



**UNICAMP**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**MARIANA RAQUEL BUNORO BATISTA**

**DIVERSIDADE CONFORMACIONAL DA HÉLICE 12 DO  
RECEPTOR PPAR $\gamma$  E SUAS IMPLICAÇÕES FUNCIONAIS**

**CAMPINAS**

**2016**

MARIANA RAQUEL BUNORO BATISTA

DIVERSIDADE CONFORMACIONAL DA HÉLICE 12 DO  
RECEPTOR PPAR $\gamma$  E SUAS IMPLICAÇÕES FUNCIONAIS

Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de  
Química da Universidade Estadual de Campinas  
como parte dos requisitos exigidos para a obtenção  
do título de Doutor(a) em Ciências

Orientador: Prof. Dr. Leandro Martínez

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DE-  
FENDIDA PELA ALUNA MARIANA RAQUEL BUNORO BATISTA E  
ORIENTADA PELO PROF. DR. LEANDRO MARTÍNEZ

CAMPINAS

2016

**Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s):** FAPESP, 2013/09465-6

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca do Instituto de Química  
Camila Barleta Fullin - CRB 8462

B333d Batista, Mariana Raquel Bunoro, 1989-  
Diversidade conformacional da hélice 12 do receptor PPARgamma e suas implicações funcionais / Mariana Raquel Bunoro Batista. – Campinas, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Leandro Martínez.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Receptores nucleares. 2. Dinâmica molecular. 3. Equilíbrio conformacional. 4. PPAR. I. Martínez, Leandro, 1979-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Conformational diversity of the helix 12 of PPARgamma receptor and functional implications

**Palavras-chave em inglês:**

Nuclear receptors

Molecular dynamics

Conformational equilibrium

PPAR

**Área de concentração:** Físico-Química

**Titulação:** Doutora em Ciências

**Banca examinadora:**

Leandro Martínez [Orientador]

Guilherme Martins Santos

Antonio José da Costa Filho

Ljubica Tasic

Nelson Henrique Morgon

**Data de defesa:** 19-05-2016

**Programa de Pós-Graduação:** Química

## **BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Leandro Martínez (Orientador)

Prof. Dr. Guilherme Martins Santos (FS-UnB)

Prof. Dr. Antonio José da Costa Filho (FFCLRP-USP)

Profa. Dra. Ljubica Tasic (IQ-UNICAMP)

Prof. Dr. Nelson Henrique Morgon (IQ-UNICAMP)

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do(a) aluno(a).

Este exemplar corresponde à redação final da Tese de Doutorado defendida pela aluna **MARIANA RAQUEL BUNORO BATISTA**, aprovada pela Comissão Julgadora em 19 de maio de 2016.

*“A beleza não está na partida nem  
na chegada, mas na travessia”  
(Guimarães Rosa)*

# Agradecimentos

- Aos meus pais, Marta e João e ao meu irmão, João Luiz, pelos ensinamentos, apoio e suporte durante esses três anos e meio de doutorado.
- Ao Leandro, que sempre esteve muito presente. Agradeço por toda paciência, dedicação e, principalmente, pelos conhecimentos e experiências transmitidas.
- Às minhas amigas de graduação, Ana Paula, Jaqueline e Thaís e ao Fábio, que sempre estiveram muito presentes me motivando e me apoiando, principalmente nos momentos de questionamento sobre a vida acadêmica. Agradeço também por vocês terem me proporcionado tantos momentos de diversão e descontração.
- Às minhas amigas de Cuiabá, Luma e Isa, que sempre me receberam com muito carinho nas férias.
- Aos meus colegas e ex colegas de grupo, Luciano, Gabriel, Ivan, Emilia, Alvaro, Antônio e Tayane, pela companhia durante o doutorado e pelas contribuições nesses anos.
- À FAPESP e à Capes pelo financiamento.

# Resumo

Receptores nucleares (RN) são fatores de transcrição regulados pela interação com ligantes. Estruturalmente são formados por três domínios: um domínio N-terminal bastante variável, um domínio altamente conservado de ligação com o DNA (DBD) e um domínio C-terminal, menos conservado, denominado de domínio de ligação com o ligante (LBD). Diversos estudos mostram que a dinâmica da hélice C-terminal do LBD (H12) é um dos principais fatores no controle da atividade dos receptores nucleares. Na presença de ligantes agonistas, a H12 é estabilizada em uma conformação que favorece a interação com proteínas coativadoras. Por outro lado, na ausência de ligantes, a H12 é flexível e pode adotar diferentes conformações. Para fornecer uma descrição detalhada do equilíbrio conformacional da H12, simulações de dinâmica molecular do LBD do PPAR $\gamma$  foram realizadas em diferentes condições: na presença e na ausência de ligante e ligado a peptídeos correguladores. Os perfis de energia livre da variabilidade conformacional da H12 foram obtidos a partir de cálculos ABF. Nossos resultados mostram que, na ausência de ligantes, múltiplas conformações da H12 são acessíveis, sendo a conformação ativa a de menor energia. A interação com o ligante estabiliza fortemente a conformação ativa da H12 em relação às demais estruturas, promovendo assim uma seleção conformacional. Efeito similar foi observado para o PPAR $\gamma$  associado ao coativador. Por outro lado, a presença do peptídeo correpressor estabiliza conformações não acessíveis nos sistemas anteriores e, portanto, induz uma transição conformacional na proteína. Os mecanismos de dissociação da Rosiglitazona, um forte agonista do PPAR $\gamma$ , também foi estudado neste trabalho. Dois caminhos de saída do ligante foram obtidos, ambos envolvendo re arran-

jos nas hélices H2, H2', H3 e no  $\Omega$ -loop. Estes mecanismo são coerentes com resultados anteriores e mostram que a saída do ligante não exige o deslocamento da hélice 12.

