 11- Esquema dos componentes de um agonista típico dos PPARs. A parte superior indica os grupos químicos necessários para a formação de um agonista dos PPARs. Esses agonistas são formados principalmente por três diferentes grupos: grupo carboxílico, um centro aromático e uma cauda lipofílica. Esses grupos são conectados por grupos químicos chamados de *linkers*. Os *linkers* atuam diretamente na afinidade e potência destes agonistas. A estrutura química acima corresponde ao GL479 e suas partes correspondentes a um agonista de PPAR.

Fonte: Elaborada pelo autor.

3.5.2 Identificação de ligantes por *docking* molecular

Nos últimos anos, diversas estratégias têm sido utilizadas para identificar moduladores do receptor PPAR γ . Uma estratégia que é bastante utilizada pela indústria farmacêutica na busca destes novos moduladores é baseada na estrutura tridimensional do receptor. Talvez a técnica mais utilizada no descobrimento de fármacos que utilize a estrutura 3D do receptor seja o *docking* molecular.

Dessa maneira, o interesse na busca e caracterização de compostos que poderiam ativar os PPARs, gerou uma colaboração com o professor Dr. Alessandro Silva Nascimento. O grupo do professor Alessandro ficou responsável pela identificação destas novas moléculas. De forma simplificada, os ligantes foram identificados por *docking* molecular usando o programa UCSF DOCK 3.5.54. A busca foi feita utilizando um *subset* na base de ligantes ZINC, que contém mais de 21 milhões de compostos disponíveis comercialmente que podem ser utilizados no descobrimento de fármacos, baseado em *docking* molecular⁸⁸. Todos os ligantes foram docados no LBP do PPAR γ -LBD (PDB 1FM6). As cargas foram atribuídas para os átomos da proteína usando o campo de força AMBER.

Os 16 compostos mais promissores preditos por *docking* foram adquiridos de diferentes empresas comerciais e estão listados na Tabela 1, com seus respectivos códigos para aquisição e códigos ZINC. As estruturas químicas dos compostos estão demonstradas na Figura 12.

Tabela 1- Lista dos compostos selecionados após os resultados do *docking* molecular.

#	Código ZINC	Fornecedor	Código do catálogo	MolPort ID
1	ZINC31775965	Vitas-M Laboratory, Ltd	STK648389	MolPort-008-314-984
2	ZINC19854786	Specs	AE-848/37241014	MolPort-000-793-219
3	ZINC8496937	ChemBridge Corp.	9057071	MolPort-001-002-595
4	ZINC34889845	ENAMINE Ltd.	T5482419	MolPort-005-328-452
5	ZINC21779134	ChemDiv	C660-1100	MolPort-007-654-371
6	ZINC13130278	ChemBridge Corp.	6138767	MolPort-002-185-582
7	ZINC2051983	Specs	AG-670/36899043	MolPort-000-901-651
8	ZINC1249958	Pharmeks Ltd.	PHAR045715	MolPort-000-733-140
9	ZINC77008	Vitas-M Laboratory, Ltd	STK016710	MolPort-002-166-327
10	ZINC13573267	Pharmeks Ltd.	PHAR223323	MolPort-002-655-372
11	ZINC27571849	ChemDiv	4922-0369	MolPort-007-566-500
12	ZINC9245770	Pharmeks Ltd.	PHAR092840	MolPort-000-761-967
13	ZINC8416224	ENAMINE Ltd.	T5361043	MolPort-004-089-690
14	ZINC12381030	Pharmeks Ltd.	PHAR173225	MolPort-000-834-168
15	ZINC980559	Specs	AM-879/40965082	MolPort-002-221-181
16	ZINC4999768	Specs	AN-465/43369978	MolPort-000-134-478

Fonte: Adaptada de Da Silva *et al.*⁸⁹.

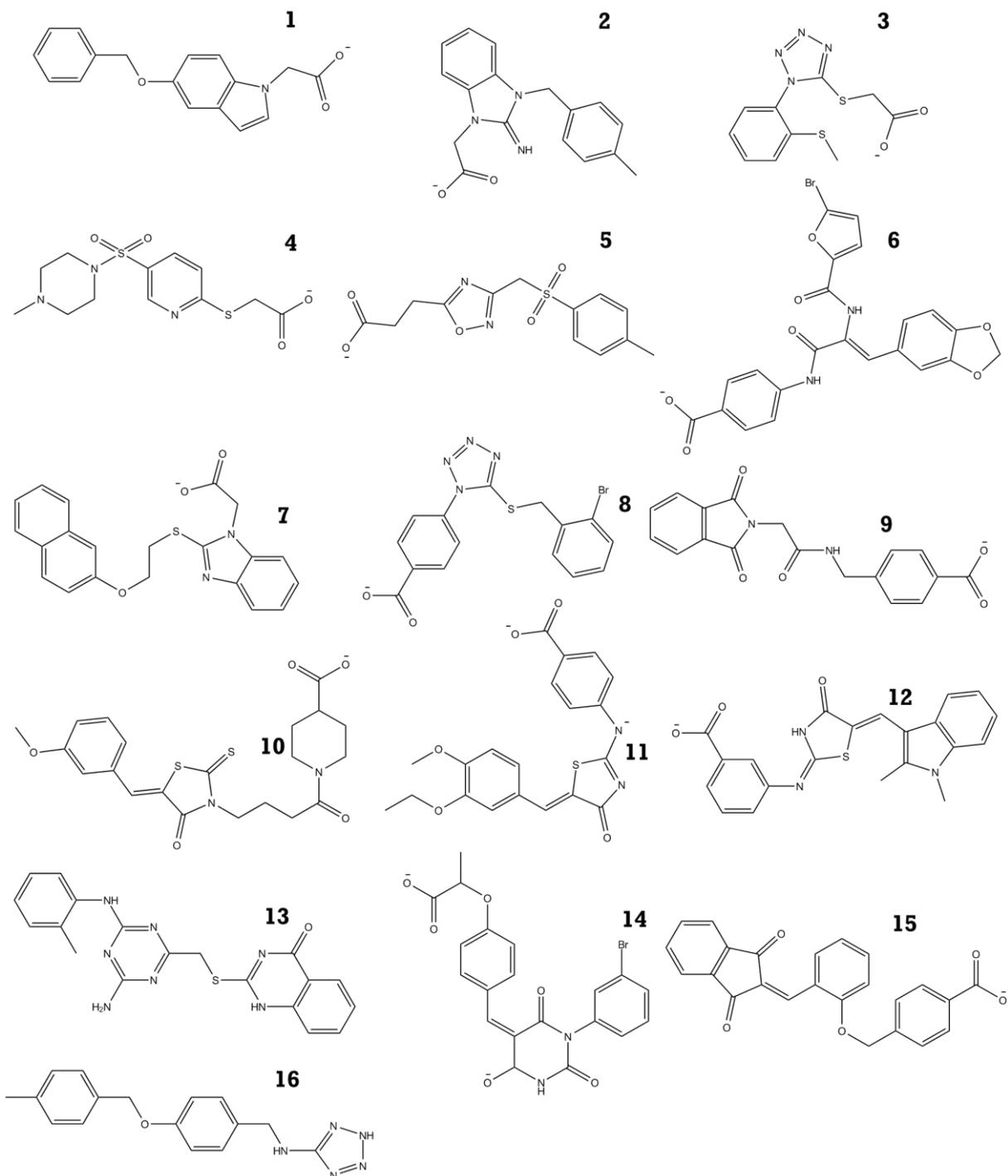


Figura 12- Estruturas químicas dos ligantes selecionados pelo *docking* molecular. Há uma alta diversidade estrutural de moléculas, que variam de muito volumosas (**11** e **14**) à outras menos volumosas (**2** e **3**). Na maioria das estruturas o grupo polar ácido carboxílico está presente. No entanto, alguns ligantes com o anel tetrazol foram selecionados (**3**, **8** e **16**).

Fonte: Adaptada de Da Silva *et al.*⁸⁹

3.6 ThermoFluor

O estudo de estabilidade de proteínas através de desnaturação térmica tem sido excessivamente utilizado por meio de técnicas consagradas, tais como, dicroísmo circular, DSC e DLS⁹⁰. Entretanto, nos últimos anos, a fluorimetria diferencial de varredura⁹¹ ou simplesmente ThermoFluor⁹² vem ganhando cada vez mais espaço em estudos bioquímicos, principalmente aqueles com ênfase em biologia estrutural e na descoberta de novos fármacos⁹³⁻⁹⁴. Um esquema simplificado da técnica pode ser visto na Figura 13.

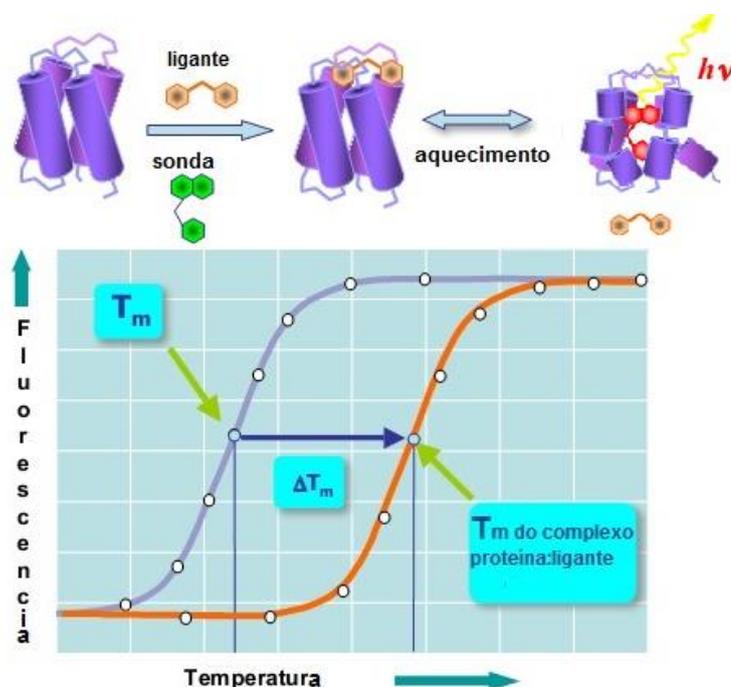


Figura 13. Representação esquemática do ensaio de ThermoFluor. Inicialmente temos a formação do complexo proteína:ligante. À medida que ocorre o aumento da temperatura a proteína é desnaturada, expondo seus sítios hidrofóbicos. Nestes sítios ocorre a ligação da sonda SYPRO Orange, que é detectada através da fluorescência emitida pela sonda. No gráfico são apresentadas duas medidas diferentes em lilás a medida é referente à proteína nativa e em laranja é referente ao complexo proteína ligante. Observa-se que a proteína nativa apresenta T_m menor que a proteína complexada ao ligante. O significado físico-químico deste experimento é que o ligante é capaz de aumentar a estabilidade da proteína quando formado o complexo.

Fonte: Adaptada de thermoFluor.org

Com aplicações em triagem de ligantes e identificação de condições ótimas de cristalização de proteínas, a técnica ThermoFluor tem surgido como um método para a descoberta de novos fármacos em larga escala. Nesta técnica, a temperatura na qual a proteína transita do estado enovelado para o estado desenovelado é medida pelo aumento da

intensidade de uma sonda fluorescente que se liga à partes hidrofóbicas da proteína, ao tempo em que a temperatura do sistema é gradualmente aumentada^{92;95}.

O ensaio de ThermoFluor foi realizado utilizando um CFX96 Real Time com um sistema de detecção C1000 Thermal cycler (Bio-Rad), com 30 μL por reação em placas de 96 poços. A reação final continha 4,4 μM de PPAR γ , 33,3 μM de cada ligante diluído em DMSO e um 1 μL da sonda de 100X SYPRO Orange (Invitrogen). Em todas as reações o volume final foi de 30 μL e a concentração final de DMSO não foi maior que 5%. As placas contendo as reações foram mantidas a temperatura ambiente por duas horas. Em seguida, cada placa foi colocada no aparelho com temperatura inicial do sistema configurada em 25 °C e elevada até atingir 90 °C, com um aumento gradual de 1 °/min. As análises dos dados e o valor do Tm para cada ligante foram obtidas por meio do programa Origin 8.5.1 (OriginLab) ou calculando a primeira derivada dos dados de fluorescência (dF/dT)⁹⁴. Todos os ligantes foram testados em triplicata.

3.7 Ensaio competitivo

O ensaio de competição PolarScreenTm-PPAR γ é um método sensível, não radiativo e eficiente para identificar em larga escala potenciais ligantes do PPAR γ . O kit utiliza o hPPAR γ -LBD fusionado em seu N-terminal a uma cauda GST e um ligante fluorescente seletivo para este receptor (FluormoneTMPPAR γ). Neste ensaio, o Fluormone é adicionado ao PPAR γ para formar o complexo PPAR γ -LBD/Fluormone resultando em altos valores de polarização. Este complexo é então adicionado a placas contendo os ligantes a serem testados. Os ligantes competem com o Fluormone deslocando-o do sítio do PPAR γ e, esse deslocamento provoca um decaimento no tempo de vida do Fluormone, resultando em um baixo valor de polarização (Figura 14). Se o ligante testado não tem afinidade pelo receptor, o deslocamento do ligante fluorescente não ocorre, e consequentemente os valores de polarização permanecem altos. A mudança dos valores de polarização na presença dos compostos testados é utilizada para determinar a afinidade dos compostos frente ao PPAR γ .

As reações para os ensaios de fluorescência foram preparadas segundo o protocolo do kit PolarScreenTm-PPAR γ . Brevemente, os ligantes foram diluídos em DMSO e mantidos em soluções estoques com diferentes concentrações de acordo com a sua solubilidade e dispensados em placas escuras. Em seguida, 20 μL do complexo 2X PPAR γ -

LBD/Fluormone™ previamente preparado foi adicionado à placa e levemente agitado. A placa foi selada para proteger os reagentes da luz e incubada por 2 h a temperatura ambiente. A leitura da placa foi realizada no leitor de placar Envision (Perkin Elmer), localizado no Laboratório Nacional de Biociências – Campinas (LNBio). O modo de polarização utilizado foi de 485 nm para excitação e 535 nm para emissão. As medidas foram feitas em duplicatas.

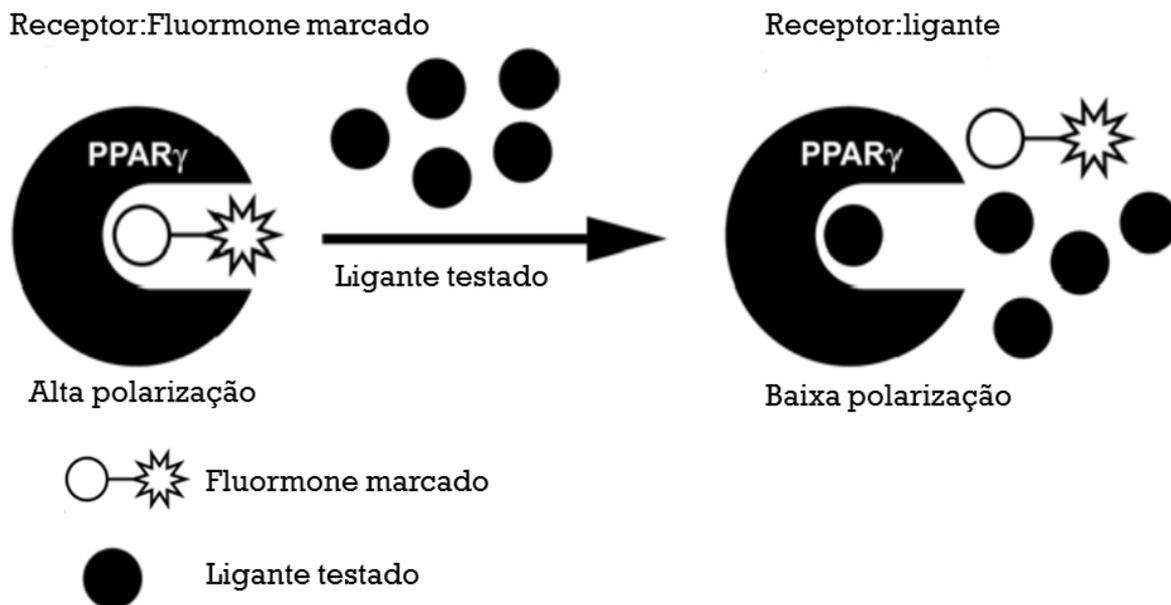


Figura 14- Esquema do ensaio de fluorescência de polarização. A figura acima mostra o perfil competitivo do ensaio. Inicialmente o ligante fluorescente liga-se no sítio ativo da proteína emitindo uma alta polarização. Após a adição do ligante testado, ocorre uma competição pela ligação ao PPAR γ e, à medida que o deslocamento do ligante fluorescente acontece a polarização diminui.

Fonte: Adaptada de <http://tools.lifetechnologies.com>

3.8 Cristalização dos complexos

Para a aplicação da cristalografia de proteínas, a macromolécula de interesse, que no geral são proteínas, deve ser cristalizada. Contudo, a formação do cristal não é garantia para o sucesso da técnica. Os cristais devem ser razoavelmente grandes, bem formados e de alta qualidade para o estudo adequado de difração por raios-X. Apesar da grande evolução da técnica, principalmente devido à inserção da robotização, a cristalização da macromolécula de

interesse tem sido o principal desafio para os projetos que envolvam a cristalografia de macromoléculas.

Um experimento típico de cristalização de proteínas obedece a um diagrama de fases característico (Figura 15A). O processo se inicia com a amostra em uma solução aquosa estabilizada por um tampão, sal, agente redutor, ligante ou outro reagente. A amostra inicialmente se encontra em uma solução saturada mantendo o equilíbrio, impossibilitando o crescimento de cristais. Para que ocorra a formação de cristais é necessário que a amostra esteja supersaturada, sendo necessário que haja uma perturbação no sistema, provocando um desequilíbrio na amostra.

A adição de um agente precipitante provoca uma diminuição na solubilidade da amostra e concomitantemente aumenta a supersaturação em três diferentes fases ou zonas. A primeira fase é a zona metaestável, uma região onde os núcleos de cristais não crescem espontaneamente, mas cristais de *seeding* crescem. A segunda fase é a zona de nucleação, região em que os núcleos e o crescimento dos cristais podem ocorrer espontaneamente. A precipitação da amostra ocorre na zona de precipitação⁹⁶.

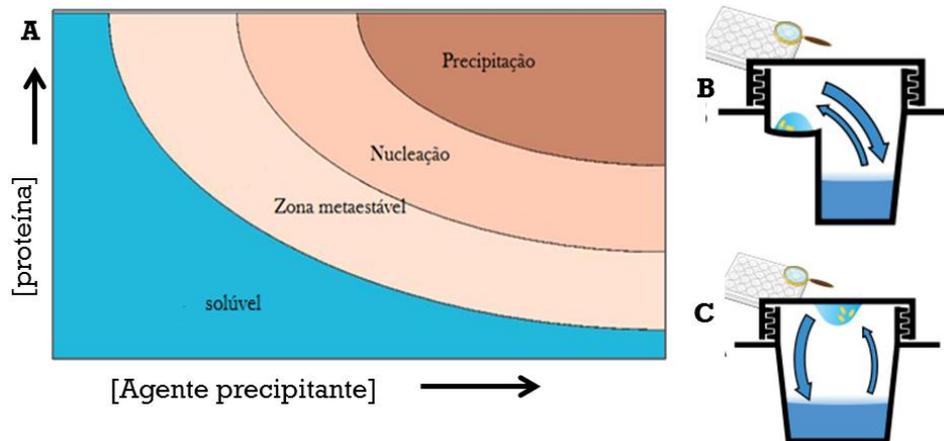


Figura 15- Esquema para cristalização de proteínas por difusão em vapor. (A) O diagrama de fases é dividido em quatro zonas. Zona estável ou solúvel, metaestável, nucleação e precipitação. O eixo y representa a concentração da proteína e o eixo x representa a concentração do agente precipitante. Outros parâmetros de solubilidade podem também ser utilizados, tais como: temperatura, pH, etc. À medida que a concentração do agente precipitante aumenta, a solubilidade da proteína diminui. (B) Experimento de difusão de vapor com a gota sentada. Nesse método a gota fica sentada em uma plataforma e a cristalização ocorre após a proteína atingir o equilíbrio com a solução do poço. (C) Na difusão de vapor por gota pendurada, a gota fica pendurada em uma lamínula siliconizada. Após atingir o equilíbrio, os cristais da proteína crescem na gota.

Existem diversas técnicas que podem ser utilizadas nos experimentos de cristalização. Porém, em nesse trabalho foram utilizados apenas a difusão de vapor em gota sentada e pendurada (Figura 15B e C). Ambas as técnicas são métodos mais populares e de fácil desempenho em cristalização de proteínas. A montagem do experimento requer uma pequena quantidade das amostras e permite uma alta flexibilidade de ensaios e otimização.

Usando a técnica da gota sentada, a concentração inicial do reagente na gota é menor que no poço. Depois de algum tempo, a gota vai perdendo água para o poço por difusão de vapor até que atinja um equilíbrio entre a gota e a solução do poço. Na técnica da gota pendurada pequenas porções da amostra e da solução do poço são misturadas e colocadas em uma lamínula siliconizada. Em seguida, a lamínula é invertida sob a solução do poço. O processo para atingir o equilíbrio entre a gota e a solução do poço é idêntico ao método da gota sentada. Em ambos os processos, durante o equilíbrio, as amostras são concentradas, aumentando a supersaturação da amostra na gota.

3.8.1 PPAR α -LBD:GL479

Os ensaios de cristalização do PPAR α foram realizados sem a cauda de histidina. Como não se tinha uma condição ideal para cristalização dessa proteína, inicialmente foram utilizadas as condições de cristalização descritas na literatura. Porém, em todas as tentativas nenhum cristal cresceu nestas condições descritas previamente. Por isso, foram montados diversos kits de cristalização comerciais das empresas Hampton Research e Molecular Dimensions para o robô de cristalização (*Honeybee*), que faz uso da técnica de difusão a vapor com gota sentada. A proteína encontrava-se a 10,0 mg/mL com 5 vezes de excesso molar do ligante.

Após intensas tentativas de determinar uma condição de cristalização reprodutível para o PPAR α -LBD, chegou-se a uma condição na qual podemos obter cristais em forma de pequenas agulhas. No entanto, estes cristais não difratavam em resoluções que pudessem ser coletados. Portanto, essas agulhas foram otimizadas empregando-se a difusão de vapor em gota suspensa. Nesta etapa, a proteína foi concentrada a 15 mg/mL e incubada com 5 vezes de excesso molar do ligante GL479 por aproximadamente 3 h. Em cada poço da placa de cristalização foi adicionado 1 mL da solução de cristalização, em seguida foi preparada uma gota em uma lamínula siliconizada com 1 μ L da solução de cristalização juntamente com 1

μL do complexo PPAR α -LBD:GL479 e mantidos a 18 °C. A solução do poço para os melhores cristais continha 27% PEG 20000 e 100 mM Tris-HCl, pH 7,0.

3.8.2 PPAR γ -LBD-GL479

Para o complexo PPAR γ -LBD:GL479 a técnica utilizada também foi a difusão de vapor em gota suspensa. A proteína foi concentrada a 10 mg/mL com 4 vezes de excesso molar do ligante. De forma semelhante ao procedimento adotado para o PPAR α a solução foi mantida a 18 °C por aproximadamente 5 h antes da montagem final do experimento. Em seguida em uma placa de cristalização com 24 poços, um conjunto de condições de cristalização foram montadas utilizando citrato de sódio tribásico com variações na concentração de 0,75-1,2 M e 100 mM Hepes variando o pH em 7,0, 7,5 e 8,0, com temperatura controlada de 18 °C. O processo de montagem da gota foi idêntico ao usado para o PPAR α -LBD, já descrito anteriormente.

3.9 Coleta de dados e determinação estrutural

A coleta de dados é o último experimento físico que é conduzido antes da fase *in silico* para a determinação da estrutura proteica. Para a coleta de dados foi utilizado o método de rotação. Como o próprio nome indica, este método envolve uma rotação simples do cristal em um único eixo e à medida que o cristal é rotacionado e exposto aos raios-X as reflexões são gravadas em um detector. Os cristais dos complexos de ambos os receptores foram coletados a 100 K na linha MX-2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron em Campinas (LNLS), com um detector Marmosaic-225 CCD (MarUSA).

As estratégias de coleta para definir parâmetros como o tempo de exposição, ângulo inicial e final da coleta e a distância adequada do detector ao cristal, foram realizadas utilizando o programa iMOSFLM⁹⁷. As reflexões observadas foram reduzidas e processadas no programa XDS⁹⁸ e o escalonamento no programa SCALA⁹⁹, durante essa etapa 5% das reflexões foram separadas para a coluna do R_{free}. Com exceção do XDS, todos os demais programas estão disponíveis no pacote CCP4¹⁰⁰. As estruturas foram resolvidas por

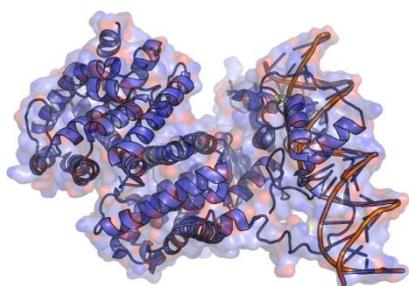
substituição molecular pelo programa PHASER¹⁰¹, utilizando como modelo de buscas as coordenadas da estrutura 2P54 para o PPAR α ¹⁰² e 3SZ1 para o PPAR γ ¹⁰³.

3.10 Refinamento e análise estrutural

Os ajustes manuais do modelo à densidade eletrônica foram realizados utilizando o programa gráfico COOT¹⁰⁴. As coordenadas (x,y,z) e os B-fatores (análise do fator temperatura dos átomos da proteína) foram automaticamente ajustados após diversos ciclos de refinamento no programa PHENIX¹⁰⁵. Durante o estágio final do refinamento também foram inclusos como parâmetros de refinamento a Simetria Não-Cristalográfica (NCS) e grupos de *Translation/Libration/Screw* (TLS).

No refinamento cristalográfico das coordenadas atômicas das estruturas de proteínas é comum serem usados dois parâmetros para o acompanhamento do refinamento, o R_{factor} e R_{free} ¹⁰⁶. Esses fatores são índices de concordância entre os dados de difração de raios-X e o modelo que está sendo refinado. Normalmente, são esperados valores de R_{factor} menores que 20% e R_{free} menores que 30%, para o modelo final da estrutura.

Além disso, durante o refinamento cristalográfico, os valores dos B-fatores das águas e ligantes foram inspecionados e aqueles que apresentavam altos valores em relação a proteína foram removidos do modelo final. A qualidade estereoquímica dos modelos finais foi aferida pelo programa MOLPROBITY¹⁰⁷. Os contatos interatômicos proteína:ligante foram analisados no programa LIGPLOT¹⁰⁸. A análise e produção de figuras de elementos de estrutura secundária e de interações no sítio ativo, bem como, dos B-fatores foram providenciadas pelo programa PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5.0.4 Schrödinger, LLC).



Capítulo 4

“I was captured for life by chemistry and by crystals.”

Dorothy Crowfoot Hodgkin

Prêmio Nobel em Química em 1964

4 Glitazars como monoterapia para o diabetes do tipo 2 e dislipidemia

4.1 Resultados

4.1.1 Expressão e purificação das proteínas PPAR α -LBD e PPAR γ -LBD

Os domínios LBD dos PPAR α e γ foram expressos em larga escala na bactéria *E. coli*. Como em estudos de cristalização de proteínas a demanda por proteína pura é alta, ambos os isotipos foram expressos utilizando 6 L de culturas para cada proteína. A fim de conseguir os receptores puros e com alto rendimento, a purificação foi realizada em duas etapas: i) cromatografia por afinidade e ii) cromatografia por exclusão de tamanho. Este último método garantiu uma melhor separação entre as proteínas de interesse das proteínas contaminantes.

Na etapa da cromatografia por afinidade a maioria dos contaminantes presentes nos extratos passou direto sem se ligar na coluna de afinidade. A Figura 16 corresponde aos géis SDS do PPAR α e PPAR γ após a purificação por cromatografia de afinidade.

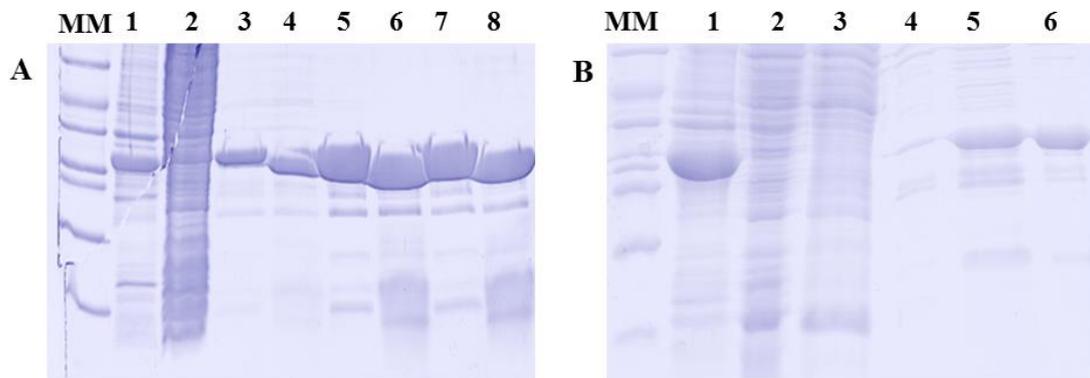


Figura 16- Gel de poliacrilamida 15% com diferentes passos da purificação em (A) PPAR α -LBD e (B) PPAR γ -LBD. **MM** Marcador de massa molecular (66 kDa, 45 kDa, 36 kDa, 29 kDa, 20 kDa e 12 kDa). As bandas mais abundantes entre **1** pelet, **2** sobrenadante e de **3-8** correspondem aos PPARs em diferentes passos da purificação. Gel corado com Comassie Blue.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Como a cromatografia de afinidade não foi suficiente para remover completamente os contaminantes presentes no PPAR α e γ , uma etapa adicional no processo de purificação foi adicionada. Desta vez, utilizou-se a cromatografia por exclusão de tamanho, na qual o princípio é a separação das proteínas pela diferença de tamanho molecular. Os cromatogramas das corridas de cromatografia por exclusão de tamanho estão demonstrados na Figura 17.

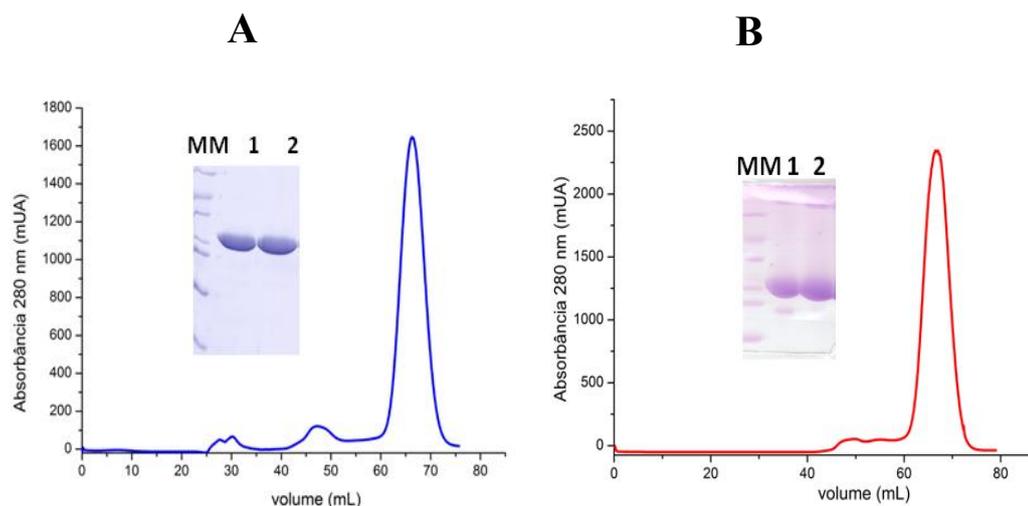


Figura 17- Cromatogramas de cromatografia por exclusão molecular de (A) PPAR α -LBD e (B) PPAR γ -LBD. Os picos de maior intensidade correspondente ao volume inicial de 60 mL são os picos das proteínas. No gel, **MM** representa o marcador de massa molecular (66 kDa, 45 kDa, 36 kDa, 29 kDa, 20 kDa e 12 kDa). Em **1** e **2** frações coletadas da proteína pura. Gel de poliácridamida 15% corado com Comassie Blue.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O pico de maior absorvância em cada gráfico representa a proteína de interesse, ou seja, os PPAR α e γ . Os demais picos representam os contaminantes que não foram separados por cromatografia de afinidade. Os géis SDS-PAGE das alíquotas retiradas das proteínas purificadas também são demonstradas na Figura 17. Para que não ocorra nenhuma interferência na cristalização das proteínas, a cauda de histidina presente foi removida completamente após 12 h de incubação à 10 °C, com a serino-protease trombina. Os resultados são vistos no gel SDS-PAGE da Figura 18.

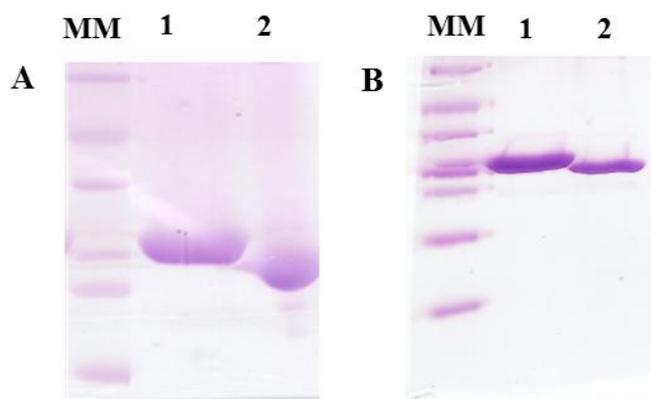


Figura 18- Gel de poliácridamida 15% da clivagem da cauda de histidina corado com Comassie Blue (A) PPAR α -LBD e (B) PPAR γ -LBD. **MM** Marcador de peso molecular (66 kDa, 45 kDa, 36 kDa, 29 kDa, 20 kDa e 12 kDa); **1** Antes da clivagem e **2** Depois da clivagem.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.1.2 Cristalização, coleta de dados e determinação estrutural dos complexos com o agonista dual PPAR α / γ -LBD:GL479

Para a cristalização do complexo PPAR α -LBD:GL479 diversos *kits* de cristalização comerciais foram testados. A partir deste teste inicial, alguns pequenos cristais cresceram no formato de agulhas finas em uma condição de cristalização contendo o PEG 20000 como agente precipitante (Figura 19A). Estes cristais foram testados na linha de luz MX2 e não apresentaram padrões de difração com resolução suficiente para aquisição de um conjunto de dados. A obtenção de cristais com capacidade de difração para aquisição de dados, só foi alcançada quando a condição inicial foi otimizada, variando o pH e a concentração do PEG 20000 da solução do poço.

Após várias tentativas de se obter um único cristal, um aglomerado de placas maiores cresceram após 3 dias da montagem do sistema na condição com 27% PEG 20000 e 100 mM Tris-HCl pH 7,0. Para a coleta, um único cristal foi isolado, na própria gota, com o auxílio de uma agulha de acupuntura e coletado em uma resolução máxima de 2,30 Å (Figura 19B). O cristal do complexo PPAR α -LBD:GL479 teve os dados processados no grupo espacial P4₁2₁2. O Coeficiente de Matthews sugeriu a possibilidade de um monômero na unidade assimétrica com um volume molecular de 16,7 Å³/Da e 41,17% de solvente preenchendo a cela unitária¹⁰⁹. Essas informações foram confirmadas após a substituição molecular pelo programa PHASER.

O modelo final foi refinado a uma resolução de 2,30 Å, convergindo para os índices R_{factor} de 21,88% e R_{free} de 26,64%. O modelo apresentou um monômero por unidade assimétrica, uma molécula do ligante GL479 ligado no sítio ativo e 52 moléculas de água. A geometria do modelo apresenta 98,33% de resíduos na região favorável, 1,67% na região permitida e nenhum resíduo na região proibida. As estatísticas da coleta de dados, refinamento e parâmetros da qualidade do modelo estão resumidas na Tabela 2.

A estrutura do domínio LBD do PPAR α ligado ao GL479, como era de se esperar para esse receptor, apresentou um enovelamento característico da superfamília de receptores nucleares com 13 hélices- α e três fitas- β (Figura 20). O LBP do PPAR α -LBD é um dos maiores bolsões desta superfamília com aproximadamente 1400 Å³ e acomodou o ligante nesse bolsão¹¹⁰.

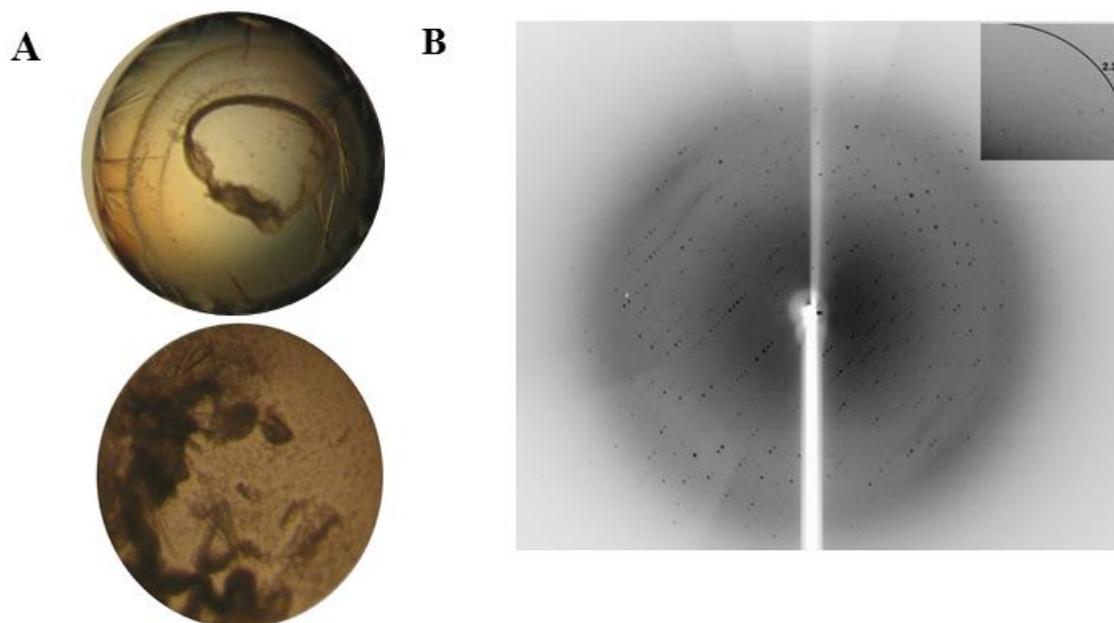


Figura 19- Cristais e padrão de difração da proteína PPAR α -LBD complexada com o GL479. (A) A gota superior representa os primeiros cristais em forma de agulhas finas do complexo PPAR α -LBD:GL479 utilizando a técnica da gota sentada com *kits* de cristalização. Na gota inferior estão os cristais utilizados na difração por raios-X, estes cristais cresceram utilizando a técnica de difusão de vapor com a gota pendurada e foram otimizados a partir dos primeiros cristais obtidos. A condição de cristalização continha 27% PEG 20000, 100 mM Tris-HCl pH 7,0. (B) Padrão de difração do complexo PPAR α -LBD:GL479, com a resolução máxima obtida de 2,30 Å.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Algumas regiões da estrutura apresentaram uma densidade eletrônica fraca e, por essa razão, não foram modelados os átomos nessa região do modelo final. Isso ocorre devido a alta mobilidade térmica dessas regiões, correspondendo em sua maioria à conformações de *loops*. Os resíduos que compreendem esses *loops* estão situados entre as regiões do N230-P237 e V255-K266. Os resíduos localizados entre V255-K266 correspondem ao denominado Ω -*loop* que está localizado na entrada do sítio ativo, entre as H2' e H3. Em geral, o Ω -*loop* só aparece nas estruturas em que o ligante interage diretamente com este *loop*, provocando assim uma maior estabilização dessa região.

Tabela 2- Estatísticas cristalográficas da coleta e refinamento do PPAR α -LBD e PPAR γ -LBD complexados com o agonista dual GL479.