# Abstract

Nuclear Hormone Receptors are transcription regulators modulated by ligand binding. Structurally, they are composed by three domains: a variable N-terminal domain, a highly conserved DNA-binding domain (DBD) and a less conserved C-terminal domain, known as ligand binding domain (LBD). Several studies have revealed that the dynamic properties of the C-terminal helix (H12) of the LBD are one of the most important aspects governing NR activity. When bound to agonist ligands, the H12 is stabilized in a conformation that promotes the binding of coactivator proteins. On the other side, in the absence of ligand, H12 is flexible and can adopt various conformations. To provide a detailed picture of H12 conformational equilibrium, molecular dynamics simulations of the LBD of PPAR $\gamma$  were performed in different conditions: in the presence or absence of ligand and of coregulators peptides. Free-energy profiles of the conformational variability of the H12 were obtained from ABF calculations. Our results demonstrate that, without ligand, multiple conformations of the H12 are accessible, being the agonist one the most stable. Ligand binding strongly stabilizes the agonist H12 conformation relative to other structures, promoting a conformational selection. Similar effects in the free-energy surface are observed with coactivator association. On the other side, the presence of corepressor peptides stabilizes conformations not allowed in the previous systems and, therefore, induces a conformational transition in the protein. The mechanisms of dissociation of Rosiglitazone, a strong PPAR $\gamma$  agonist, were also studied in this work. Two pathways for ligand dissociation were obtained, both involving rearrangements in the helices H2, H2', H3 and in the  $\Omega$ -loop. These mechanisms are consistent with previous results and show

that ligand escape does not require the displacement of helix 12.

# Lista de Figuras

1.1	Mecanismo de regulação da transcrição pelos receptores nucleares. . . . .	28
1.2	Mecanismo geral dos receptores nucleares: os receptores podem estar localizados dentro ou fora do núcleo celular. (A) Receptores da classe I localizam-se no citoplasma associados as HSP. Na presença do ligante o complexo é desfeito e o receptor migra para o núcleo. Uma vez no núcleo, o receptor reconhece uma sequência específica de DNA, na qual se liga na forma de homodímero, e recruta proteínas coativadoras da transcrição gênica. (B) Receptores da classe II encontram-se no núcleo associados a uma sequência específica de DNA, na forma de heterodímeros com o RXR. Na ausência do ligante, a transcrição é reprimida pela presença de proteínas correpressoras. Já na presença de um agonista, a interação com o correpressor é desfeita e proteínas coativadoras são recrutadas, ativando o mecanismo de transcrição. . . . .	30
1.3	(A) representação esquemática dos domínios estruturais dos receptores nucleares e suas funções. (B) Comparação do tamanho de alguns receptores nucleares humanos. Nota-se que o domínio N-terminal é o mais variável (Figura adaptada de [12]). . . . .	32

1.4	Estrutura do complexo PPAR $\gamma$ -RXR $\alpha$ ligado ao DNA (PDB: 3DZY [13]: os receptores PPAR $\gamma$ e RXR $\alpha$ estão representados em azul e rosa, respectivamente. Em cinza está mostrada a molécula de DNA e em branco o peptídeo coativador SRC-1. Os ligantes Rosiglitazona e ácido 9-cis retinoico estão representados em esferas e coloridos em roxo e vermelho, respectivamente. . . . .	33
1.5	(A) Representação do Domínio de ligação com o DNA mostrando os dois dedos de zinco, a hélice 1 (hélice de reconhecimento) e a extensão C-terminal (Figura adaptada de [17]). (B) Estrutura cristalográfica do DBD do ER (PDB: 1CHQ [16]): os íons de zinco estão representados como esferas vermelhas. . . . .	34
1.6	(A) Estrutura do receptor PPAR $\gamma$ [22]: o LBD forma um “sanduíche” de hélices- $\alpha$ . Em azul, verde e laranja estão mostradas as hélices dos três planos. A hélice 12 (H12) está destacada em vermelho. (B) Região AF-2 formada pelas hélices H3, H4 e H12. Na presença de agonistas estas hélices formam uma superfície adequada para a interação com proteínas coativadoras. . . . .	36
1.7	Estruturas dos receptores apo-RXR $\alpha$ (PDB 1LBD) [18] e holo-RAR $\gamma$ (PDB 2LBD) [19]. Estas estruturas levaram a proposição do modelo da ratoeira. Neste modelo, na ausência de ligantes, a H12 adota uma conformação estendida, expondo a cavidade de ligação. A interação com o ligante induz uma mudança conformacional na H12, fazendo com que esta se dobre sobre a superfície do LBD. . . . .	38

1.8	(A) Curvas de anisotropia de fluorescência calculadas para o holo-PPAR $\gamma$ (cinza) em comparação com os decaimentos experimentais do holo-PPAR $\gamma$ (preto) e apo-PPAR $\gamma$ (vermelho). As simulações foram iniciadas atribuindo diferentes conformações para a sonda. Curvas com decaimentos lentos estão associadas a pequenas flutuações na posição da sonda. Decaimentos de anisotropia rápidos são resultado da grande flexibilidade do marcador fluorescente. (B) Simulações utilizando um modelo de apo-PPAR $\gamma$ com a H12 estendida apresentaram curvas de anisotropia (cinza) com decaimentos muito mais rápidos que os descritos experimentalmente (preto). Figura adaptada de [34]. . . . .	40
1.9	No mecanismo de seleção conformacional, o ligante se liga a um subconjunto de conformações acessíveis mesmo na ausência do ligante e estabiliza este subconjunto de conformações. Por outro lado, no mecanismo de ajuste induzido, a transição conformacional do estado não ligado para o estado ligado é promovida pela interação com o ligante. . . . .	41
1.10	Estruturas cristalográfica do PPAR $\gamma$ ligado à Rosiglitazona e ao peptídeo coativador SRC-1 (A) e do PPAR $\alpha$ ligado ao correpressor SMRT (B). A hélice 12 está representada em vermelho e os peptídeos corre reguladores em azul. . . . .	42
1.11	Caminhos de dissociação no TR: (A) No caminho I, a saída do ligante se dá através de uma abertura formada entre as hélices H3 e H12. (B) No caminho II, o ligante se dissocia através da cavidade formada pela separação das hélices H8 e H11. (C) No caminho II, a quebra da H3 e a movimentação da folha- $\beta$ cria uma cavidade por onde o ligante escapa. Reproduzido de [45]. . . . .	45

2.1	Efeitos biológicos dos PPARs em diferentes tecidos. O PPAR $\alpha$ é expresso predominantemente no fígado e, em menor escala, no coração, vasos sanguíneos, rins e intestino. Essa isoforma regula a expressão de genes relacionados com o metabolismo de lipídios e com o controle de processos inflamatórios. O PPAR $\gamma$ , expresso principalmente no tecido adiposo, possui papel fundamental na adipogênese e na homeostase de lipídios e açúcares. A isoforma PPAR $\beta$ é expressa em diversos tecidos e está envolvida no controle da expressão de genes relacionados com o metabolismo da glicose e de lipídios. (FA: Fatty acid; HDL: high density lipoprotein; VLDL: very low density lipoprotein; TG: triglicerídios). . . . .	48
2.2	Exemplos de fármacos que atuam em PPARs: Fibratos são agonistas da isoforma PPAR $\alpha$ e são utilizados no tratamento da dislipidemia. Tiazolidinedionas são agonistas seletivos do PPAR $\gamma$ e são (ou foram) utilizados no controle da diabetes do tipo 2. . . . .	49
2.3	(A) Porcentagem de identidade das sequências das três isoformas do PPAR. (B) Alinhamento das sequências dos LBDs do PPAR $\gamma$ , PPAR $\alpha$ e PPAR $\beta$ .	51
2.4	(A) Cavidade de ligação do PPAR $\gamma$ : a cavidade de ligação do PPAR $\gamma$ é descrita como um bolsão em forma de “Y”. Os resíduos de cada braço estão representados em cores diferentes. (B) Estruturas cristalográfica do PPAR $\gamma$ ligado a três moléculas de ácidos graxos. . . . .	52
2.5	Estrutura do PPAR $\gamma$ com destaque para o o $\Omega$ -loop. . . . .	53
2.6	(A) Estrutura comum aos agonistas totais do PPAR $\gamma$ . Para moléculas da classe das TZDs, o ácido carboxílico é substituído pelo grupo TZD. (B) Modo de ligação da Rosiglitazona, mostrando as ligações de hidrogênio entre o ligante e resíduos da região AF-2. . . . .	55

2.7	Sobreposição de diferentes agonistas na cavidade de ligação do PPAR $\gamma$ : em amarelo estão representados agonistas totais e em azul, agonistas parciais. (Agonistas totais: PDB 2PRG [22], 1FM9 [63], 2ATH [58], 2I4J [58], 2Q59 [58] e 3B3K [69]. Agonistas parciais: 4PRG [70], 2Q5P [58], 2Q5S [58] , 2Q6R [58], 2Q61 [58] e 3D6D [69]). (B) Ampliação do sítio de ligação na presença de agonistas totais. (C) Ampliação do sítio de ligação na presença de agonsitas totais. Estes ocupam uma região alternativa, não interagindo diretamente com a H12. Adaptado de [66]. . . . .	56
2.8	(A) Sobreposição das estruturas cristalográficas do PPAR $\gamma$ ligado ao coativador SRC-1 (PDB 2PRG) e do PPAR $\alpha$ na presença no correpressor SMRT (PDB 1KKQ). (B) Detalhe da superfície de interação entre o PPAR $\gamma$ e o CoA. Os resíduos Lys301 e Glu471 que formam o grampo de carga estão coloridos em verde. (C) Comparação das sequências do coativador e do correpressor. . . . .	58
3.1	Etapas de uma simulação de dinâmica molecular. Figura adaptada de [81]	62
3.2	Parâmetros geométricos utilizados no campo de força CHARMM para modelar as interações entre átomos ligados covalentemente: (A) Estiramento das ligações químicas. (B) Deformação angular. (C) Deformação diedral. (D) Potencial de Urey-Bradley. (E) Deformação de diedros impróprios. . .	65
3.3	Representação gráfica dos potenciais de Lennard-Jones e de Coulomb. Enquanto o potencial de Coulomb decai lentamente, o potencial de Lennard-Jones é de curto alcance e tem a forma de um poço de potencial, por ser formado pela combinação de um termo repulsivo e um atrativo. . . . .	67