Parâmetros	PPAR α -LBD:GL479	PPAR γ -LBD:GL479
Coleta de Dados		
Comprimento de onda/Linha	1,459/LNLS-MX2	1,459/LNLS-MX2
Grupo espacial	P4 ₁ 2 ₁ 2	C2
Parâmetros da cela unitária	64,54; 64,54; 124,40; Å	88,48; 64,24; 118,78; Å 90,00; 101,94; 90,00; °
Resolução (Å)	44,79-2,30(2,38-2,30)	32,53-1,77 (1,83-1,77)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	15,30 (3,08)	19,28 (3,68)
Multiplicidade	6,6 (6,5)	4,2 (3,3)
Completeza	99,78 (98,82)	98,61 (97,61)
Rmerge [§]	0,025 (0,314)	0,042 (0,391)
Número de moléculas na U. A.	1	2
Número de reflexões únicas	12217 (1168)	62608 (6155)
Refinamento		
R _{factor} /R _{free}	21,88/26,64	16,94/20,82
B-fatores médio	55,70	34,20
RMSD de ligação, Å	0,009	0,019
RMSD de ângulo, °	1,10	1,75
Ramachandran plot (%)		
Região favorável	98,33	99,00
Região permitida	1,67	1,00
Região não permitida	0	0
Clashscore	4,88	7,07

$\S R_{merge} = \frac{\sum hkl \sum i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle|}{\sum hkl \sum i I_i(hkl)}$, 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 à camada mais externa de resolução.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Recentemente, Bernardes e colaboradores (2013) identificaram um segundo sítio na região do Ω -loop. O ligante WY14643 foi estabilizado por contatos apolares, pontes salinas e por contatos polares com o resíduo K266¹¹¹. Assim como no PPAR α , as estruturas depositadas no PDB dos receptores nucleares PPAR β e γ também apresentam uma alta flexibilidade na região do Ω -loop e quase sempre estão desordenadas, sugerindo que a entrada do LBP pode se adaptar e permitir a entrada de ligantes volumosos, sem gerar nenhuma mudança significativa na estrutura⁴⁷.

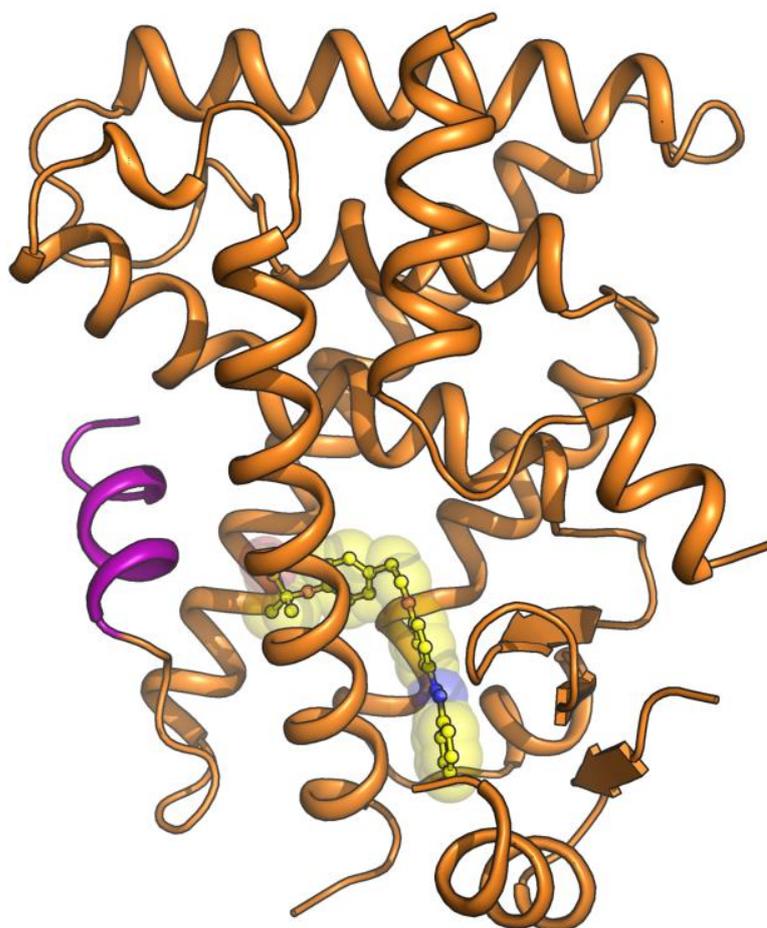


Figura 20- Estrutura do PPAR α -LBD ligado ao GL479. O esquema representa uma visão geral do monômero do PPAR α -LBD:GL479. O ligante está sendo mostrado em *ball e stick*, envolto por uma superfície em amarelo. A H12 apresenta conformação ativa e foi colorida em lilás.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Atualmente, existem no PDB 120 estruturas[§] do PPAR γ -LBD resolvidas utilizando a técnica de cristalografia de raios-X. A maioria destas estruturas encontra-se na forma *holo* e foram cristalizadas à partir da condição que explora o citrato de sódio tribásico como agente precipitante^{103;112-113}. Os cristais do complexo formado entre o PPAR γ -LBD e o agonista dual GL479 cresceram em praticamente todas as concentrações de citrato de sódio tribásico e em diferentes valores de pH em que foram montados. Visualmente, observou-se que o cessamento do crescimento do cristal ocorreu após 5 dias do aparecimento dos primeiros cristais na placa (Figura 21A). Como cresceram muitos cristais, foi selecionado visualmente o de melhor aparência externa para a coleta de dados. O cristal selecionado foi coletado a uma

[§] Até o depósito desta tese (25/06/2014).

resolução máxima de 1,77 Å (Figura 21B).

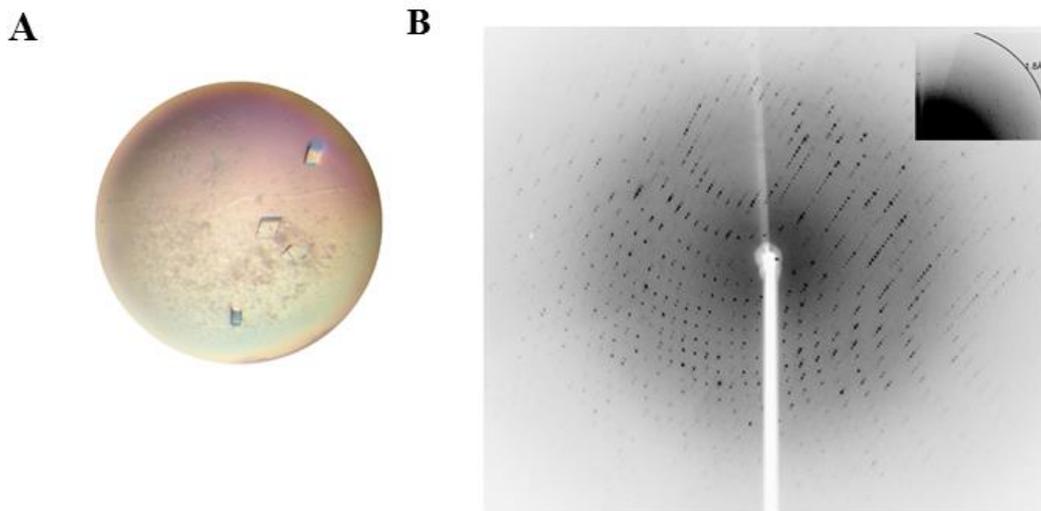


Figura 21- Cristais e padrão de difração da proteína PPAR γ -LBD complexado com GL479. (A) Cristais utilizados na difração por raios – X. Esses cristais cresceram utilizando a técnica de difusão de vapor com a gota pendurada. A condição de cristalização continha 1,1 M de citrato de sódio tribásico, 100 mM Hepes pH 7,5. (B) Padrão de difração do complexo PPAR γ -LBD:GL479, a resolução máxima obtida foi de 1,77 Å.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A estrutura do complexo PPAR γ -LBD:GL479 também foi resolvida por substituição molecular utilizando o PHASER no grupo espacial C2. Em uma visão geral, a estrutura apresenta um homodímero na unidade assimétrica, característica comum para essa condição de cristalização e grupo espacial^{72;103;114}. Os monômeros são denominados de cadeia A e B, e são praticamente iguais, exceto na posição da H12 onde a cadeia A representa a forma ativa (H12 fechada) e a cadeia B mantém-se numa conformação inativa (H12 aberta). A conformação inativa vista para a cadeia B, é causada devido aos contatos cristalinos com os resíduos vizinhos da molécula simétrica da cadeia A. São essas interações que provavelmente impedem uma mudança para conformação ativa¹¹⁵. A cadeia B será pouco explorada no decorrer desta tese, uma atenção maior será dada a conformação ativa.

A estrutura do complexo apresenta no modelo final 410 moléculas de água e duas moléculas do GL479, sendo uma molécula do ligante ocupando o sítio ativo de cada cadeia proteica (Figura 22). A geometria do modelo demonstrou que todos os resíduos se encontram na região mais favorável e permitida do gráfico de Ramachandran. De forma semelhante ao complexo PPAR α -LBD:GL479, a região correspondente ao Ω -loop foi removida na estrutura

do PPAR γ -LBD:GL479 devida a alta mobilidade térmica, região localizada entre os resíduos K262-S275. Os dados estatísticos da coleta e refinamento encontram-se na Tabela 2

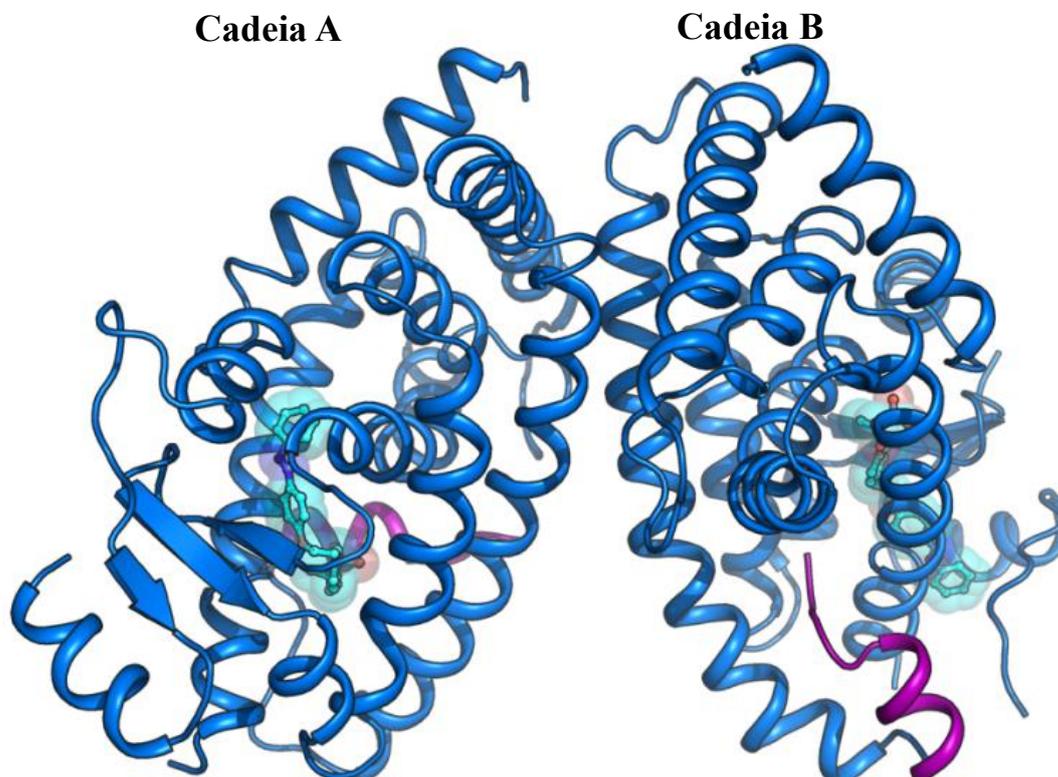


Figura 22- Estrutura do PPAR γ -LBD complexado com GL479. Representação do dímero na unidade assimétrica do PPAR γ :LBD com o GL479. As hélices em ambas as cadeias estão representadas em azul, com exceção das H12 que estão em lilás. O GL479 está representado em *ball e stick* predominantemente ciano, envolto por uma superfície também em ciano.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os *omit map* para o GL479 de ambas as estruturas foram calculadas e revelaram claramente a densidade eletrônica do ligante ligado ao PPAR α e PPAR γ , permitindo precisamente o seu posicionamento no LBP de cada receptor (Figura 24A, Figura 25A e Figura 27A). Os PPARs têm uma cavidade em forma de Y, onde ocorre a ligação do ligante. Essa cavidade estende-se da hélice AF-2 (H12) do C-terminal até as fitas- β . Este bolsão é dividido em três braços que apresenta uma homologia de 60-70% entre os três isotipos¹¹⁰. O braço da esquerda (braço I) é composto de uma mistura de resíduos polares e hidrofóbicos, incluindo dois resíduos da hélice AF-2. Enquanto que o braço superior direita e o da inferior da direita representa os braços II e III, respectivamente e são constituídos principalmente por resíduos hidrofóbicos (Figura 23).

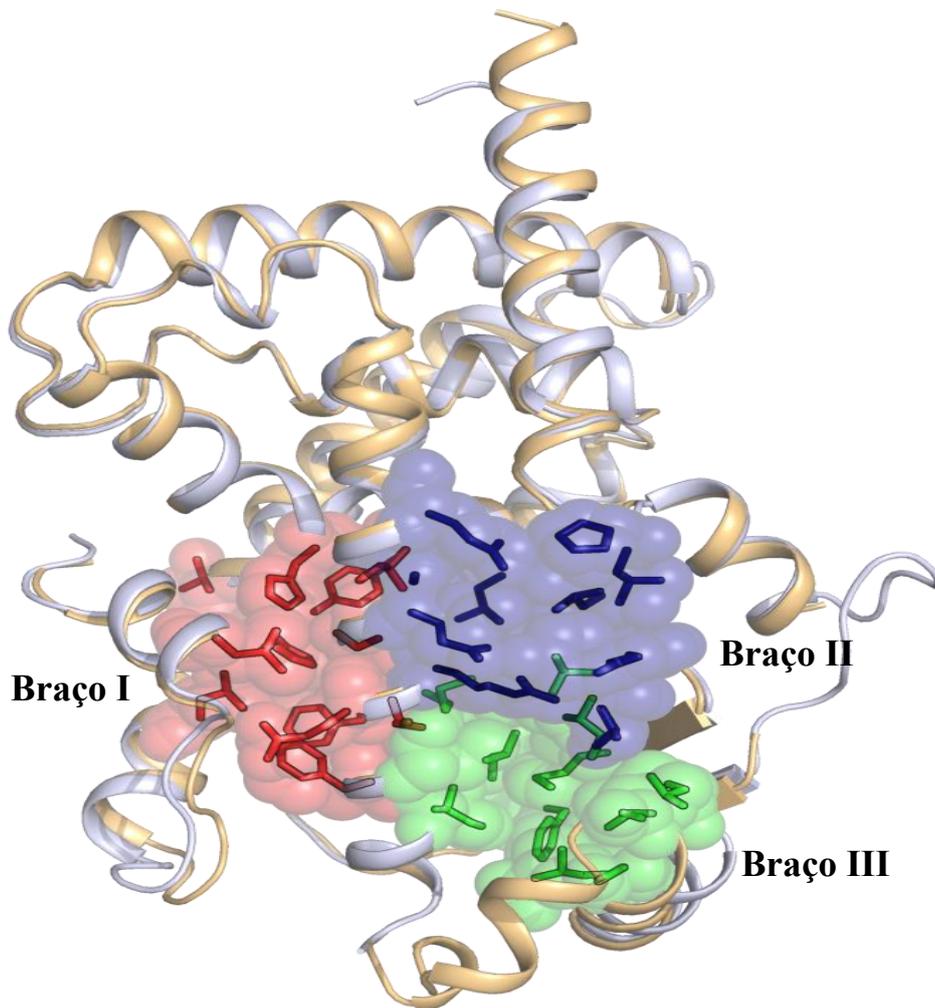


Figura 23- Caracterização do sítio ativo dos PPARs. O monômero do PPAR α -LBD (laranja) foi superposto ao monômero ativo do PPAR γ -LBD (azul-claro). As esferas demonstram os três braços que compõe o sítio ativo. O braço I representa o braço polar do sítio e foi colorido em vermelho, o braço II e III foram coloridos em azul e verde, respectivamente e representa a parte apolar do LBP.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O GL479 ocupa cerca de 30% do volume total do LBP dos PPAR α e PPAR γ e, em ambas as estruturas o ligante foi estabilizado por uma combinação de ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas. Dentro do LBP do PPAR α , o GL479 adota uma conformação em forma de U cercado pelas hélices H2', H3, H7, H10/11, H12 e pelas fitas- β 2 e 3. Essa conformação permite que o ligante ocupe as regiões dos braços I e III. Das cinco ligações de hidrogênios, quatro delas ocorrem entre o grupo carboxílico presente no GL479 com os resíduos S280 (H3), Y314 (H5), H440 (H11) e Y464 (H12). A outra ligação acontece entre o grupo fenóxi próximo à cabeça polar do ligante com o resíduo S280 (H3) (Figura 24B).

Em adição as ligações de hidrogênios, diversas interações hidrofóbicas foram formadas com a cauda lipofílica, ajudando na estabilização do GL479. Essas interações acontecem devido à natureza hidrofóbica do LBP, principalmente na região dos braços II e III, que é composto predominantemente de cadeias laterais hidrofóbicas. Estes contatos são formados pelos seguintes resíduos: L247, F273, C276, Q277, T279, F318, L321, V332, I354, M355 e L460, (Figura 28A).

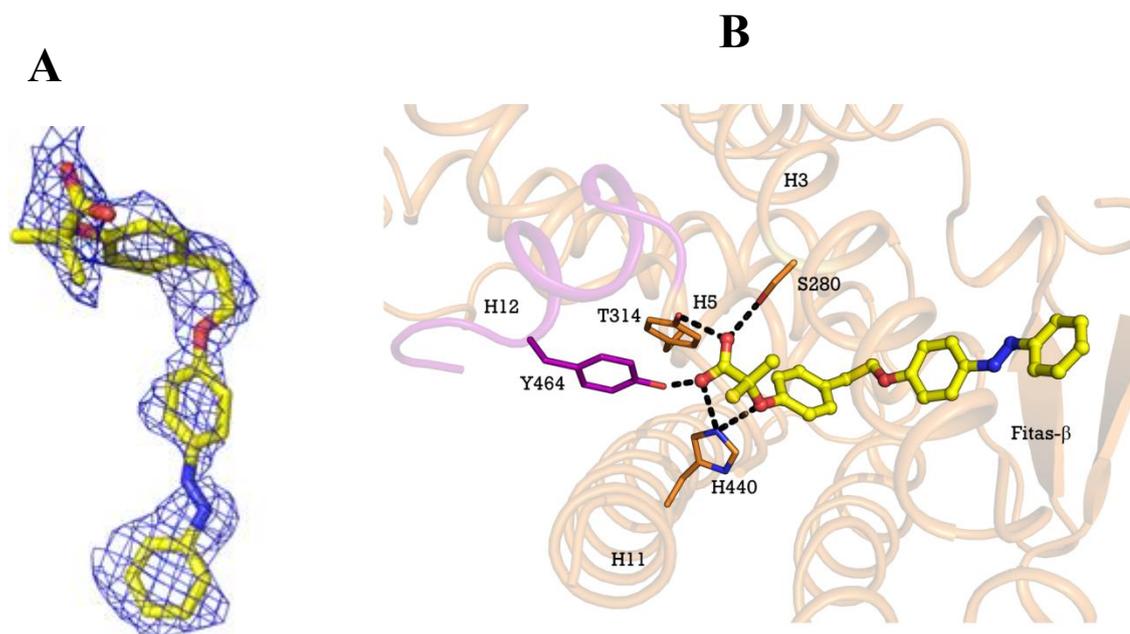


Figura 24- Caracterização estrutural do GL479 no PPAR α -LBD. (A) O *omit map* do GL479 para o complexo em *2Fo-Fc*, o contorno mostrado para o ligante é de $1,0\sigma$. (B) Ligações de hidrogênio envolvidas na estabilização do ligante, observe que o GL479 possui na sua cabeça polar um grupo carboxílico que faz interações com os resíduos polares do braço I do LBP do PPAR α . Os resíduos que fazem estes contatos estão em *stick*. Uma destas interações envolve a Tyr464 da H12 (lilás), essa interação resulta na estabilização da conformação ativa da H12.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Surpreendentemente, na conformação ativa do complexo PPAR γ :GL479, o ligante adota uma conformação e ocupação diferente da observada para o complexo do GL479 com o PPAR α (Figura 26). Essa conformação também é diferente da que é encontrada na maioria dos agonistas desta subfamília de receptores. No geral, a maioria destes agonistas apresenta uma conformação em forma de U¹¹⁴⁻¹¹⁵. Em comparação com o complexo PPAR α :GL479, a rede de ligações de hidrogênio que estabiliza a cabeça polar do GL479 no braço I do LBP é mantida e envolve os resíduos S289 (H3), H323 (H6), H449 (H11) e Y473 (H12) (Figura

25B). Entretanto, as interações hidrofóbicas que ajudam a estabilizar o ligante presente no braço III são substituídas por interações hidrofóbicas que estão localizadas no braço II.

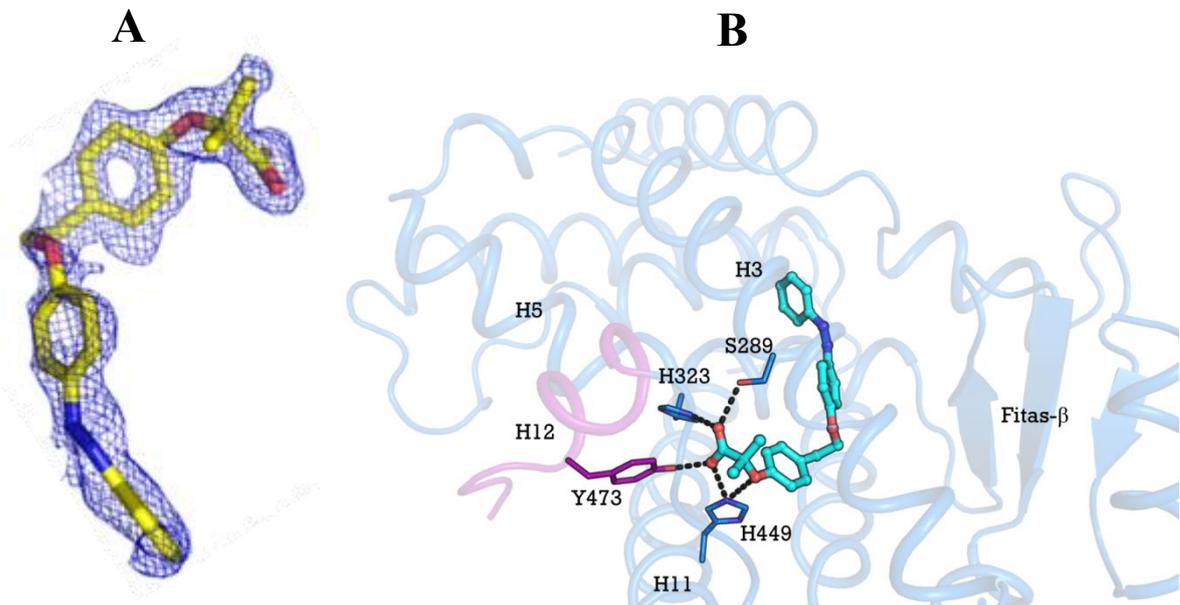


Figura 25- Caracterização estrutural do GL479 no PPAR γ -LBD na conformação ativa (A) O *omit map* do GL479 para o complexo em *2Fo-Fc*, o contorno mostrado para o ligante é de $1,0\sigma$. (B) Ligações de hidrogênio envolvidas na estabilização do ligante, observe que o GL479 possui na sua cabeça polar um grupo carboxílico que faz interações com os resíduos polares do braço I do LBP do PPAR γ . Os resíduos que fazem estes contatos estão em *stick*. Uma destas interações envolve a Tyr473 da H12 (lilás), essa interação resulta na conformação ativa da H12.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Em ambas as estruturas, nota-se que a conservação do padrão de ligações de hidrogênio e a estabilização da região da H12 é imprescindível para que ocorra a ativação destes receptores. Toda via, apesar da alta homologia no sítio ativo das duas proteínas, principalmente na região dos resíduos hidrofóbicos, pequenas diferenças influenciam diretamente no padrão de ligação do GL479, em especial na cauda do ligante que é estabilizada somente por interações hidrofóbicas.

Os resíduos que formam a maioria dos contatos apolares com GL479 ocuparam o braço III do LBP do PPAR γ e engloba os resíduos F226, R288, A292, M329, L330 e M364. Essas interações permitem que o ligante adote uma conformação em forma de S. A conformação em S favorece a ocupação do ligante no braço I e II, divergindo de praticamente todos os ligantes já complexados com os PPAR α e PPAR γ , que em sua maioria ocupam os braços I e III ou os braços II e III¹¹⁶. Essa diferença de conformação do GL479 não interfere no perfil das ligações de hidrogênios que ocorrem entre o ligante e os resíduos localizados no

braço I do LBP. A manutenção desse padrão de ligações força, em ambos os casos, a cadeia A adotar uma conformação ativa, ou seja, o "estado fechado". A divergência na ocupação do LBP em cada receptor pode ser mais bem visualizada na Figura 26.

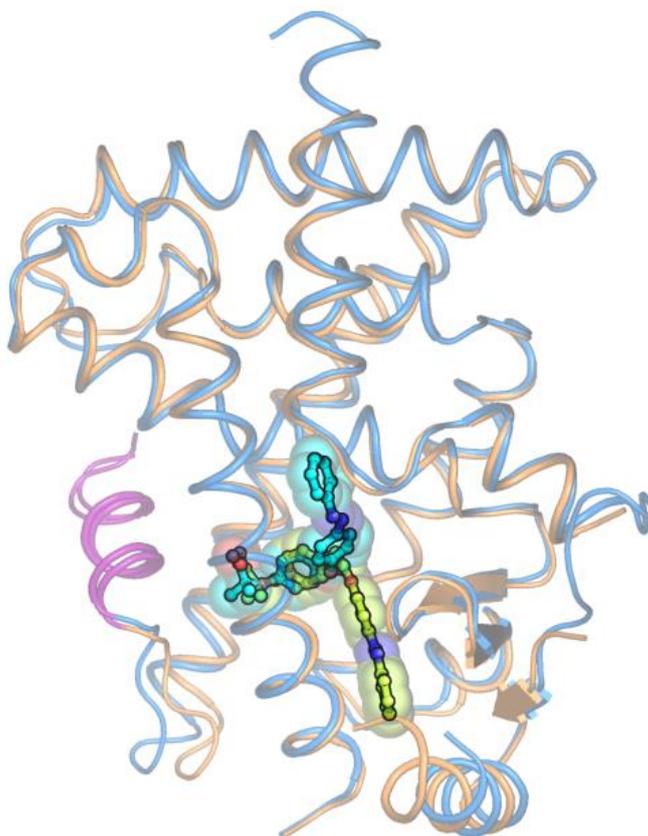


Figura 26- Sobreposição dos complexos PPAR α -LBD:GL479 (laranja) e PPAR γ -LBD:GL479 (azul). O GL479 ocupa o LBP dos PPAR α e γ em distintas configurações. O grupo carboxílico adota essencialmente a mesma conformação em ambas as estruturas. No entanto, a cauda hidrofóbica do ligante alterna em duas configurações. No modo de ligação do PPAR α , a cauda hidrofóbica foi dobrada em direção à região do braço III do LBP. No segundo modo de ligação, dentro LBP do PPAR γ , a cauda hidrofóbica do GL479 fica dobrada para baixo em direção ao braço II do LBP. O GL479 das duas estruturas estão mostrados em *ball* e *stick*, em amarelo está o GL479 para o PPAR α e em azul para o PPAR γ .

Fonte: Elaborada pelo autor.

Na conformação inativa, o ligante GL479 fica localizado entre as hélices- α H3, H4 e H6, e as folhas- β S2 e S3. Nesta posição, apenas duas ligações de hidrogênio com a R288 da H3 é formada (Figura 27). Ao contrário da conformação ativa e do complexo com o PPAR α , que não apresentam a região do Ω -loop devido sua alta flexibilidade, na conformação inativa esta região apresenta parcialmente estruturada. Acredita-se que as interações com as folhas- β S2 e S3 estão diretamente relacionadas com a estabilização e, conseqüentemente, a estruturação do Ω -loop¹⁰². Os demais contatos que ajudam a estabilizar o GL479 são

formados por contatos apolares com os resíduos L255, E259, F264, H266, I267, R280, C285, Q286, R288, I281, G284, C285, S289, A292, I326, M329, L330, L333, I341 e M348.

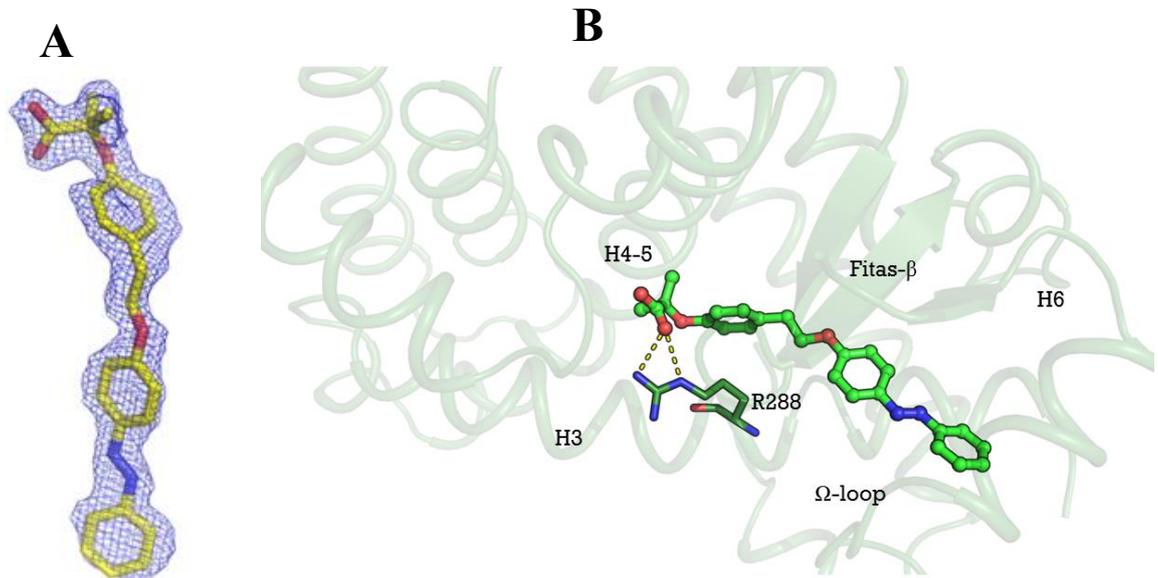


Figura 27- Detalhes atômicos do reconhecimento do GL479 pelo PPAR γ -LBD na conformação inativa (Cadeia B). (A) *Omit map* em *2Fo-Fc* mostrado em um contorno de 1.0σ em torno do ligante. (B) Ligações de hidrogênio envolvida na estabilização do ligante, na cadeia B o ligante não interage com a H12.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.1.3 A ocupação do LBP dos PPARs *versus* o agonismo parcial/total

As duas estruturas cristalográficas complexadas com um único ligante permitiram a racionalização dos resultados observados nos ensaios de transativação, os quais descreveram o GL479 como um agonista total para o PPAR α e como agonista parcial para o PPAR γ . Baseado em estudos que combinam a determinação estrutural de complexos em alta resolução com estudos funcionais que descrevem a afinidade e potência para os agonistas dos PPARs, um mecanismo estrutural mais provável para estes agonistas foi descrito. Neste mecanismo os agonistas totais interagem diretamente com a H12 por meio de uma ligação de hidrogênio com o resíduo Tyr, que é altamente conservado nessa região (Figura 6).

Diferentemente, os agonistas parciais são estabilizados utilizando outros mecanismos sem um contato direto com a H12¹¹⁴. A variação estrutural observada no receptor apo, ligado a um agonista total ou a um agonista parcial, lidera a ideia de que o modo de ligação adotado

pelo ligante e, principalmente, a dinâmica da H12 são controlados pela atividade de transcrição do receptor. Isso fica evidente em um estudo por fluorescência de anisotropia de Schwabe e colaboradores. Nesse experimento a H12 marcada com uma sonda foi estabilizada de acordo com o grau de agonismo e da atividade transcricional do ligante. Neste estudo, outras regiões importantes do LBD que poderiam contribuir para a estabilização da H12 e, consequentemente, estabilizar o complexo receptor:coativador não foram aferidas¹¹⁷.

Para reconhecer as potenciais bases moleculares dos diferentes modos de ligação e o padrão de ativação dos dois isotipos, uma comparação detalhada de ambas as estruturas tridimensionais foi realizada. Primeiramente, uma superposição das cadeias principais gerou um R.M.S. de 0,814 entre as conformações ativas das duas estruturas. Entre os resíduos envolvidos na estabilização da cauda hidrofóbica do ligante, somente a posição do resíduo Thr273 do PPAR α que é substituído pela Ala292 no PPAR γ interfere na acomodação do ligante. A cadeia lateral da Thr273 do PPAR α é mais volumosa que a Ala292 do PPAR γ . Essa diferença de volume resulta em um impedimento estérico entre a Thr273 com o anel aromático da extremidade hidrofóbica do GL479. Como resultado do impedimento estérico, o ligante adota uma conformação diferente no PPAR α da que é vista no PPAR γ (Figura 28A).

Esta substituição também pode ser a explicação do porquê ainda não foram reportadas estruturas em que o ligante ocupe os braços I e II. Agonistas do PPAR α sempre ligam no LBP na conformação em forma de U, como pode ser visto na Figura 28B. Enquanto que os agonistas do PPAR γ além de ligar-se nessa conformação, para alguns casos também podem ser vistos ocupando o LBP numa conformação em forma de S (Figura 28C). Este modo de ligação sugere uma nova possibilidade no desenho de fármacos para os PPARs. Em um estudo realizado por Li e colaboradores (2008) com ligantes que ocupam o LBP em ambas as configurações (S e U) levou a análise que os ligantes na conformação S apresentam um balanço favorável para a ligação de proteínas coreguladoras. O efeito desta mudança de conformação reflete diretamente na resposta fisiológica do receptor, que aumenta sensibilidade insulínica para o PPAR γ , sem exacerbar os efeitos colaterais¹¹⁶.

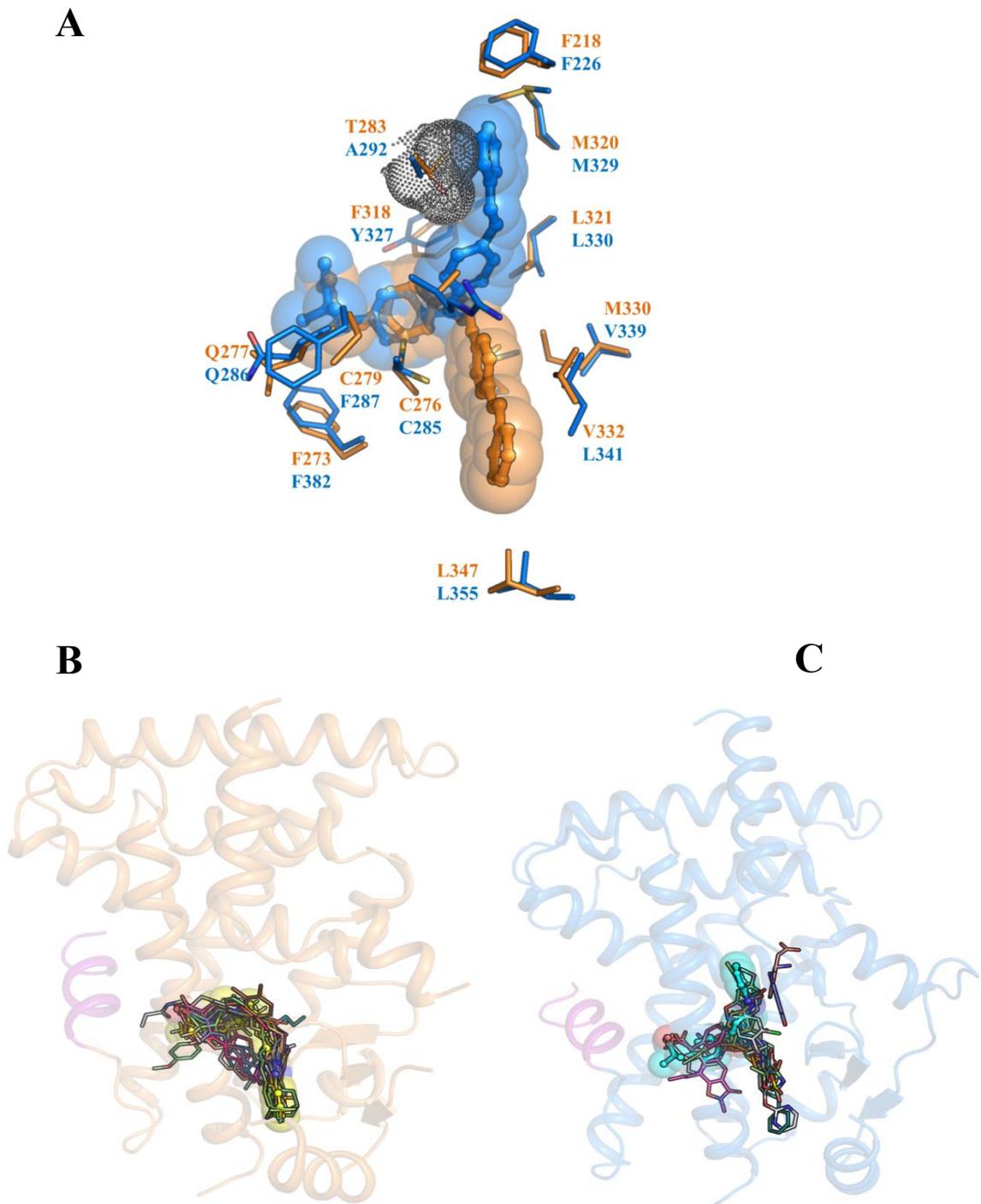


Figura 28- Comparação estrutural entre os modelos do LBD dos PPAR α e PPAR γ . (A) Sobreposição do GL479 ligado ao PPAR α (laranja) e PPAR γ (azul). Somente os resíduos que estão envolvidos nas interações apolares são mostrados. A posição da Ala292 no PPAR γ é substituída por uma Thr273 no PPAR α , este último resíduo apresenta uma cadeia lateral mais volumosa (*dots*) que a Ala, impedindo que o anel pertencente à cauda hidrofóbica do ligante acomode-se para formar o complexo na mesma região que a do PPAR γ . (B) Em todas as estruturas complexadas com o PPAR α -LBD, os ligantes adotam uma conformação em forma de U no LBP. Essa conformação também foi a ocupada para o GL479 (em *ball* e *stick* amarelo). (C) A maioria dos agonistas do PPAR γ -LBD estão na conformação em forma de U, porém alguns agonistas adotam a conformação na forma de S, o GL479 está na conformação em S (*ball* e *stick* em ciano).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Uma análise dos B-fatores do ligante e das estruturas dos receptores demonstrou que o GL479 é estabilizado e estabiliza diferentes regiões do domínio LBD do PPAR α e PPAR γ . No PPAR α o B-fator médio do ligante é 60,7 Å². Esse valor é condizente com o B-fator médio da proteína que é 55,70 Å². Para a conformação ativa do PPAR γ , o B-fator médio da proteína é 34,20 Å², valor menor que o calculado para o PPAR α . O B-fator médio do GL479 complexado com PPAR γ foi de 42,0 Å², e de forma semelhante a que acontece no PPAR α esse valor ficou próximo ao B-fator médio da proteína. O B-fator médio do ligante em relação ao da proteína é uma forma de validar a presença do ligante ligado à proteína. Quando estes valores estão muito divergentes pode ser uma indicação da ausência do ligante.

Em ambos os ligantes foi observado que as ligações de hidrogênio têm um papel primordial na sua estabilização, como pode ser visto na distribuição da Figura abaixo. Na cabeça polar do ligante, região onde ocorrem as ligações de hidrogênio, o B-fator individual dos átomos é menor que o B-fator na cauda lipofílica, a qual é estabilizada somente por interações hidrofóbicas (Figura 29). O B-fator médio menor para o PPAR γ é explicado devido a maior resolução do PPAR γ , pois os valores de B-fatores estão relacionados com a resolução da estrutura.