3.4	Efeito da escolha do passo de integração: (A) Com um passo de integração muito pequeno, o espaço de fase é amostrado lentamente. (B) Um passo de integração muito grande resulta em instabilidades. (C) Com um passo de integração apropriado, o espaço de fases é amostrado eficientemente e instabilidades são suavizadas. Figura adaptada de [82]. . . . .	69
3.5	(A) Esquema da superfície de energia livre ou paisagem energética de proteínas. (B) Ampliação da região da superfície de energia livre contendo os estados enovelados. Diferentes níveis de energia estão envolvidos com movimentos em diferentes escalas de tempo. (C) Escala de tempo dos principais tipos de movimentos em proteínas. Figura adaptada de [94]. . . . .	74
3.6	Exemplo de uma curva de energia livre em função da coordenada de reação $\xi$ . . . . .	77
4.1	(A) RMSD da hélice 12 alinhando todos os carbonos- $\alpha$ do LBD. (B) Mobilidade interna da H12. . . . .	83
4.2	Conformações agonista e alternativa utilizadas como estruturas de referência nas simulações ABF multidimensionais. . . . .	84
4.3	Superfície de energia livre da variabilidade conformacional da H12 do apo-PPAR $\gamma$ . . . . .	87
4.4	Comparação entre a conformação representativa do mínimo global para o PPAR $\gamma$ na ausência de ligante (azul) e a estrutura cristalográfica 2PRG (vermelho). Em destaque estão mostradas as interações responsáveis pela estabilização da H12 na conformação ativa na ausência de ligantes. . . . .	88
4.5	Localização das conformações de cada cluster no mapa de energia livre. . .	89

4.6	Conformações representativas da H12 para cada cluster para as simulações ABF do apo-PPAR $\gamma$ : (A) Conformação representativa do cluster mais frequente. (B) Conformação representativa do segundo cluster mais importante. (C) Conformação representativa do menor cluster. Em todas as figuras o modelo cristalográfico está representado em vermelho e as conformações obtidas nas simulações ABF em azul. . . . .	90
4.7	Cavidade de ligação com o ligante para as conformações agonista (A) e C2 (B). . . . .	91
4.8	(A) Sobreposição do modelo cristalográfico obtido por Nolte et al. [22] (vermelho) e a conformação representativa do cluster 2 (azul). (B) Comparação entre as conformações agonista (vermelho), antagonista (laranja) e C2 (azul). . . . .	92
4.9	(A) Superfície de energia livre da variabilidade conformacional da H12 do holo-PPAR $\gamma$ . (B) Comparação entre a conformação representativa do mínimo global para o PPAR $\gamma$ na presença de Rosiglitazona e a estrutura cristalográfica 2PRG. . . . .	93
4.10	(A) Na ausência de ligantes, múltiplas conformações da H12 são acessíveis, sendo a conformação ativa a mais estável. (B) A presença do ligante promove uma seleção conformacional, estabilizando a conformação agonista em relação às demais. . . . .	94
5.1	(A) Superfície de energia livre do equilíbrio conformacional da H12 do PPAR $\gamma$ ligado ao peptídeo coativador SRC-1. (B) Comparação entre a conformação de mínimo de energia obtida nas simulações ABF (azul e azul claro) e a estrutura cristalográfica (vermelho e laranja). O CoA estabiliza a H12 na conformação ativa através de ligações de hidrogênio entre a cadeia lateral do resíduo Glu471 da H12 e a cadeia principal do coativador. . . . .	98

5.2	Conformações representativas de cada mínimo local para o PPAR $\gamma$ ligado ao peptídeo coativador SRC-1. . . . .	99
5.3	Conformação de alta energia para o PPAR $\gamma$ ligado ao peptídeo coativador. Estruturas exibindo a H12 em conformações similares à antagonista foram observadas em todos os sistemas. Entretanto, estão associadas a altos valores de energia livre. Para o PPAR $\gamma$ ligado ao CoA, observa-se ainda que o deslocamento da H12 resulta na desestabilização da interação entre o coativador e o receptor. . . . .	100
5.4	(A) Perfil de energia livre para o PPAR $\alpha$ ligado ao peptídeo correpressor SMRT. (B) Comparação entre a conformação de mínimo de energia obtida nas simulações ABF (azul e azul claro) e a conformação antagonista, obtida experimentalmente (vermelho e laranja). . . . .	102
5.5	(A) Conformações da H12 similares à conformação agonista do PPAR $\gamma$ são observadas nas simulações ABF e possuem $\Delta G \sim 2$ kcal mol $^{-1}$ em relação à conformação de menor energia. Embora acessíveis, essas conformações (conformação B) estão associadas com o deslocamento do peptídeo correpressor. (B) Ligação de hidrogênio entre o correpressor SMRT e o PPAR $\alpha$ . Os resíduos que formam esta ligação estão mostrados em verde para o modelo cristalográfico e em azul para a estrutura obtida nas simulações ABF. . . . .	103
5.6	Mecanismo de repressão das proteínas correpressoras: A interação com o correpressor perturba a superfície de energia livre. O correpressor promove uma transição conformacional na H12, estabilizando conformações anteriormente inacessíveis. . . . .	104

5.7	Transições entre estados ativos e inativos devido à interação com proteínas correguladoras: Na ausência de ligantes a H12 é flexível. A interação com coativadores desloca o equilíbrio conformacional no sentido de conformações ativas. Na conformação C2, tanto a interação com CoAs quanto com CoRs são possíveis, porém, a interação com correpressores é favorecida. Após a interação com estas proteínas, conformações antagonistas passam a ser observadas. . . . .	106
6.1	Para o estudo da dissociação da Rosiglitazona foram realizadas simulações ABF utilizando como coordenada reacional a distância entre o centro de massa do ligante e dos carbonos- $\alpha$ dos resíduos Phe282, Cys285, His323, Ile326 e Leu330 localizados na cavidade de ligação do PPAR $\gamma$ . . . . .	111
6.2	(A) Flutuações atômicas dos carbonos- $\alpha$ do LBD do PPAR $\gamma$ obtidas nas simulações ABF. (B) A saída da Rosiglitazona do interior da cavidade de ligação está associada à perturbações nas hélices H2, H2' e H3, na fita $\beta$ S1 e no $\Omega$ -loop. . . . .	112
6.3	(A) Mecanismos de dissociação da Rosiglitazona. Nos dois caminhos obtidos foram observadas perturbações nas hélices H2, H2', H3 e no $\Omega$ -loop. Entretanto, no caminho I (B), a saída do ligante ocorre através de uma abertura delimitada pelas hélices H2' e H3 e pelo $\Omega$ -loop. Já o segundo caminho de dissociação (C) é delimitado pelas hélices H2 e H2' e pela fita $\beta$ S1. . . . .	114
6.4	(A) Rearranjo conformacional sofrido pela hélice H2' e pelo $\Omega$ -loop para permitir a saída do ligante. Formação das cavidades de escape do ligante: (B) Caminho I e (C) Caminho II. . . . .	114

6.5	Caminho 3: (A) Estrutura do PPAR $\gamma$ na conformação C2 com destaque para as regiões que delimitam o caminho 3. (B) Na estrutura inicial, com a Rosiglitazona no interior da cavidade de ligação, as hélices H2' e H6 estão próximas, bloqueando a saída do ligante. (C) Para permitir que o ligante escape, estas hélices se afastam. . . . .	116
6.6	Perfil de energia livre da dissociação da Rosiglitazona do sítio de ligação do PPAR $\gamma$ para as conformações agonista (vermelho) e C2 (azul). . . . .	116
6.7	Sobreposição das conformações adotadas pela Rosiglitazona em torno do mínimo global para as simulações realizadas com a conformação ativa (A) e C2 (B). Ambos os sistemas estão sobrepostos com a estrutura cristalográfica do PPAR $\gamma$ . . . . .	117
6.8	(A) Na estrutura cristalográfica PDB: 2PRG, a Rosiglitazona dobra-se em torno da H3 em forma de “U” e realiza ligações de hidrogênio com os resíduos polares Ser289, His323, His449 e Tyr473. (B) Resíduos polares localizados em torno do grupo TZD da Rosiglitazona. . . . .	118
6.9	(A) Distribuição das distâncias entre a Rosiglitazona e os resíduos Gln286, Ser289, His323, Tyr327, His449 e Tyr473, para a conformação ativa (vermelho) e C2 (azul). . . . .	119
6.10	Energia média de interação entre a Rosiglitazona e cada resíduo da cavidade de ligação do PPAR $\gamma$ : (A) Eletrostática. (B) Van der Waals. (C) Total. . . . .	119
6.11	(A) Posição do resíduo Tyr327 nas simulações com a conformação ativa (verde) e C2 (azul). (B) Na conformação ativa, os resíduos Tyr327 e Tyr473 formam uma ligação de hidrogênio secundária através de uma molécula de água. Rede de ligações de hidrogênio envolvendo Tyr473, a Rosiglitazona e os resíduos His449 (C) e Ser289 (D). . . . .	121

6.12 Perfil de energia livre da dissociação da Rosiglitazona para as conformações agonista (vermelho) e C2 (azul) e na presença do peptídeo coativador (preto). 124