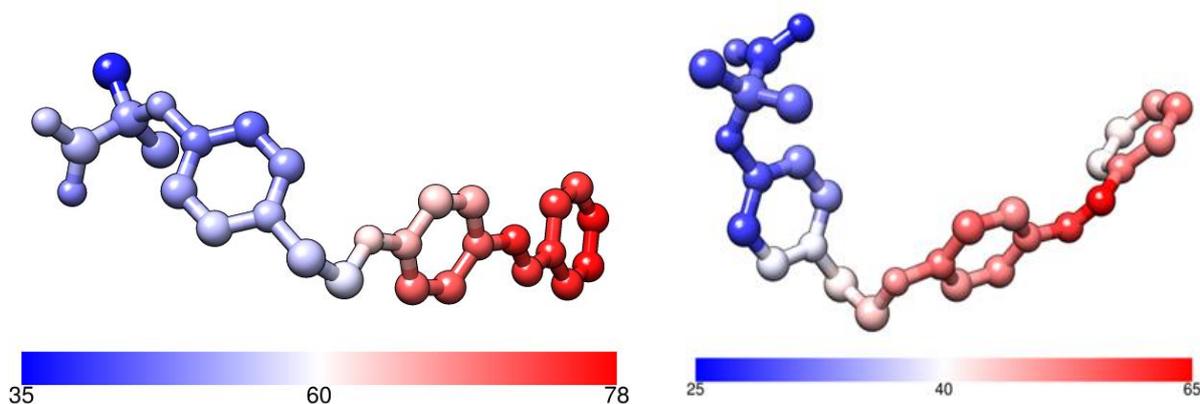


Figura 29- Dinâmica do GL479 ilustrada através da variação dos B-fatores. Na esquerda está a barra de distribuição dos valores dos B-fatores do GL479 ligado ao PPAR α -LBD e a direita a do GL479 ligado ao PPAR γ -LBD. Observa-se que em ambas estruturas a cabeça polar é mais bem estabilizada em relação a cauda lipofílica do ligante. Essa estabilização acontece devido as ligações de hidrogênio que a cabeça polar do ligante realiza com as cadeias laterais dos PPARs.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Analisando o B-fator global dos complexos, observa-se que o GL479 produz uma excelente estabilização no loop que é formado entre as hélices H11 e H12 do PPAR γ (Figura 30A). Enquanto que a região próxima ao Ω -loop é mais bem estabilizada no complexo

formado com o PPAR α (Figura 30B). Essa maior estabilidade na região adjacente ao Ω -loop do PPAR α pode ocasionar mudanças conformacionais que produzem uma diminuição na dinâmica da H12, facilitando a estabilização das interações com coativadores¹¹¹.

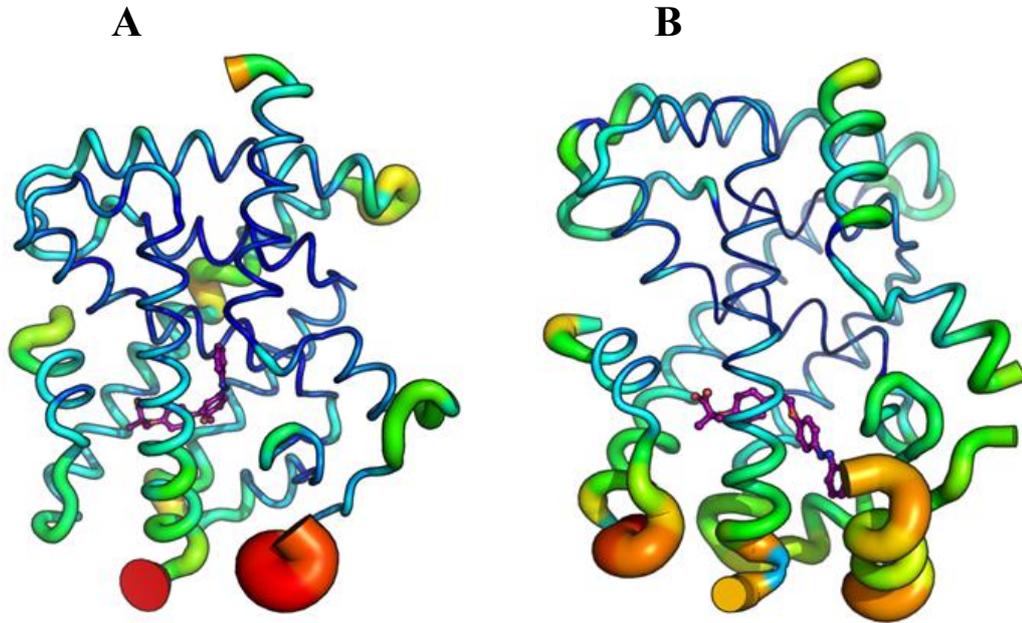


Figura 30- Estabilização induzida pela o GL479 em diferentes regiões do PPAR α e PPAR γ . A largura das representações e a coloração são proporcionais à mobilidade térmica das regiões. (A) PPAR γ -LBD:GL479. (B) PPAR α -LBD:GL479.

Fonte: Elaborada pelo autor.

De fato, estes dados só reforçam a hipótese que a interação direta com a H12 não é o único meio de atingir as respostas transcricionais¹¹⁴, mas a estabilização adicional de regiões da estrutura que não a H12, tais como as que interagem com a cauda hidrofóbica do ligante por meio de interações hidrofóbicas podem influenciar na dinâmica da H12. Em outras palavras, a atividade de transcricional observada para um ligante é determinada pelo seu modo de ligação ao receptor e não se restringe apenas a presença ou a ausência de interações direta com a H12.

4.2 Discussão

O importante papel dos PPARs nas doenças metabólicas, tais como diabetes do tipo 2 e dislipidemia está bem estabelecido, tanto em caráter funcional como estrutural^{44-45;52;62;115}. O mesmo entendimento é visto nos fármacos TZDs, representado principalmente pela pioglitazona e rosiglitazona durante a sensibilidade insulínica através da ativação ao PPAR γ , e pelos fibratos na ativação do PPAR α , induzindo a diminuição nos níveis de circulação de lipídios na corrente sanguínea. Contudo, o surgimento de fármacos agonistas duais PPAR α/γ continua sendo um desafio a ser vencido na terapia destas doenças. Embora muitos desses agonistas duais tenham sido sintetizados, nenhum destes foi aprovado para o uso clínico. Muito deles por não atender os requisitos dos ensaios clínicos de fase III em humanos ou, simplesmente, por não passarem nos ensaios pré-clínicos com animais⁸⁹.

Todas estas informações mostram a necessidade de identificar, descrever e entender o mecanismo de ação de novos agonistas duais PPAR α/γ . Atualmente, poucos agonistas duais PPAR α/γ tiveram suas estruturas resolvidas para ambos os receptores^{82;110;118-119}. O entendimento estrutural fica ainda mais limitado para esses agonistas duais, visto que em todos os casos descritos até o momento, o ligante na conformação ativa adota uma posição idêntica nos dois receptores ocupando os braços I e III, o que conjectura para um modo de ligação idêntico em ambos os PPARs (Figura 31).

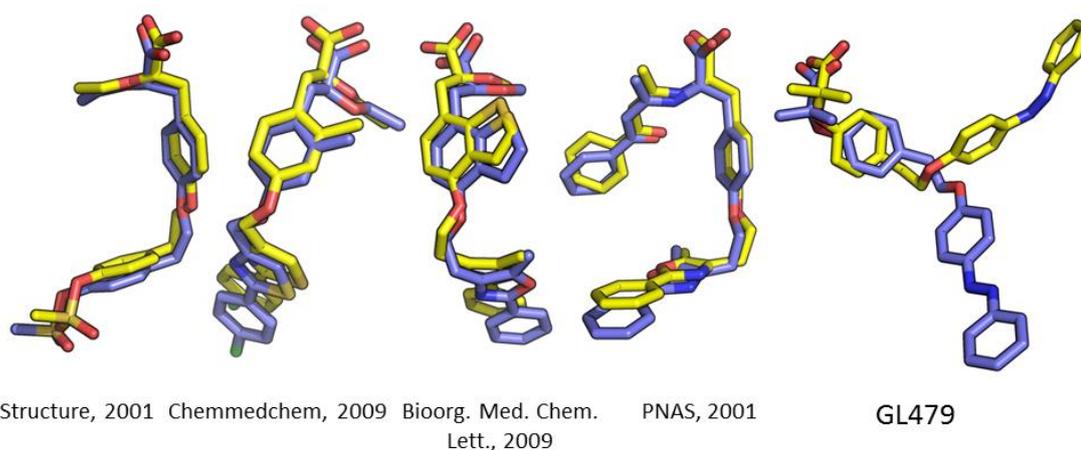


Figura 31- Sobreposição do GL479 nos monômeros ativos dos agonistas duais PPAR α/γ com estruturas resolvidas. O GL479 é o único agonista dual com estruturas resolvidas que apresenta modos de ligações diferentes. No PPAR α em azul, o GL479 ocupa os braços I e II do LBP. O PPAR γ está em amarelo e ocupa os braços I e III.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O complexo PPAR α :GL479 estabiliza regiões que previamente foram ocupadas por outros agonistas totais deste receptor, tais como o AZ-242¹¹⁸, APHM13¹²⁰ e um derivado do oxibenzilglicina¹²¹. Estes agonistas totais, juntamente com o GL479, estabilizam principalmente as hélices H3, H5, H7, H11 e H12 do LBD. Os complexos formados entre estes agonistas totais com o domínio LBD do PPAR α formam um padrão de ligação típico, no qual a cabeça polar do ligante, representada por um grupo carboxílico, preenche o braço I formando uma rede de ligações de hidrogênio com os resíduos polares Ser280, Tyr314, His440 e Tyr464, e a cauda hidrofóbica destes agonistas totais ocupa o braço III, sendo estabilizada por interações hidrofóbicas.

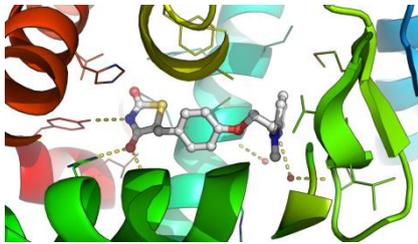
Funcionalmente, o que se nota é uma atividade de agonismo total associada a um modo de ligação, no qual a ocupação dos braços I e III do LBP é requerida. Pois, todas as estruturas determinadas do PPAR α são de agonistas totais que preenchem exatamente estas regiões no receptor. Algumas características são comuns a estes agonistas. Primeiro, são ligantes com alta potência e alta afinidade para o isotipo α e, segundo, em suas estruturas cristalográficas a interação direta com a H12 é dominante¹¹⁹⁻¹²².

Supreendentemente, o complexo formado entre o GL479 e o PPAR γ apresenta um modo único entre as estruturas resolvidas para esse receptor. Como regra geral, agonistas parciais dos PPARs na conformação ativa ligam-se no LBP sem interagir diretamente com a Tyr da H12^{110;114}. Porém, na estrutura do PPAR γ :GL479 vê-se claramente a interação do agonista parcial GL479 com a Tyr473 da H12. Outro aspecto importante deste complexo é que o GL479 adota uma conformação diferenciada dos demais agonistas, anteriormente descrito para os PPARs. Nessa conformação o GL479 ocupa o braço I e o braço II do LBP (Figura 28).

Duas características determinam o modo de ligação e a ativação do ligante para ambos os PPARs. Inicialmente, a cabeça polar no qual está presente o grupo carboxílico faz uma série de ligações de hidrogênio em cada receptor, sendo as principais ligações que mantêm a manutenção da interação proteína:ligante. Essas interações também são responsáveis pela mudança conformacional da H12. No entanto, o padrão de ativação do receptor é caracterizado pela ocupação da cauda do ligante, demonstrando que a estabilização de determinadas regiões pode garantir a ativação desejada do receptor.

Os ligantes do PPAR γ que possuem uma ativação baixa podem ser promissores no desenvolvimento de novos fármacos para essa classe de receptores. Pois, recentemente a

rosiglitazona, um fármaco que atua via ativação do PPAR γ no combate a resistência à insulina foi retirada do mercado devido seus acerbados efeitos colaterais, tais como, ganho de peso, retenção de líquidos e insuficiência cardíaca¹²³. Por outro lado, o agonismo total do PPAR α tem sido bem tolerado pelos pacientes⁷³. Se estudos funcionais e clínicos confirmarem as características benéficas do GL479 como agonista dual PPAR α/γ , novos agonistas duais com características similares ao do GL479 poderão ser uma alternativa para o surgimento de um fármaco que atue no tratamento da dislipidemia e no diabetes do tipo 2, concomitantemente.



Capítulo 5

“Scientific research is one of the most exciting and rewarding of occupations.”

Frederick Sanger

Prêmio Nobel Química em 1958

5 Moduladores seletivos do PPAR γ

5.1 Resultados

5.1.1 Identificação dos ligantes

Os compostos selecionados foram classificados em três diferentes grupos. O grupo maior contém moléculas com o grupo ácido carboxílico carregado, frequentemente em um sistema com três anéis ligados, por meio de ligações rotacionais. Essa classe é formada pelos compostos nomeados de **1, 2, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 14 e 15**.

A segunda classe contém moléculas com grupos carboxilatos e um anel tetrazol. Este grupo incluem os compostos **3, 8 e 16**. Finalmente, o composto **13** é classificado separadamente devido suas propriedades únicas. Ele é o único composto polar que não é carregado. As conformações do *docking* para estes compostos revelaram favoráveis interações polares entre o carboxilato, presente na maioria dos ligantes, e o braço I do LBP⁸⁹. Dos compostos identificados, o **4** e o **11** apresentaram dificuldades na solubilização em DMSO e foram removidos dos ensaios posteriores.

5.1.2 ThermoFluor

Com o intuito de verificar a estabilização da proteína após a formação do complexo com os ligantes, ensaios de ThermoFluor foram realizados com as moléculas supracitadas. Infelizmente, a estabilização dos complexos resultou em apenas alterações mínimas no T_m do PPAR γ . O receptor na forma apo, com apenas DMSO, utilizado como veículo, tem um T_m de 48 °C, enquanto que em complexo com o TZD rosiglitazona o T_m resultou em 49 °C.

A maioria dos ligantes testados resultou em valores de T_m entre 46 °C e 47 °C, o que não permitiu uma definição clara se estes compostos estavam ligados ou não ao PPAR γ . No entanto, os ligantes **10 e 15** puderam ser identificados com clareza quanto a sua ligação ao receptor, pois conseguiram estabilizar o PPAR γ com valores de T_m de 49 °C e 53 °C. A ligação foi verificada devido esses valores serem maiores do que o da proteína apo. A Figura 32 mostra as curvas de todos os ligantes testados.

5.1.3 Ensaio competitivo

Os 13 compostos solúveis em DMSO também foram testados quantitativamente quanto a sua capacidade de ligar-se ao PPAR γ . Para alguns destes ligantes, a fluorescência intrínseca ou a absorbância no comprimento de onda de emissão do Fluormone causou uma ambiguidade nos resultados. Quando isso ocorreu, os ligantes foram considerados como não ligados. Para todos os compostos, os ensaios foram realizados em duplicatas com concentrações que variaram de 17 nM a 3 mM, de acordo com a solubilidade permitida em cada ligante.

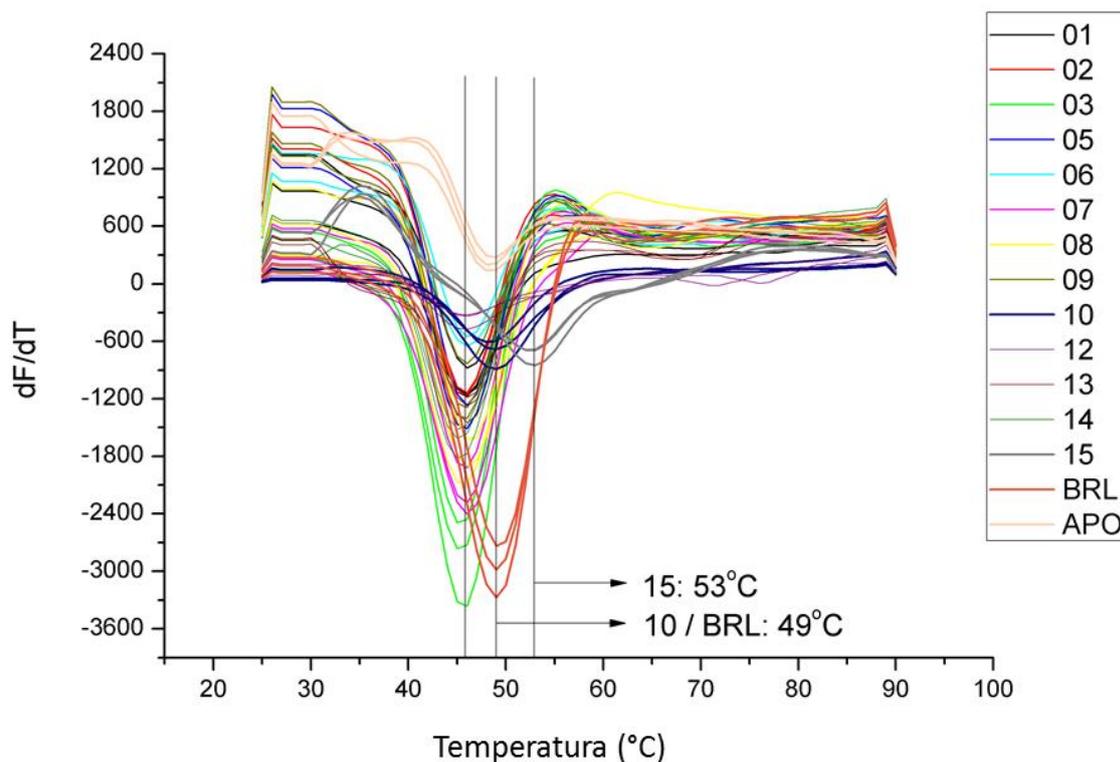


Figura 32- Gráfico do ThermoFluor para os compostos identificados como ligantes do PPAR γ . A primeira derivada dos dados de fluorescência de ThermoFluor (dF/dT) versus a temperatura para os treze compostos solúveis, rosiglitazona (controle positivo) e o receptor na forma apo. A linha vertical marca o ponto de inflexão dos compostos **10** (T_M=49°C), **15** (T_M=53°C) e rosiglitazona (T_M=49°C).

Fonte: Adaptada de Da Silva *et al.*⁸⁹

Os dados de polarização de fluorescência foram plotados em um modelo de competição com um único sítio e os valores de IC₅₀ foram ajustados a partir dos dados

experimentais. Três compostos foram identificados claramente como ligantes dos PPAR γ , com valores de IC₅₀ menor que 10 μ M. O composto **7** liga-se ao PPAR γ com IC₅₀ de 2,2 μ M, o composto **8** apresenta um IC₅₀ de 5,1 μ M e finalmente o composto **15** com IC₅₀ de 1,1 μ M. Como controle positivo foi utilizada a rosiglitazona, o seu IC₅₀ também foi determinado e apresentou um valor de 0,159 μ M. (Figura 33 e Tabela 3).

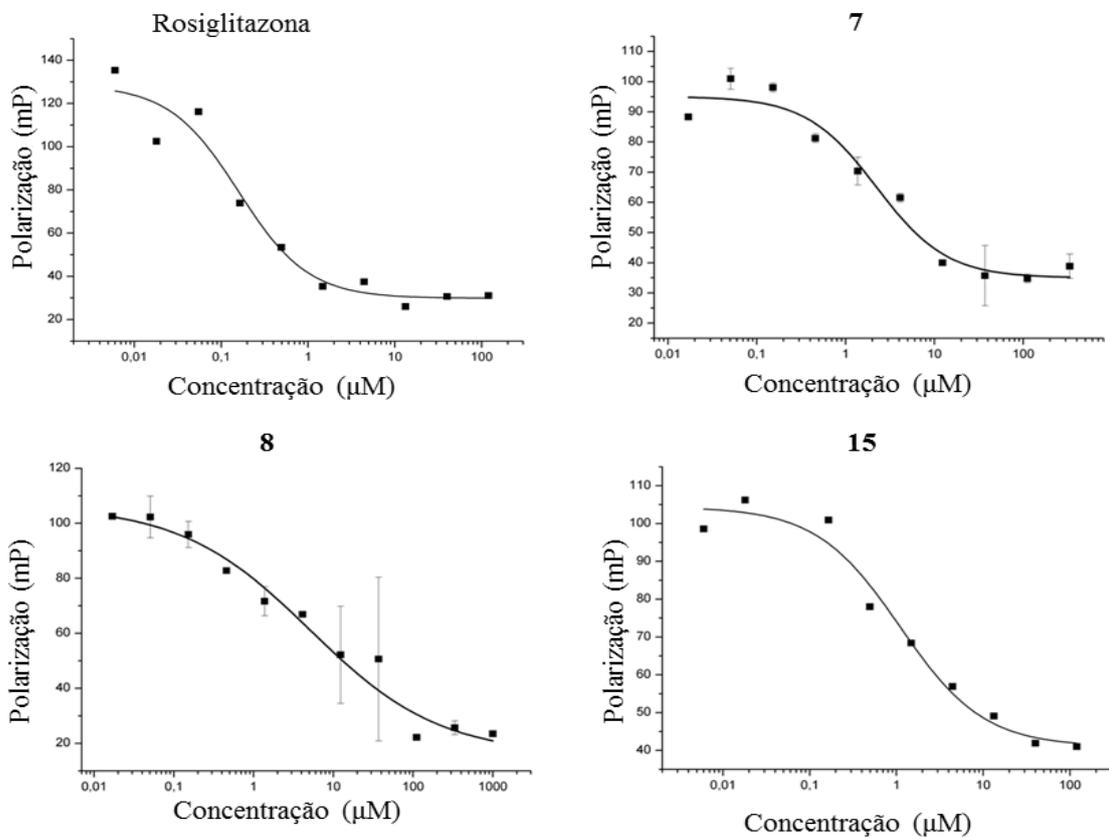


Figura 33- Gráficos dos ensaios de competição de fluorescência de polarização. Os dados são referentes à rosiglitazona (superior a esquerda), ligante **7** (superior a direita), ligante **8** (inferior a esquerda) e ligante **15** (inferior a direita).