# Lista de abreviaturas e siglas

**ABF** *Adaptive Biasing Force*

**AF-1** Função de Ativação 1 (*Activation Function 1*)

**AF-2** Função de Ativação 2 (*Activation Function 2*)

**CoA** Coativador

**CoR** Correpressor

**CTE** Extensão C-terminal (*C-terminal Extension*)

**DBD** Domínio de Ligação com o DNA (*DNA Binding Domain*)

**DNA** Ácido desoxirrinonucleico

**ER** Receptor de estrógeno

**GR** Receptor de Glicocorticóides

**HRE** Elementos de Resposta Hormonal (*Hormone Response Elements*)

**HSP** *Heat shock protein*

**LBD** Domínio de Ligação com o Ligante (*Ligand Binding Domain*)

**LBP** Cavidade de Ligação com o Ligante (*Ligand Binding Pocket*)

**LES** *Locally Enhanced Sampling*

**MD** Dinâmica Molecular (*Molecular Dynamics*)

**MR** Receptor de Mineralocorticoides

**NR1H4** Receptor nuclear da subfamília 1, grupo H, membro 4

**PDB** *Protein Data Bank*

**PME** *Particle Mesh Ewald*

**PR** Receptor de Progesterona

**PPAR** Receptor Ativador de Proliferadores de Peroxissomos

**RAR** Receptor do Ácido Retinóico

**RMN** Ressonância Magnética Nuclear

**RMSD** Desvio Quadrático Médio (*Root Mean Square Deviation*)

**RMSF** Flutuação Quadrática Média (*Root Mean Squared Fluctuation*)

**RN** Receptores Nucleares

**RXR** Receptor X Retinóico

**SMD** *Steered Molecular Dynamics*

**TI** Integração Termodinâmica (*Thermodynamic Integration*)

**TMD** *Targeted Molecular Dynamics*

**TR** Receptor do Hormônio da Tireóide

**TZD** Tiazolidinediona

**VDR** Receptor de Vitamina D

# Sumário

<b>1</b>	<b>Receptores Nucleares</b>	<b>27</b>
1.1	Controle da transcrição pelos receptores nucleares . . . . .	28
1.2	Estrutura e função . . . . .	31
1.2.1	A região A/B . . . . .	31
1.2.2	O domínio de ligação com o DNA . . . . .	33
1.2.3	O domínio de ligação com o ligante . . . . .	35
1.3	Dinâmica da Hélice 12 e o mecanismo de ativação dos RNs . . . . .	37
1.3.1	Interação com proteínas correguladoras . . . . .	41
1.3.2	Mecanismos de dissociação de ligantes . . . . .	43
<b>2</b>	<b>Receptor Ativador da Proliferação de Peroxissomo</b>	<b>46</b>
2.1	Funções biológicas dos PPARs e importância farmacológica . . . . .	46
2.2	Estrutura dos PPARs . . . . .	50
2.2.1	O LBD do PPAR $\gamma$ . . . . .	50
2.3	Mecanismos de ativação do PPAR $\gamma$ . . . . .	53
2.3.1	Estabilização do LBD . . . . .	54
2.3.2	O PPAR $\gamma$ e as proteínas correguladoras . . . . .	57

<b>3</b>	<b>Dinâmica Molecular de Proteínas</b>	<b>60</b>
3.1	Simulações de dinâmica molecular . . . . .	61
3.1.1	Configurações e velocidades iniciais . . . . .	62
3.1.2	Potenciais de interação . . . . .	63
3.1.3	Equações de movimento . . . . .	66
3.1.4	Ensembles . . . . .	70
3.1.5	Etapas preliminares . . . . .	71
3.2	Cálculos teóricos de diferenças de energia livre . . . . .	72
3.2.1	Integração termodinâmica . . . . .	75
3.2.2	O método ABF . . . . .	77
<b>4</b>	<b>Variabilidade conformacional da H12 do PPAR<math>\gamma</math></b>	<b>79</b>
4.1	Conformação alternativa da H12 . . . . .	79
4.1.1	Simulações de Dinâmica Molecular . . . . .	80
4.1.2	Resultados . . . . .	82
4.2	Variabilidade conformacional da H12 . . . . .	84
4.2.1	Simulações de dinâmica Molecular . . . . .	84
4.2.2	Conformações acessíveis da H12 do apo-PPAR $\gamma$ . . . . .	86
4.2.3	Estabilização do PPAR $\gamma$ pela Rosiglitazona . . . . .	92
4.3	Discussões . . . . .	95
<b>5</b>	<b>Correguladores e o equilíbrio conformacional da H12</b>	<b>96</b>
5.1	Estabilização da hélice 12 pelos coativadores . . . . .	97

5.2	Efeito do correpressor no equilíbrio conformacional da H12 . . . . .	101
5.3	Regulação da atividade do PPAR pelos corre reguladores . . . . .	105
5.4	Discussões . . . . .	106
<b>6</b>	<b>Mecanismos de dissociação da Rosiglitazona</b>	<b>108</b>
6.1	Estudos dos mecanismos de entrada e saída de ligantes para o PPAR $\gamma$ . . .	109
6.2	Simulações ABF . . . . .	110
6.3	Resultados . . . . .	111
6.3.1	Caminhos de dissociação . . . . .	113
6.3.2	Energia de dissociação da Rosiglitazona . . . . .	115
6.3.3	Estabilização do complexo PPAR $\gamma$ +Rosiglitazona pelo coativador .	122
6.4	Discussões . . . . .	123
<b>7</b>	<b>Conclusões</b>	<b>127</b>
<b>A</b>	<b>Demonstração da equação 3.18</b>	<b>131</b>

## Capítulo 1

# Receptores Nucleares

Receptores nucleares (RN) formam uma superfamília de proteínas responsáveis pela regulação da transcrição de genes envolvidos, direta ou indiretamente, no controle de diversos aspectos do desenvolvimento, homeostase e reprodução em animais [1–4]. A regulação da transcrição, para a maioria dos receptores, se dá através da interação com hormônios ou moléculas provenientes da dieta ou do metabolismo. Exemplos destes ligantes são o estrógeno, a testosterona, o hormônio tireoidiano, os ácidos graxos e as vitaminas A e D, evidenciando a importância desta classe de proteínas na regulação do metabolismo [5].