Fonte: Adaptada de Da Silva *et al.*⁸⁹

Tabela 3- Valores experimentais do IC₅₀ para fluorescência de polarização extraídos dos gráficos da Figura 33.

Ligante	IC ₅₀ (μ M)	Ajuste R ²
Rosiglitazona	0,159 ± 0,065	0,938
7	2,223 ± 0,733	0,955
8	5,132 ± 3,440	0,947
15	1,144 ± 0,369	0,967

Fonte: Adaptada de Da Silva *et al.*⁸⁹

5.1.4 Cristalização e coleta de dados do complexo PPAR γ -LBD:16

Em paralelo a caracterização dos ligantes identificados por *docking*, também foram realizados ensaios de cristalização com os 13 compostos solúveis em DMSO. Um dos compostos mais promissores no *docking* foi o ligante **16**. Esse composto possui em uma de suas extremidades um grupo tetrazol (anel A) que durante o experimento *in silico* foi posicionado no braço I do LBP, único braço do LBP com características polares. O ligante **16** interage com a proteína e forma três ligações de hidrogênio com os resíduos S289 (H3), H323 (H4) e Y327 (H5) (Figura 34). Os anéis aromáticos, aqui representados como B e C, ocupam o braço II do LBP e interagem com o receptor por interações hidrofóbicas.

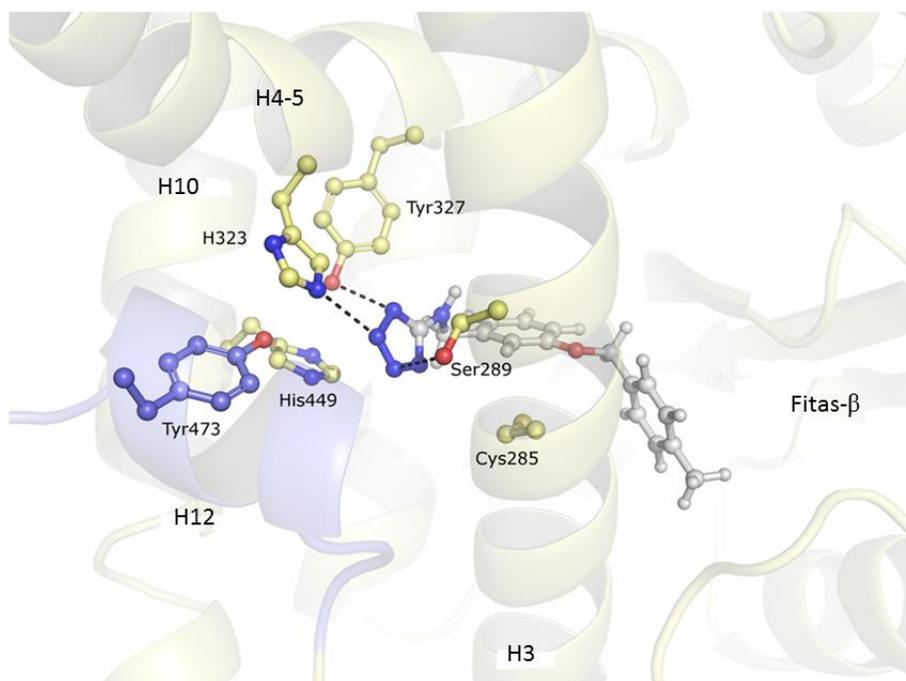


Figura 34- Interações previstas por *docking* molecular entre o ligante **16** e o receptor nuclear PPAR γ . As ligações de hidrogênios são mostradas em linhas pretas pontilhadas.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Este primeiro indício de ligação do composto **16** ao PPAR γ não era suficiente para afirmar que esse ligante realmente era capaz de ligar-se ao receptor. Portanto, uma abordagem estrutural foi conduzida para avaliar o potencial do composto **16** como um agonista do PPAR γ . Inicialmente, foi realizada uma caracterização por ensaios de ThermoFluor e fluorescência de polarização, porém os resultados foram inconclusivos (dados não demonstrados). Em paralelo a estes experimentos, ensaios de cristalização foram realizados com o composto **16**. Surpreendentemente, somente após 30 dias de montado o sistema, cristais do complexo PPAR γ -LBD:**16** cresceram em diversas concentrações de citrato de sódio tribásico e em diferentes valores de pH. O cristal selecionado para coleta cresceu na condição com 0,9 M de citrato de sódio tribásico, 100 mM de hepes pH 7,0 (Figura 35A).

Apesar de o cristal ter sido crioprotetido com uma solução contendo 15% (v/v) de etilenoglicol, o conjunto de dados apresentou as raiais características de anéis de gelo, indicando uma possível falha na manipulação do cristal até a montagem para a coleta (Figura 35B). Os demais dados da coleta e refinamento encontram-se na Tabela 4.

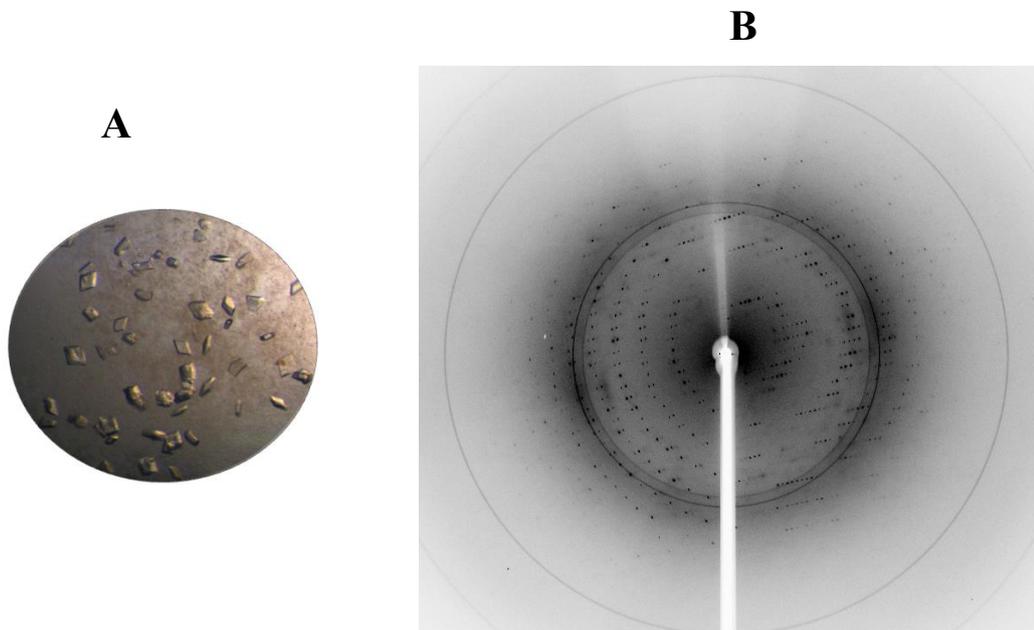


Figura 35- Cristais e padrão de difração da proteína PPAR γ -LBD complexado com o ligante **16**. (A) Cristais utilizados na difração por raios-X. Estes cristais cresceram utilizando a técnica de difusão de vapor com a gota pendurada e a condição de cristalização continha 0,9 M de citrato de sódio tribásico, 100 mM hepes pH 7,0. (B) Padrão de difração do complexo PPAR γ -LBD:**16**, a resolução máxima obtida foi de 2,2 Å.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 4- Estatísticas cristalográficas da coleta e refinamento do PPAR γ -LBD complexado com o ligante **16**.

Parâmetros	PPAR γ :16
Coleta de Dados	
Comprimento de onda/Linha	1,459/LNLS-MX2
Grupo especial	C2
Parâmetros da cela unitária	92,94, 62,26, 118,50, Å 90,00, 101,94, 90,00 °
Resolução (Å)	45,47-2,20 (2,27 – 2,20)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	16,68 (2,84)
Multiplicidade	4,2 (3,8)
Completeza	94,77 (84,84)
R_{merge}^{\S}	0,042 (0,391)
Número de moléculas na U. A.	2
Número de reflexões únicas	32124
Refinamento	
R_{factor}/R_{free}	22,56/26,55
B -factor médio	63,30
RMSD de ligação, Å	0,004
RMSD de ângulo, °	0,65
Ramachandran plot (%)	
Região favorável	98
Região permitida	2
Região não permitida	0
$Clashscore$	6,11

$\S R_{merge} = \frac{\sum hkl \sum i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle|}{\sum hkl \sum i I_i(hkl)}$, 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 à camada mais externa de resolução.

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.1.5 Determinação estrutural e refinamento

O complexo estrutural PPAR γ -LBD:**16** foi determinado no grupo espacial C2 e coletado a uma resolução máxima de 2.2 Å. Na unidade assimétrica duas moléculas foram observadas, denominadas de cadeia A e B (Figura 36). Em cada cadeia foi identificada uma densidade característica do ligante **16**, no qual o modo de ligação deste ligante é dependente do estado conformacional da H12 como ilustrado na Figura 37 e Figura 38.

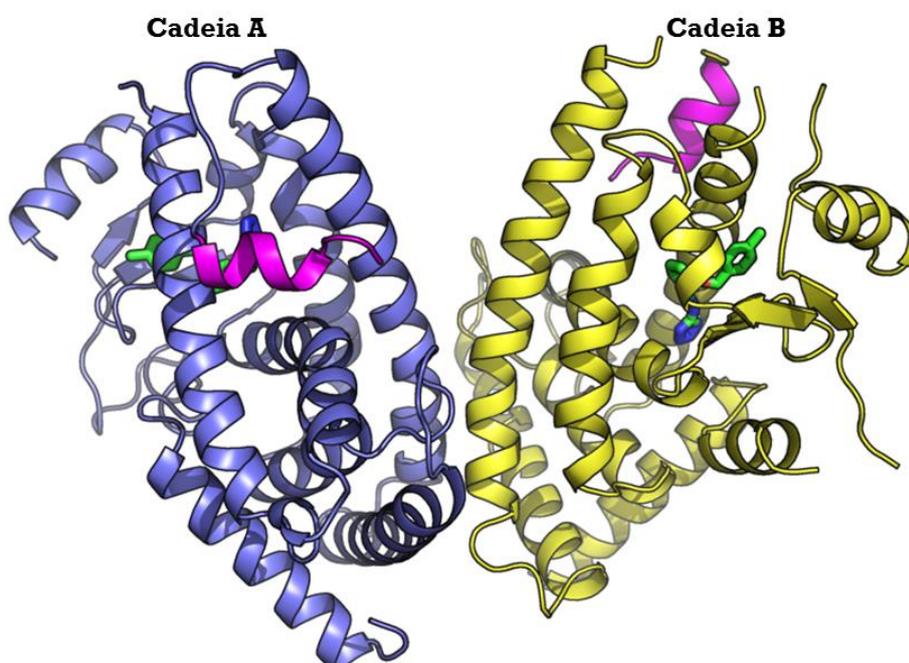


Figura 36- Estrutura do PPAR γ -LBD complexada ao ligante **16**. Representação do dímero na unidade assimétrica do PPAR γ -LBD com o ligante **16**. As hélices- α da cadeia A (conformação ativa) estão representadas em azul e as da cadeia B (conformação inativa) em amarelo, as H12 são mostradas em lilás. O ligante **16** em ambas as cadeias estão representados em verde e *sticks*.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Como era de se esperar para esta condição de cristalização e grupo espacial, a H12 da cadeia A está na conformação ativa e, portanto, encontra-se fechada sob o corpo do receptor. O ligante **16** ocupa o LBP sem interagir diretamente com a Tyr473 da H12, esse contato é mediado por uma ligação de hidrogênio entre a molécula de água e o grupo tetrazol do ligante **16**. Todas as demais ligações de hidrogênio que estabilizam o ligante, também são mediadas por esta molécula de água. As interações realizadas pela molécula de água envolvem os resíduos H323 (H4), H449 (H11) e Y473 (H12) (Figura 37).

A distância entre a molécula de água e o átomo N4, presente no anel tetrazol do ligante, é de 3,5 Å. As demais ligações de hidrogênio interagem com a molécula de água com uma distância de 2,8 Å para o grupo OH da Y473, 3,4 Å para o N ϵ da H449 e finalmente 3,6 Å para o N ϵ da H323. Essas interações comprovam a divergência entre o modelo identificado por *docking* e o cristalográfico. Em ambos os modelos, o grupo tetrazol ocupa o braço I do bolsão de ligação. Porém, na posição do *docking* o ligante **16** interage diretamente com os resíduos pertencentes à proteína, enquanto que na estrutura

crystallográfica há uma molécula de água que ajuda a manter as ligações de hidrogênio entre os resíduos e o anel tetrazol do ligante. Essa diferença proporciona ao ligante **16** da estrutura cristalográfica um deslocamento nos anéis aromáticos B e C, permitindo que estes anéis façam interações hidrofóbicas com as fitas- β do receptor. Interações essas que geralmente estão presentes nos agonistas parciais do PPAR γ .

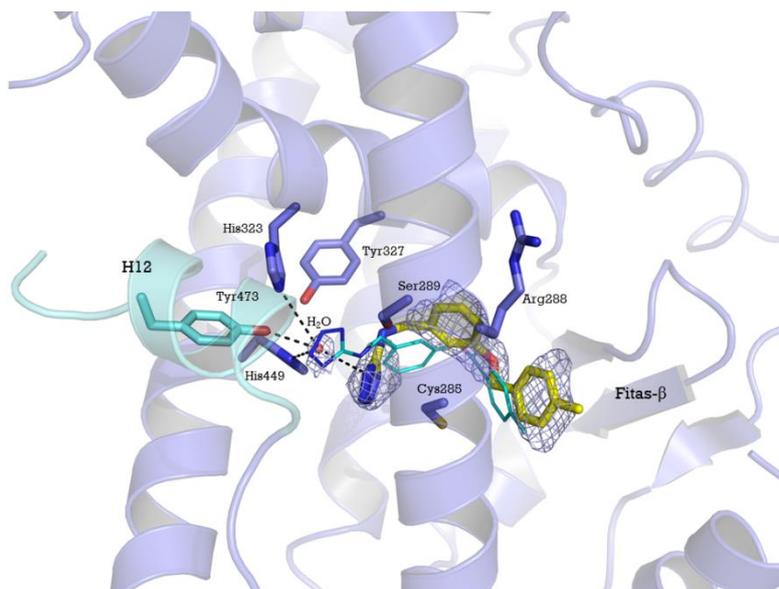


Figura 37- Detalhes estruturais do complexo PPAR γ -LBD:**16** na conformação ativa. A estrutura do ligante em linhas representa a conformação do *docking*, enquanto as em *sticks* representa a conformação cristalográfica com a densidade experimental em torno do ligante. O *omit map* também é mostrado em *2Fo-Fc* com $1,0\sigma$ em torno do ligante. A H12 está colorida em ciano.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Na cadeia B, a H12 encontra-se na conformação inativa (aberta) e o anel tetrazol do ligante **16** está rotacionado para a direção da H3. Essa ocupação do ligante permite que ele mantenha duas ligações de hidrogênios com o NH1 e NH2 da R288. Os anéis aromáticos B e C mantêm conformações similares as do modelo do *docking* entre a H3 e as fitas- β do PPAR γ -LBD. Essa mudança conformacional, de fechada para aberta, ocorre provavelmente devido aos contatos cristalinos que H12 realiza com a molécula vizinha na região do sítio de ligação do coativador, como descrito no capítulo 4. Essa ligação faz com que a H12 perca importantes interações, alterando visivelmente o modo de ligação do ligante **16**. Nesta situação, o ligante faz uma forte interação polar com a R288 (Figura 38).

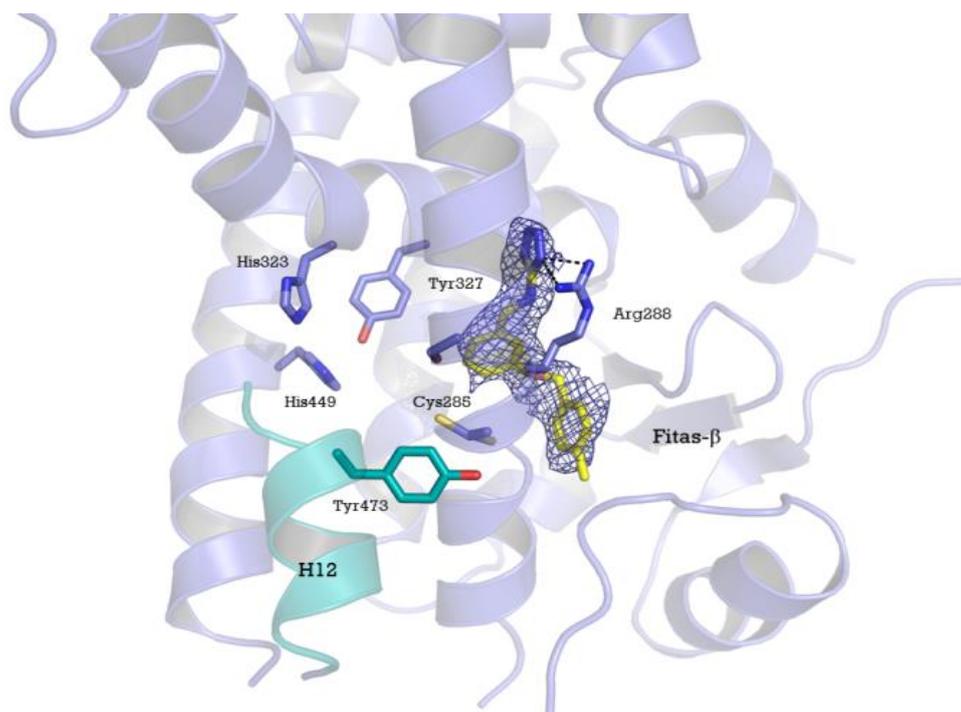


Figura 38- Detalhes estruturais do complexo PPAR γ -LBD:**16** na conformação inativa. Cadeia B do complexo PPAR γ :**16**. Apenas a Arg288 realiza ligações de hidrogênio com o ligante **16**. O *omit map* também é mostrado em *2Fo-Fc* com $1,0\sigma$ em torno do ligante. A H12 está colorida em ciano.

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.2 Discussão

A recente retirada do mercado da rosiglitazona tem levantado a discussão da segurança dessa classe de fármacos e, se os demais fármacos que atuam via ativação do PPAR γ ainda podem ser considerados confiáveis para o uso clínico.

Descobertas recentes sugerem que o desenvolvimento de novos moduladores do PPAR γ inclua duas diferentes estratégias. A primeira está relacionada com a ativação deste receptor por agonistas parciais independentes da H12 e que possam bloquear a fosforilação da Ser273 pela Cdk5. A fosforilação dessa serina está relacionada com alterações na expressão de uma magnitude genes que estão envolvidos com a obesidade e a resistência a insulina⁶⁹⁻⁷⁰. Assim, o desenvolvimento de moduladores capazes de ligar-se ao PPAR γ sem ativação total ao receptor, somado a inibição da fosforilação da Ser273 pode ser uma estratégia interessante no desenvolvimento de fármacos sensibilizadores insulínicos, sem causar ganho de peso. A outra estratégia envolve a ativação submáxima do receptor. Alguns agonistas parciais, tais

como PAT5A¹²⁴, 3-benzisoxazoil¹²⁵ e balaglitazona¹²⁶, exibem efeitos hipoglicemiantes com atividade adipogênica reduzida.

A descoberta de ligantes com pelo menos uma das características citadas acima tem levado uma busca racional por novos agonistas do PPAR γ . O estudo utilizando o *docking* tem sido de grande valia para identificar inicialmente estes possíveis agonistas parciais¹²⁷. Nesta tese, 16 possíveis ligantes do PPAR γ foram identificados por *docking*. Para confirmar a habilidade destes ligantes em interagir com o PPAR γ , os mesmos foram caracterizados por técnicas biofísicas, tais como o ThermoFluor que identificou os ligantes **10** e **15**. Adicionalmente, o ensaio competitivo por fluorescência de polarização identificou os ligantes **7**, **8** e **15**. O IC₅₀ para os compostos **7**, **8** e **15** (Tabela 3) são valores correspondentes a ligantes de afinidade moderada¹²⁸. Finalmente, o ligante **16** foi cristalizado e teve sua estrutura resolvida por difração de raios-X.

O LBP do PPAR γ é um dos maiores da superfamília dos receptores nucleares e acomoda ligantes de diferentes tamanhos e com diferentes grupos funcionais^{72;103;115}. Os ligantes **8** e **16** possuem em suas estruturas o grupo tetrazol. Esse grupo é formado por um anel de quatro átomos de nitrogênio e um átomo de carbono. Recentemente, Casimiro-Garcia e colaboradores¹²⁹ identificou esse grupo como ligante do PPAR γ . O anel tetrazol é um bioisóstero do grupo carboxilato, um grupo funcional comumente presente nos agonistas do PPAR γ . Nas estruturas dos PPARs, o carboxilato interage com a H12 formando uma rede de ligações de hidrogênio que ajudam na estabilização do ligante^{110;120}. Os demais ligantes aqui identificados e caracterizados representam grupos funcionais que normalmente são descritos como ligantes do PPAR γ ^{72;118}.

Alguns agonistas parciais são capazes de ativar o receptor sem estabilizar a H12¹¹⁴. O agonista parcial MRL-24 é um exemplo desses agonistas. Este ligante liga-se ao PPAR γ entre a H3 e as fitas- β , provocando uma maior estabilização nestas regiões. Para verificar essa estabilização foram utilizados experimentos de troca de hidrogênio-deutério analisadas por espectrometria de massas. Um modo de ligação com uma ocupação similar é observado para amorfrutinas¹³⁰⁻¹³¹ e para ligantes do tipo carboxamidas¹³².

Diante da gama de informações estruturais disponíveis sobre o modo de ligação do PPAR γ , podemos agrupar os ligantes em dois grupos distintos. No primeiro grupo, o padrão de ligação envolve interações polares entre o resíduo Tyr473 da H12 com grupos polares presentes na estrutura química do ligante. Outras interações polares neste grupo são as que envolvem os resíduos S289 (H3), H323 (H4), Y327 (H5) e H449 (H11) presentes no braço I do LBP. Na maioria dos casos, os ligantes que obedecem este padrão possuem alta afinidade

pelo receptor e promovem uma ativação completa do mesmo. O segundo grupo de ligantes não interage diretamente com a H12 ou interage de forma indireta, apresentando afinidade moderada e não promovendo a ativação completa do receptor. Estes ligantes atuam principalmente estabilizando as fitas- β por meio de interações hidrofóbicas¹¹⁴.

O modo de ligação descrito aqui para o ligante **16** permite classificá-lo no segundo grupo, pois o mesmo não interage diretamente com a H12 e estabiliza as fitas- β por meio de diversas interações hidrofóbicas. Esse padrão de ligação também é visto para os agonistas parciais INT131¹³³, amorfrutina 2 e amorfrutina B¹³⁰. Da mesma forma que acontece com o ligante **16**, o INT131 necessita de uma molécula de água para mediar o contato com a Tyr473 da H12. Esse ligante tem a capacidade ativar o PPAR γ mesmo quando a Tyr473 é mutada por uma Alanina. O agonismo parcial do INT131 resulta em uma redução nos níveis de glicose sem causar edema e outros efeitos colaterais característicos dos agonistas totais TZDs¹³⁴.

Diferente do ligante **16** e do INT131, as amorfrutinas 2 e B utilizam as moléculas de água para interagir com as fitas- β e com a Arg288 da H3. As amorfrutinas são agonistas parciais independentes da H12 que tem um alto potencial no tratamento da diabetes do tipo 2. Estudos de expressão gênica mostraram que estas amorfrutinas atuam na regulação de uma diversidade de genes envolvidos com a obesidade e a síndrome metabólica¹³¹.

Apesar de não terem sido realizados estudos *in vivo* com o ligante **16**, efeitos hipoglicemiantes foram descritos para compostos similares a esse composto. Quando esses compostos foram utilizados em dose única por dois dias consecutivos em ratos *ob/ob*, os efeitos foram similares ao TZD ciglitazona. Porém esses efeitos só foram observados quando utilizadas altas doses dos compostos similares ao ligante **16**¹³⁵. Estas evidências sugerem que o ligante **16** pode ter um efeito hipoglicemiante *in vivo*, via ativação do PPAR γ .



Capítulo 7

"Injustice anywhere is a threat to justice everywhere."

Martin Luther King, Jr

Prêmio Nobel da Paz em 1964

6 CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

A fisiologia dos PPARs apresenta um papel importante na regulação do metabolismo da glicose e lipídios, além de agir como alvo para fármacos no tratamento da dislipidemia e diabetes do tipo 2. Os fármacos comercializados para atuar modulando o PPAR α e PPAR γ são agonistas totais bastante efetivos, porém com efeitos colaterais bem acentuados. Esses efeitos, muitas vezes podem levar à morte ou morbidade dos pacientes. A existência de um fármaco que atue regulando os níveis de lipídios e glicose via ativação do PPAR α e PPAR γ , tem atraído um grande interesse da indústria farmacêutica.

Nesse panorama, esse trabalho apresentou estudos sobre o GL479, um agonista dual com características estruturais únicas em relação aos demais que tiveram suas estruturas determinadas. O primeiro fato que nos chamou a atenção sobre esse ligante, foi a diferença no modo de ligação do GL479 na estrutura do PPAR α -LBD e na estrutura do PPAR γ -LBD. Nenhum dos outros agonistas duais PPAR α/γ , que tiveram suas estruturas resolvidas, apresentaram essa diferença no modo de ligação.

Somado a isso, os detalhes estruturais encontrados principalmente na estrutura do complexo PPAR γ -LBD:GL479 surge como uma alternativa na busca de agonistas duais ou, até mesmo, de moduladores seletivos do PPAR γ . A conformação em forma de S adotada pelo GL479 na estrutura do PPAR γ difere da conformação em U dos agonistas totais. Provavelmente, a conformação do ligante em forma de S resulta em um menor recrutamento de proteínas coativadoras que os ligantes que adotam a conformação em U. Conseqüentemente, esse menor recrutamento poderia eliminar vários efeitos associados ao recrutamento total dos coativadores pelos agonistas totais, que adotam uma conformação em U em suas estruturas cristalográficas. Contudo, estudos funcionais devem ser conduzidos para confirmar a importância destes achados.

Neste trabalho, também foram identificados por *docking* 16 compostos, dos quais 4 foram caracterizados por técnicas biofísicas. Com os potentes efeitos adversos atribuídos aos TZDs, novos grupos funcionais que levem a uma melhor tolerância pode ser uma alternativa no tratamento da diabetes do tipo 2. Destes 16 compostos identificados por *docking*, alguns compostos apresentaram o grupo tetrazol, um grupo funcional pouco comum encontrado nos ligantes de PPAR γ .

Um desses ligantes, com esse grupo funcional, foi co-cristalizado e teve sua estrutura resolvida. As ligações de hidrogênios que estabilizaram esse composto dentro do LBP foram mediadas por uma molécula de água. Essa molécula de água impede um contato direto do ligante com a H12. Este modo de ligação tem sido visto para agonistas parciais, pois no geral agonistas parciais não interage diretamente com a H12.

O conjunto de informações estruturais, aqui apresentados para os PPARs, foi de grande valia para entender um pouco mais sobre o modo de ligação desses receptores nucleares. Apesar de haver muitas estruturas depositadas para estes receptores, alguns complexos apresentados nesta tese possuem características únicas que poderão ser útil no desenvolvimento de moduladores seletivos com efeitos terapêuticos similares aos que já estão disponíveis clinicamente, porém com efeitos colaterais reduzidos.

REFERÊNCIAS

- 1 ECKEL, R. H.; GRUNDY, S. M.; ZIMMET, P. Z. The metabolic syndrome. **Lancet**, v. 365, n. 9468, p. 1415-1428, 2005.
- 2 LEE, C. H.; OLSON, P.; EVANS, R. M. Minireview: lipid metabolism, metabolic diseases, and peroxisome proliferator-activated receptors. **Endocrinology**, v. 144, n. 6, p. 2201-2207, 2003.
- 3 BARISH, G. D.; NARKAR, V. A.; EVANS, R. M. PPAR delta: a dagger in the heart of the metabolic syndrome. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 3, p. 590-597, 2006.
- 4 CORNIER, M. A. et al. The metabolic syndrome. **Endocrine Reviews**, v. 29, n. 7, p. 777-822, 2008.
- 5 WILD, S. et al. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care**, v. 27, n. 5, p. 1047-1053, 2004.
- 6 ZIMMET, P.; ALBERTI, K. G.; SHAW, J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 782-787, 2001.
- 7 RANG, H. P. et al. **Farmacologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. 904p.
- 8 MISRA, A.; KHURANA, L. Obesity and the metabolic syndrome in developing countries. **Journal of Clinical Endocrinology Metabolism**, v. 93, n. 11, p. S9-S30, 2008. Supplement 1.
- 9 HASLAM, D. W.; JAMES, W. P. Obesity. **Lancet**, v. 366, n. 9492, p. 1197-1209, 2005.
- 10 KAHN, S. E.; HULL, R. L.; UTZSCHNEIDER, K. M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 840-846, 2006.

11 YESSOUFOU, A.; WAHLI, W. Multifaceted roles of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) at the cellular and whole organism levels. **Swiss Medical Weekly**, v. 140, p. w13071, 2010. doi: 10.4414/smw.2010.13071.

12 NAGY, L.; SCHWABE, J. W. Mechanism of the nuclear receptor molecular switch. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 29, n. 6, p. 317-324, 2004.

13 MANGELSDORF, D. J. et al. The nuclear receptor superfamily: the second decade. **Cell**, v. 83, n. 6, p. 835-839, 1995.

14 BOGAN, A. A.; COHEN, F. E.; SCANLAN, T. S. Natural ligands of nuclear receptors have conserved volumes. **Nature Structural Biology**, v. 5, n. 8, p. 679-681, 1998.

15 CHEN, T. Nuclear receptor drug discovery. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 12, n. 4, p. 418-426, 2008.

16 NETTLES, K. W.; GREENE, G. L. Ligand control of coregulator recruitment to nuclear receptors. **Annual Review of Physiology**, v. 67, p. 309-333, 2005.

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

18 HUANG, P.; CHANDRA, V.; RASTINEJAD, F. Structural overview of the nuclear receptor superfamily: insights into physiology and therapeutics. **Annual Review of Physiology**, v. 72, p. 247-272, 2010.

19 HELSEN, C.; CLAESSENS, F. Looking at nuclear receptors from a new angle. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 382, n. 1, p. 97-106, 2014.

20 CHANDRA, V. et al. Structure of the intact PPAR-gamma-RXR-alpha nuclear receptor complex on DNA. **Nature**, v.456, n. 7220, p. 350-356, 2008.

21 CHANDRA, V. et al. Multidomain integration in the structure of the HNF-4 α nuclear receptor complex. **Nature**, v. 495, n. 7441, p. 394-398, 2013.

22 RENAUD, J. P.; MORAS, D. Structural studies on nuclear receptors. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 57, n. 12, p. 1748-1769, 2000.

23 AAGAARD, M. M.; SIERSBÆK, R.; MANDRUP, S. Molecular basis for gene-specific transactivation by nuclear receptors. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1812, n. 8, p. 824-835, 2011.

24 WEATHERMAN, R. V.; FLETTERICK, R. J.; SCANLAN, T. S. Nuclear-receptor ligands and ligand-binding domains. **Annual Review of Biochemistry**, v. 68, p. 559-581, 1999. doi: 10.1146/annurev.biochem.68.1.559.

25 YEN, P. M. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. **Physiological Reviews**, v. 81, n. 3, p. 1097-1142, 2001.

26 ANBALAGAN, M. et al. Post-translational modifications of nuclear receptors and human disease. **Nuclear Receptor Signaling**, v. 10, p. e001, 2012. doi: 10.1621/nrs.10001.

27 CLINCKEMALIE, L. et al. The hinge region in androgen receptor control. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 358, n. 1, p. 1-8, 2012.

28 RIBEIRO, R. C. et al. X-ray crystallographic and functional studies of thyroid hormone receptor. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 65, n. 1-6, p. 133-1341, 1998.

29 GLASS, C. K.; ROSE, D. W.; ROSENFELD, M. G. Nuclear receptor coactivators. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 9, n. 2, p. 222-232, 1997.

30 JEYAKUMAR, M.; TANEN, M. R.; BAGCHI, M. K. Analysis of the functional role of steroid receptor coactivator-1 in ligand-induced transactivation by thyroid hormone receptor. **Molecular Endocrinology**, v. 11, n. 6, p. 755-67, 1997.

31 FENG, W. et al. Hormone-dependent coactivator binding to a hydrophobic cleft on nuclear receptors. **Science**, v. 280, n. 5370, p. 1747-9, 1998.

32 RIBEIRO, R. C.; KUSHNER, P. J.; BAXTER, J. D. The nuclear hormone receptor gene superfamily. **Annual Review of Medicine**, v. 46, p. 443-453, 1995.

33 MCKENNA, N. J.; LANZ, R. B.; O'MALLEY, B. W. Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. **Endocrine Reviews**, v. 20, n. 3, p. 321-344, 1999.

34 MCKENNA, N. J.; O'MALLEY, B. W. Minireview: nuclear receptor coactivators--an update. **Endocrinology**, v. 143, n. 7, p. 2461-2465, 2002.

35 BOURGUET, W. et al. Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR-alpha. **Nature**, v. 375, n. 6530, p. 377-382, 1995.

36 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. 681-689, 1995.

37 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. 381-388, 2000.

38 SONODA, J.; PEI, L.; EVANS, R. M. Nuclear receptors: decoding metabolic disease. **FEBS Letters**, v. 582, n. 1, p. 2-9, 2008.

39 GIGUÈRE, V. Orphan nuclear receptors: from gene to function. **Endocrine Reviews**, v. 20, n. 5, p. 689-725, 1999.

40 KREY, G. et al. Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay. **Molecular Endocrinology**, v. 11, n. 6, p. 779-791, 1997.

41 GLASS, C. K.; OGAWA, S. Combinatorial roles of nuclear receptors in inflammation and immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 1, p. 44-55, 2006.

42 PETERS, J. M.; SHAH, Y. M.; GONZALEZ, F. J. The role of peroxisome proliferator-activated receptors in carcinogenesis and chemoprevention. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 3, p. 181-195, 2012.

43 VAN RAALTE, D. H. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-alpha: a pharmacological target with a promising future. **Pharmaceutical Research**, v. 21, n. 9, p. 1531-1538, 2004.

44 BERGER, J.; MOLLER, D. E. The mechanisms of action of PPARs. **Annual Review of Medicine**, v. 53, p. 409-435, 2002. doi: 10.1146/annurev.med.53.082901.104018.

45 KOTA, B. P.; HUANG, T. H.; ROUFOGALIS, B. D. An overview on biological mechanisms of PPARs. **Pharmacological Research**, v. 51, n. 2, p. 85-94, 2005.

46 HARMON, G. S.; LAM, M. T.; GLASS, C. K. PPARs and lipid ligands in inflammation and metabolism. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 10, p. 6321-6340, 2011.

47 ZOETE, V.; GROSDIDIER, A.; MICHIELIN, O. Peroxisome proliferator-activated receptor structures: ligand specificity, molecular switch and interactions with regulators. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1771, n. 8, p. 915-925, 2007.

48 WILLSON, T. M. et al. The PPARs: from orphan receptors to drug discovery. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 4, p. 527-550, 2000.

49 FRANCIS, G. A. et al. Nuclear receptors and the control of metabolism. **Annual Review of Physiology**, v. 65, p. 261-311, 2003. doi: 10.1146/annurev.physiol.65.092101.142528

50 ISSEMANN, I.; GREEN, S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. **Nature**, v. 347, n. 6294, p. 645-650, 1990.

51 WANG, Y. X. PPARs: diverse regulators in energy metabolism and metabolic diseases. **Cell Research**, v. 20, n. 2, p. 124-137, 2010.

52 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**, v. 94, n. 9, p. 4312-4317, 1997.

53 BENSINGER, S. J.; TONTONOZ, P. Integration of metabolism and inflammation by lipid-activated nuclear receptors. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 470-477, 2008.

54 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.

55 SCHUPP, M.; LAZAR, M. A. Endogenous ligands for nuclear receptors: digging deeper. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 52, p. 40409-40415, 2010.

56 XU, X. et al. RU486 antagonizes the inhibitory effect of peroxisome proliferator-activated receptor alpha on interleukin-6 production in vascular endothelial cells. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 81, n. 2, p. 141-146, 2002.

57 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. 879-887, 1992.

58 EVANS, R. M.; BARISH, G. D.; WANG, Y. X. PPARs and the complex journey to obesity. **Nature Medicine**, v. 10, n. 4, p. 355-361, 2004.

59 LEE, C. H. et al. PPARdelta regulates glucose metabolism and insulin sensitivity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 9, p. 3444-3449, 2006.

60 GREENE, M. E. et al. Isolation of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma cDNA: expression in hematopoietic cells and chromosomal mapping. **Gene Expression**, v. 4, n. 4-5, p. 281-299, 1995.

61 AUWERX, J. PPARgamma, the ultimate thrifty gene. **Diabetologia**, v. 42, n. 9, p. 1033-1049, 1999.

62 LEHMANN, J. M. et al. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 22, p. 12953-12956, 1995.

63 FORMAN, B. M. et al. 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. **Cell**, v. 83, n. 5, p. 803-812, 1995.

64 JIANG, C.; TING, A. T.; SEED, B. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. **Nature**, v. 391, n. 6662, p. 82-86, 1998.

65 RICOTE, M. et al. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. **Nature**, v. 391, n. 6662, p. 79-82, 1998.

66 OLEFSKY, J. M.; SALTIEL, A. R. PPAR gamma and the treatment of insulin resistance. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 11, n. 9, p. 362-8, 2000.

67 TONTONOZ, P.; SPIEGELMAN, B. M. Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma. **Annual Review of Biochemistry**, v. 77, p. 289-312, 2008. doi: 10.1146/annurev.biochem.77.061307.091829.

68 TONTONOZ, P.; HU, E.; SPIEGELMAN, B. M. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. **Cell**, v. 79, n. 7, p. 1147-1156, 1994.

69 CHOI, J. H. et al. Anti-diabetic drugs inhibit obesity-linked phosphorylation of PPARgamma by Cdk5. **Nature**, v. 466, n. 7305, p. 451-456, 2010.

70 CHOI, J. H. et al. Antidiabetic actions of a non-agonist PPAR γ ligand blocking Cdk5-mediated phosphorylation. **Nature**, v. 477, n. 7365, p. 477-481, 2011.

71 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. 3406-3410, 1997.

72 WAKU, T. et al. The nuclear receptor PPAR γ individually responds to serotonin- and fatty acid-metabolites. **EMBO Journal**, v. 29, n. 19, p. 3395-3407, 2010.

73 LALLOYER, F.; STAELS, B. Fibrates, glitazones, and peroxisome proliferator-activated receptors. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 30, n. 5, p. 894-899, 2010.

74 GUERRE-MILLO, M. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activators improve insulin sensitivity and reduce adiposity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 22, p. 16638-16642, 2000.

75 BARTER, P. J.; RYE, K. A. Is there a role for fibrates in the management of dyslipidemia in the metabolic syndrome? **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 28, n. 1, p. 39-46, 2008.

76 HENKE, B. R. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha/gamma dual agonists for the treatment of type 2 diabetes. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 17, p. 4118-4127, 2004.

77 NATHAN, D. M. et al. Medical management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: a consensus statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. **Diabetes Care**, v. 32, n. 1, p. 193-203, 2009.

78 CARIOU, B.; CHARBONNEL, B.; STAELS, B. Thiazolidinediones and PPAR γ agonists: time for a reassessment. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 23, n. 5, p. 205-215, 2012.

79 KAHN, S. E. et al. Glycemic durability of rosiglitazone, metformin, or glyburide monotherapy. **New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 23, p. 2427-2443, 2006.

80 BALAKUMAR, P. et al. PPAR dual agonists: are they opening Pandora's Box? **Pharmacological Research**, v. 56, n. 2, p. 91-98, 2007.

81 HENKE, B. R. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha/gamma dual agonists for the treatment of type 2 diabetes. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 17, p. 4118-4127, 2004.

82 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. 2468-2473, 2009.

83 CAVENDER, M. A.; LINCOFF, A. M. Therapeutic potential of aleglitazar, a new dual PPAR- α/γ agonist: implications for cardiovascular disease in patients with diabetes mellitus. **American Journal of Cardiovascular Drugs**, v. 10, n. 4, p. 209-216, 2010.