Devido ao importante papel que estas proteínas desempenham na regulação de diversos processos metabólicos, disfunções no mecanismo de sinalização dos RN têm consequências severas para saúde, como o desenvolvimento de cânceres e doenças metabólicas, tais como obesidade e diabetes [1, 6]. Dessa forma, estas proteínas, reguladas pela interação com ligantes, são utilizadas com sucesso como alvo para o tratamento de diversas doenças humanas. Por exemplo, em aproximadamente 70% dos cânceres de mama, a isoforma  $\alpha$  do Receptor de Estrógeno ( $ER\alpha$ ) é super expressa no tecido mamário. Uma droga frequentemente utilizada no tratamento deste tipo de câncer é o tamoxifeno, um potente antagonista do  $ER\alpha$  [7]. Outro exemplo de fármaco que age regulando a atividade de receptores nucleares é a classe das tiazolidinedionas (TZDs), moléculas que atuam como agonistas de  $PPAR\gamma$  e são utilizadas no tratamento da diabetes do tipo II [6].

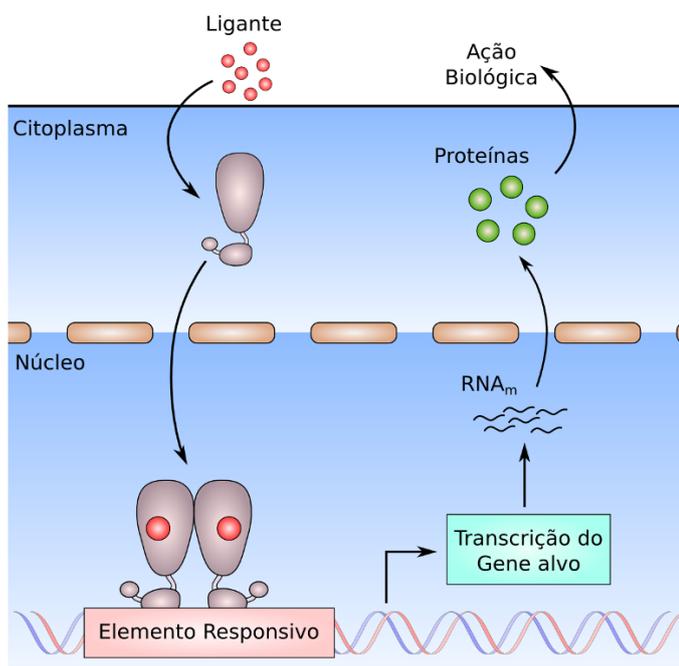


Figura 1.1: Mecanismo de regulação da transcrição pelos receptores nucleares.

Em humanos, a superfamília dos Receptores Nucleares é formada por 48 receptores, dentre os quais somente metade possuem ligantes conhecidos. Membros da família dos RN incluem: receptores de hormônios esteroidais (classe I), tais como receptores de estrogênio (ER), de progesterona (PR) e de glicocorticoides (GR); receptores de ligantes não-esteroidais (classe II), como o receptor do hormônio tireoidiano (TR) e do ácido retinoico (RAR), além de receptores que se ligam a produtos resultante do metabolismo lipídico, como ácido graxos e prostaglandinas (PPARs). A superfamília dos receptores nucleares inclui ainda os receptores órfãos (classe III), para os quais ligantes regulatórios são desconhecidos [8].

## 1.1 Controle da transcrição pelos receptores nucleares

Organismos vivos estão continuamente se adaptando para responder aos seus estados nutricionais e as suas necessidades energéticas e metabólicas. Os ligantes fisiológicos

utilizados por receptores nucleares atuam como mensageiros moleculares sinalizando as necessidades do organismo. Os ligantes são pequenas moléculas hidrofóbicas que, quando disponíveis, são transportados pela corrente sanguínea e se difundem através da membrana celular, chegando ao citosol. O primeiro passo para a obtenção de respostas genéticas necessárias para a manutenção da fisiologia normal e homeostase se dá através da interação destes sinalizadores com os receptores nucleares [5].

Na ausência de ligantes, receptores nucleares podem ser encontrados tanto no citosol quanto no núcleo celular. Receptores pertencentes a classe I (ou família dos receptores esteroidais) localizam-se predominantemente no citosol, onde formam complexos proteicos com as *heat shock proteins* (HSP) ou chaperonas. As HSPs colaboram com a manutenção do enovelamento dos receptores nucleares e auxiliam no transporte do receptor para o núcleo [9]. A interação com o ligante resulta na dissociação do complexo receptor-HSP, na formação de homodímeros e na migração do dímero para o núcleo celular. No núcleo, estes homodímeros reconhecem sequências específicas de DNA arranjadas na forma de palíndromos imperfeitos. Estas sequências de DNA são conhecidas como elementos responsivos ou elementos de resposta hormonal (HRE). Uma vez ligado ao DNA, proteínas coativadoras (CoAs) podem ser recrutadas e a transcrição do gene alvo é promovida (Figura 1.2A) [4].