84 FIÉVET, C.; FRUCHART, J. C.; STAELS, B. PPARalpha and PPARgamma dual agonists for the treatment of type 2 diabetes and the metabolic syndrome. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 6, n. 6, p. 606-14, 2006.

85 NAINGGOLAN, L. All trials of diabetes drug aleglitazar are abandoned. 2013. Disponível em: <<http://www.medscape.com/viewarticle/807585>>. Acesso em: 10 jan. 2014.

86 FRUCHART, J. C. Selective peroxisome proliferator-activated receptor α modulators (SPPAR α): the next generation of peroxisome proliferator-activated receptor α -agonists. **Cardiovascular Diabetology**, v. 12, p. 82, 2013. doi:10.1186/1475-2840-12-82.

87 GIAMPIETRO, L. et al. Synthesis and structure-activity relationships of fibrate-based analogues inside PPARs. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, n. 24, p. 7662-7666, 2012.

88 IRWIN, J. J. et al. ZINC: a free tool to discover chemistry for biology. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 52 n. 7, p. 1757-1768, 2012.

89 DA SILVA, F. M. et al. Structure-based identification of novel PPAR gamma ligands. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 21, p. 5795-802, 2013.

90 POKLAR, N. et al. pH and temperature-induced molten globule-like denatured states of equinatoxin II: a study by UV-melting, DSC, far- and near-UV CD spectroscopy, and ANS fluorescence. **Biochemistry**, v. 36, n. 47, p. 14345-14352, 1997.

91 VEDADI, M. et al. Chemical screening methods to identify ligands that promote protein stability, protein crystallization, and structure determination. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 43, p. 15835-15840, 2006.

92 PANTOLIANO, M. W. et al. High-density miniaturized thermal shift assays as a general strategy for drug discovery. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 6, n. 6, p. 429-440, 2001.

93 ERICSSON, U. B. et al. Thermofluor-based high-throughput stability optimization of proteins for structural studies. **Analytical Biochemistry**, v. 357, n. 2, p. 289-298, 2006.

94 PHILLIPS, K.; DE LA PEÑA, A. H. The combined use of the Thermofluor assay and ThermoQ analytical software for the determination of protein stability and buffer optimization as an aid in protein crystallization. **Current Protocols in Molecular Biology**, 2011. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471142727.mb1028s94/pdf>>. Acesso em: 25 fev. 2014.

95 NIESEN, F. H.; BERGLUND, H.; VEDADI, M. The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. **Nature Protocols**, v. 2, n. 9, p. 2212-2221, 2007.

96 MCPHERSON, A. **Introduction to macromolecular crystallography**. 2nd ed. Hoboken, Nova Jersey: Wiley-Blackwell, 2009. 267 p.

97 BATTYE, T. G. et al. iMOSFLM: a new graphical interface for diffraction-image processing with MOSFLM. **Acta Crystallographica D: biological crystallography**, v. 67, n. Pt 4, p. 271-281, 2011.

98 KABSCH, W. XDS. **Acta Crystallographica D: biological crystallography**, v. 66, n. Pt 2, p. 125-132, 2010.

99 EVANS, P. R. An introduction to data reduction: space-group determination, scaling and intensity statistics. **Acta Crystallographica D: biological crystallography**, v. 67, n. Pt 4, p. 282-292, 2011.

100 COLLABORATIVE COMPUTATIONAL PROJECT, N. M. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. **Acta Crystallographica D: biological crystallography**, v. 50, n. Pt 5, p. 760-763, 1994.

101 MCCOY, A. J. et al. Phaser crystallographic software. **Journal of Applied Crystallography**, v. 40, n. Pt 4, p. 658-674, 2007.

102 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. 685-695, 2007.

103 PUHL, A. C. et al. Mode of peroxisome proliferator-activated receptor γ activation by luteolin. **Molecular Pharmacology**, v. 81, n. 6, p. 788-799, 2012.

104 EMSLEY, P.; COWTAN, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. **Acta Crystallographica D: biological crystallography**, v. 60, n. Pt 12 Pt 1, p. 2126-2132, 2004.

105 ADAMS, P. D. et al. PHENIX: building new software for automated crystallographic structure determination. **Acta Crystallographica D: biological crystallography**, v. 58, n. Pt 11, p. 1948-1954, 2002.

106 BRÜNGER, A. T. Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. **Nature**, v. 355, n. 6359, p. 472-475, 1992.

107 CHEN, V. B. et al. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. **Acta Crystallographica D: biological crystallography**, v. 66, n. Pt 1, p. 12-21, 2010.

108 WALLACE, A. C.; LASKOWSKI, R. A.; THORNTON, J. M. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. **Protein Engineering**, v. 8, n. 2, p. 127-134, 1995.

109 KANTARDJIEFF, K. A.; RUPP, B. Matthews coefficient probabilities: Improved estimates for unit cell contents of proteins, DNA, and protein-nucleic acid complex crystals. **Protein Science**, v. 12, n. 9, p. 1865-1871, 2003.

110 XU, H. E. et al. Structural determinants of ligand binding selectivity between the peroxisome proliferator-activated receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 24, p. 13919-13924, 2001.

111 BERNARDES, A. et al. Molecular mechanism of peroxisome proliferator-activated receptor α activation by WY14643: a new mode of ligand recognition and receptor stabilization. **Journal of Molecular Biology**, v. 425, n. 16, p. 2878-93, 2013

112 OYAMA, T. et al. Adaptability and selectivity of human peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) pan agonists revealed from crystal structures. **Acta Crystallographica D: biological crystallography**, v. 65, n. Pt 8, p. 786-795, 2009.

113 EINSTEIN, M. et al. The differential interactions of peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands with Tyr473 is a physical basis for their unique biological activities. **Molecular Pharmacology**, v. 73, n. 1, p. 62-74, 2008.

114 BRUNING, J. B. et al. Partial agonists activate PPARgamma using a helix 12 independent mechanism. **Structure**, v. 15, n. 10, p. 1258-1271, 2007.

115 NOLTE, R. T. et al. Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. **Nature**, v. 395, n. 6698, p. 137-143, 1998.

116 LI, Y. et al. T2384, a novel antidiabetic agent with unique peroxisome proliferator-activated receptor gamma binding properties. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 14, p. 9168-9176, 2008.

117 KALLENBERGER, B. C. et al. A dynamic mechanism of nuclear receptor activation and its perturbation in a human disease. **Nature Structural Biology**, v. 10, n. 2, p. 136-140, 2003.

118 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.

119 GREETHER, U. et al. Design and biological evaluation of novel, balanced dual PPARalpha/gamma agonists. **ChemMedChem**, v. 4, n. 6, p. 951-956, 2009.

120 KUWABARA, N. et al. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) have multiple binding points that accommodate ligands in various conformations: phenylpropanoic acid-type PPAR ligands bind to PPAR in different conformations, depending on the subtype. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 2, p. 893-902, 2012.

121 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. 2854-2864, 2010.

122 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. 937-941, 2007.

123 CALKIN, A. C.; THOMAS, M. C. PPAR agonists and cardiovascular disease in diabetes. **PPAR Research**, v. 2008, p. 245410, 2008. doi: 10.1155/2008/245410.

124 MICHALIK, L. et al. International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. **Pharmacological Reviews**, v. 58, n. 4, p. 726-741, 2006.

125 LIU, K. et al. Selective PPAR gamma modulators with improved pharmacological profiles. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, n. 10, p. 2437-2440, 2005.

126 LARSEN, P. J. et al. Dissociation of antihyperglycaemic and adverse effects of partial peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR-gamma) agonist balaglitazone. **European Journal of Pharmacology**, v. 596, n. 1-3, p. 173-179, 2008.

127 VIDOVIĆ, D. et al. A combined ligand- and structure-based virtual screening protocol identifies submicromolar PPAR γ partial agonists. **ChemMedChem**, v. 6, n. 1, p. 94-103, 2011.

128 GUASCH, L. et al. Identification of PPARgamma partial agonists of natural origin (I): development of a virtual screening procedure and in vitro validation. **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. e50816, 2012.

129 CASIMIRO-GARCIA, A. et al. Design, synthesis, and evaluation of imidazo[4,5-c]pyridin-4-one derivatives with dual activity at angiotensin II type 1 receptor and peroxisome proliferator-activated receptor- γ . **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 3, p. 767-772, 2013.

130 DE GROOT, J. C. et al. Structural Characterization of Amorfrutins Bound to the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ . **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 56, n.4, p. 1535–1543, 2013.

131 WEIDNER, C. et al. Amorfrutins are potent antidiabetic dietary natural products. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 19, p. 7257-7262, 2012.

132 HOPKINS, C. et al. Design and synthesis of novel N-sulfonyl-2-indole carboxamides as potent PPAR-gamma binding agents with potential application to the treatment of osteoporosis. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, n. 21, p. 5659-5663, 2006.

133 MOTANI, A. et al. INT131: a selective modulator of PPAR gamma. **Journal of Molecular Biology**, v. 386, n. 5, p. 1301-1311, 2009.

134 LEE, D. H. et al. Selective PPAR γ modulator INT131 normalizes insulin signaling defects and improves bone mass in diet-induced obese mice. **American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism**, v. 302, n. 5, p. E552-E560, 2012.

135 KEES, K. L. et al. Perfluoro-N-[4-(1H-tetrazol-5-ylmethyl)phenyl]alkanamides. a new class of oral antidiabetic agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 32, n. 1, p.11-13, 1989.



Anexos

“What is known for certain is dull.”

Max Perutz

Prêmio Nobel em Química em 1962

ANEXOS

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 23 (2013) 5795–5802



Contents lists available at ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmcl

Structure-based identification of novel PPAR gamma ligands



Flávia M. C. da Silva^a, Jademilson C. dos Santos^b, Jéssica L. O. Campos^c, Ana Carolina Mafud^b, Igor Polikarpov^b, Ana Carolina M. Figueira^c, Alessandro S. Nascimento^{a,b,*}

^a Universidade Federal do ABC, Rua Santa Adelia, 166 Bangu, Santo Andre, SP 09210-170, Brazil

^b Instituto de Física de São Carlos, Av. Trabalhador Saocarlense, 400 Centro, São Carlos, SP 13566-570, Brazil

^c Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), Centro Nacional de Pesquisas em Energia e Materiais (CNPEM/ABTLUS), Campinas, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 May 2013

Revised 31 August 2013

Accepted 3 September 2013

Available online 8 September 2013

Keywords:

Docking

PPAR gamma

Virtual screening

ABSTRACT

Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) is a nuclear receptor with an important role in the glucose metabolism and a target for type 2 diabetes mellitus therapy. The recent findings relating the use of the receptor full agonist rosiglitazone and the incidence of myocardial infarction raised concerns regarding whether receptor activation can actually be useful for diabetes management. The discovery of MRL-24 and GQ-16, ligands that can partially activate PPAR γ and prevent weight gain and fluid retention, showed that a submaximal receptor activation can be a goal in the development of new ligands for PPAR γ . Additionally, two previously described receptor antagonists, SR-202 and BADGE, were also shown to improve insulin sensitivity and decrease TNF- α level, revealing that receptor antagonism may also be an approach to pursue. Here, we used a structure-based approach to screen the subset 'Drugs-Now' of ZINC database. Fifteen ligands were selected after visual inspection and tested for their ability to bind to PPAR γ . A benzoimidazol acetate, a bromobenzyl-thio-tetrazol benzoate and a [[2-[(1,3-dioxindene-2-ylidene)methyl]phenoxy]methyl]benzoate were identified as PPAR γ ligands, with IC₅₀ values smaller than 10 μ M. Molecular dynamic simulations showed that the residues H323, H449, Y327, Y473, K367 and S289 are key structural elements for the molecular recognition of these ligands and the polar arm of PPAR γ binding pocket.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Artigo em fase final para submissão.

Structural basis for GL479 a dual Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α/γ agonist revealing different modes of binding

Jademilson Celestino dos Santos¹, Amanda Bernardes¹, Letizia Giampietro², Alessandra Ammazalorso², Barbara De Filippis², Rosa Amoroso², Igor Polikarpov^{1#}

1. Grupo de Biotecnologia Molecular, Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, Brazil. 13566-590.

2. Dipartimento di Farmacia, Università degli Studi 'G. d'Annunzio', via dei Vestini 31, 66100 Chieti, Italy.

To whom correspondence should be sent: Igor Polikarpov, Grupo de Biotecnologia Molecular, Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, Brazil. 13566-590. E-mail address: ipolikarpov@if.sc.usp.br

PDB ID: 4CI4 and 4CI5

Abbreviations: PPAR, Peroxisome Proliferator-Activated Receptor; LBD, ligand binding domain; DMSO, dimethyl sulfoxide; GL479, (*E*)-2-methyl-2-(4-(2-(4-(phenyldiazenyl)phenoxy)ethyl)phenoxy)propanoic acid; DTT, dithiothreitol; IPTG, Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside; HDL, high density lipoprotein; LBP, ligand binding pocket.

Abstract

Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPAR) are ligand-dependent transcription factors that control various functions in human organism. The PPARs play key roles in the control of glucose and lipid metabolism. PPAR γ is a target of TZD agonists that are used clinically to improve insulin sensitivity whereas fibrates, PPAR α ligands, lower serum triglyceride levels. We report here the structural basis of GL479, a synthetic dual PPAR α/γ agonist, designed by a combination of clofibric acid skeleton and a phenyldiazenyl moiety, as bioisosteric replacement of stilbene group. GL479 was previously reported as partial agonist of PPAR γ and full agonist of PPAR α with high affinity for both PPARs. Our structural studies reveal different binding modes of GL479 in PPAR α and γ , which may explain the distinct behaviors observed for each receptor. In both cases the ligand interacts with a Tyr located in helix 12 (H12), resulting in the receptor active conformation. The PPAR α :GL479 complex occupies the same region observed for other full agonists, whereas PPAR γ :GL479 complex displays a new binding mode. Our results indicate a novel region of LBP of PPARs that may be explored for the design of partial agonists as well dual PPAR α/γ agonists that combine the therapeutic effects of the treatment of insulin resistance and dyslipidemia.

Keywords: PPAR; dual agonists; insulin resistance; dyslipidemia; crystal structures;

ACCOUNT VIEW CART

NOVA
Publishers

Home Books Series Journals Reference eBooks Information Sales Imprints for Authors

ical Sciences » Biology » Biochemistry » My Account | Cart Contents | Che

Ligands: Synthesis, Characterization and Role in Biotechnology \$175.00

Editors: Paula Gawryszewska and Piotr Smoleński (Faculty of Chemistry, University of Wrocław, Wrocław, Poland)

Book Description:
To meet the search for new therapeutic compounds this book summarizes the research on biologically active organic molecules (chapters 1, 2 and 3), metal complexes with biological activity (chapter 4), and shows the possibilities for coordination chemistry in the planning of metal complexes with interesting properties for application (chapters 5, 6, 7, 8, and 9). It should be remembered that in the design of a new potentially active metaldrug, beyond the nature of the metal, the choice of appropriate ligands which affect the thermodynamic and kinetic stability, as well as the solubility and lipophilicity of the complexes is of paramount importance.
The information contained in the book concerns: 1) the interactions involving the members of the Nuclear Receptor superfamily and their ligands; 2) the role of chemokine ligands and their receptors in normal and disease processes, and the emerging therapeutic approaches of using chemokine antagonists for appropriately targeted therapy; 3) the inhibition of alkaline phosphatases by calix[4]arenes functionalised at the macrocyclic upper rim by one or two methylenebisphosphonic acid fragments; 4) the main biological applications, enzyme modelling and antiproliferative and antimicrobial activity of such scorpionate-type complexes, which are classified by ligand and also by transition metal; 5) the silver(I) discrete and polymeric coordination compounds bearing 1,3,5-triaza-7-phosphaadamantane or its derivatives towards engineering functional silver-organic frameworks (MOFs); 6) arylhydrazones of methylene active nitriles and their use as starting materials for the generation of new organic and coordination compounds; 7) amidophosphate ligands as promising sensitizers of lanthanide ions emission; 8) N-acetylsalicylhydrazidate as a versatile ligand for the synthesis of higher nuclearity metal complexes, which are illustrated herein along with their applications; 9) the chemistry and some applications of formazans which can be used for the simultaneous selective determination of several metal cations. All chapters were compiled by renowned scientists, providing both beginners in the field and advanced researchers with comprehensive information on the subject. (Imprint Nova)

Table of Contents:
Preface

Chapter 1. Ligand Interactions in Nuclear Receptors
(Ana Carolina Mafud, Jademilson C. dos Santos and Alessandro S. Nascimento, Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, Brazil)

Chapter 1

ISBN- 978-1-63117-146-8

Ligand Interactions in Nuclear Receptors.

*Ana Carolina Mafud, Jademilson C. dos Santos and Alessandro S.
Nascimento**

Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos, SP, Brazil. 13566-590.

Larissa C. Textor,^a Jademilson C. Santos,^a Nazaret Hidalgo Cuadrado,^b Manuel G. Roig,^b Galina G. Zhadan,^c Valery L. Shnyrov^c and Igor Polikarpov^{a*}

^aInstituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, Avenida Trabalhador São-carlense 400, 13560-970 São Carlos-SP, Brazil,

^bDepartamento de Química Física, Facultad de Química, Universidad de Salamanca, 37008 Salamanca, Spain, and ^cDepartamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Biología, Universidad de Salamanca, 37007 Salamanca, Spain

Correspondence e-mail: ipolikarpov@ifsc.usp.br

Received 13 July 2011
Accepted 22 September 2011



© 2011 International Union of Crystallography
All rights reserved

Purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of peroxidase from the palm tree *Chamaerops excelsa*

Plant peroxidases are presently used extensively in a wide range of biotechnological applications owing to their high environmental and thermal stability. As part of efforts towards the discovery of appealing new biotechnological enzymes, the peroxidase from leaves of the palm tree *Chamaerops excelsa* (CEP) was extracted, purified and crystallized in its native form. An X-ray diffraction data set was collected at a synchrotron source and data analysis showed that the CEP crystals belonged to the orthorhombic space group $P2_12_12_1$, with unit-cell parameters $a = 70.2$, $b = 100.7$, $c = 132.3$ Å.

1. Introduction

Enzymes that can tolerate extreme conditions of pH and temperature are widely used in biotechnological applications, particularly in the biocatalytic industry. However, the design and development of extremoenzymes are limited since the molecular basis of their conformational stability is still not completely understood. In general, peroxidases are known to be environmentally stable enzymes, especially those derived from thermophilic microorganisms (Loprasert *et al.*, 1988; Rabe *et al.*, 2008; Gudelj *et al.*, 2001; Kengen *et al.*, 2001; Apitz & van Pée, 2001) and superior plants (Mchedlishvili *et al.*, 2005; McEldoon & Dordick, 1996; Rani & Abraham, 2006). Peroxidases are involved in several physiological processes in plants, including growth regulation (Campa, 1991), lignification and cell-wall formation (Wallace & Fry, 1999), protection against pathogens and wound healing (McLusky *et al.*, 1999) and abiotic and biotic stress responses (Bolwell *et al.*, 2002; Avsian-Kretschmer *et al.*, 2004). They are haem-containing oxidoreductases that make use of hydrogen peroxide to oxidize several organic and inorganic substrates (Dawson, 1988). Based on structural properties (Welinder *et al.*, 1992), the plant peroxidase family is classified into class III (EC 1.11.1.7), which consists of secretory enzymes containing one N-terminal peptide signal, two conserved calcium ions and four disulfide bridges. These enzymes have conserved arginine and histidine residues adjacent to the haem-binding site and extra helices that play a role in the accessibility of the substrate to the haem edge (Gajhede *et al.*, 1997). They are also glycoenzymes bearing between two and eight asparagine-linked glycans which can contribute positively to protein stabilization (Wang *et al.*, 1996).

Horseradish peroxidase (HRP) is the most extensively studied peroxidase and is commercially used in biosensors and conjugates in immunoassays (Azevedo *et al.*, 2003). Soybean seed coat peroxidase (SBP) was isolated and characterized by McEldoon & Dordick (1996) and has also been considered for use in biotechnological applications owing to its higher thermostability compared with HPR (Ryan *et al.*, 2006). Towards the identification of further commercially promising stable and active peroxidases, the molecular and catalytic properties of several other plant peroxidases from fruit (Dubey *et al.*, 2007), tea leaves (Kvaratskhelia *et al.*, 1997), castor bean (Kumar *et al.*, 2008) and African and royal palm trees (Rodríguez *et al.*, 2002; Zamorano *et al.*, 2008; Watanabe *et al.*, 2010) have been studied. Moreover, crystallographic structures of class III plant peroxidases from