Proteínas da classe II, diferentemente dos receptores esteroidais, atuam na forma de heterodímeros, associando-se ao receptor do ácido 9-cis retinoico (RXR), parceiro de dimerização promíscuo para todos os RNs da classe II. Estes heterodímeros permanecem, mesmo na ausência de ligantes, ligados aos HREs e à proteínas correguladoras. Na ausência de agonistas, a transcrição é reprimida pela presença de proteínas correpressoras (CoRs). Após a interação com o ligante, rearranjos na estrutura do heterodímero levam à perda da interação com a proteína correpressora e ao recrutamento de proteínas coativadoras, promovendo a transcrição do gene alvo (Figura 1.2B) [2, 4].

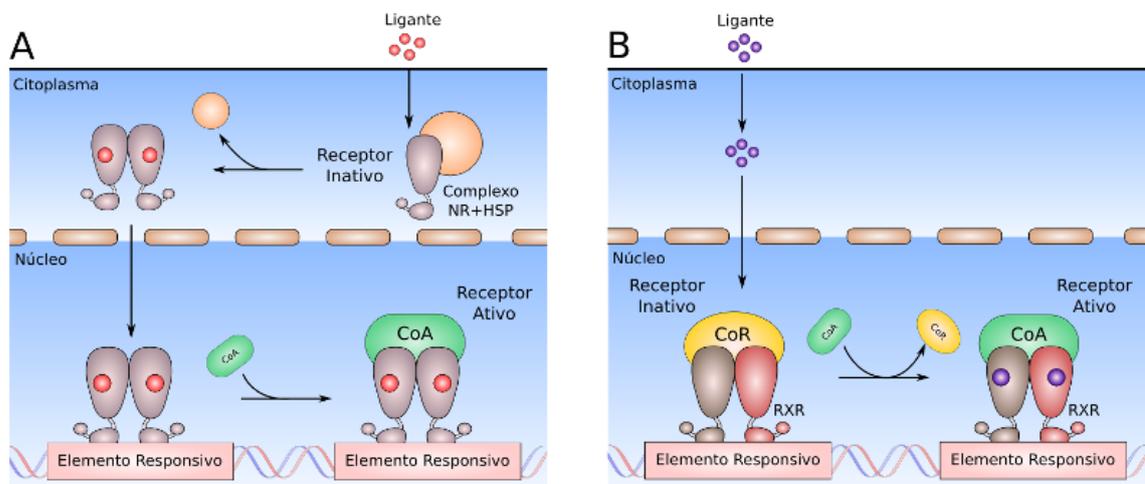


Figura 1.2: Mecanismo geral dos receptores nucleares: os receptores podem estar localizados dentro ou fora do núcleo celular. (A) Receptores da classe I localizam-se no citoplasma associados as HSP. Na presença do ligante o complexo é desfeito e o receptor migra para o núcleo. Uma vez no núcleo, o receptor reconhece uma sequência específica de DNA, na qual se liga na forma de homodímero, e recruta proteínas coativadoras da transcrição gênica. (B) Receptores da classe II encontram-se no núcleo associados a uma sequência específica de DNA, na forma de heterodímeros com o RXR. Na ausência do ligante, a transcrição é reprimida pela presença de proteínas correpressoras. Já na presença de um agonista, a interação com o correpressor é desfeita e proteínas coativadoras são recrutadas, ativando o mecanismo de transcrição.

## 1.2 Estrutura e função

Receptores nucleares possuem uma estrutura modular com diferentes regiões correspondendo a domínios funcionais aparentemente autônomos. Estes domínios podem, inclusive, ser trocados entre receptores relacionados gerando um receptor híbrido, sem perda de função. Tipicamente, um receptor nuclear é formado por três domínios: uma região desordenada N-terminal, também chamada de região A/B, um domínio central altamente conservado chamado de Domínio de ligação com o DNA (DBD) e um domínio C-terminal de ligação com o ligante (LBD) (Figura 1.3A). Além disso, os receptores nucleares possuem uma região pouco estruturada conhecida como dobradiça ou *hinge*, responsável por conectar o DBD ao LBD [10]. Alguns receptores, como os receptor de progesterona (PR) e de glicocorticoides (GR), possuem ainda uma região C-terminal, chamada de domínio F. As poucas estruturas cristalográficas deste domínio mostram que este é formado apenas por um loop e uma folha- $\beta$  que se dobram sobre a superfície do LBD. [11]. Esta estrutura multi-domínios permite que os receptores nucleares regulem a expressão de genes através da interação com pequenas moléculas e correguladores, e também através de interações com regiões específicas de DNA, realizadas pelo DBD. A figura 1.4 mostra a estrutura do complexo PPAR $\gamma$ +RXR $\alpha$ +DNA, destacando as regiões de cada receptor.

### 1.2.1 A região A/B

Esta região é bastante variável tanto em sequência quanto em tamanho entre os membros da família dos receptores nucleares. Por exemplo, a região A/B do receptor de vitamina D (VDR) é formada por apenas 64 aminoácidos, já esta mesma região no receptor de mineralocorticoides (MR) possui 603 aminoácidos (figura 1.3B) [10]. Acredita-se que este domínio seja desestruturado em solução, uma vez que até o momento não foram obtidos modelos experimentais. Este domínio contém uma região ativadora de transcrição

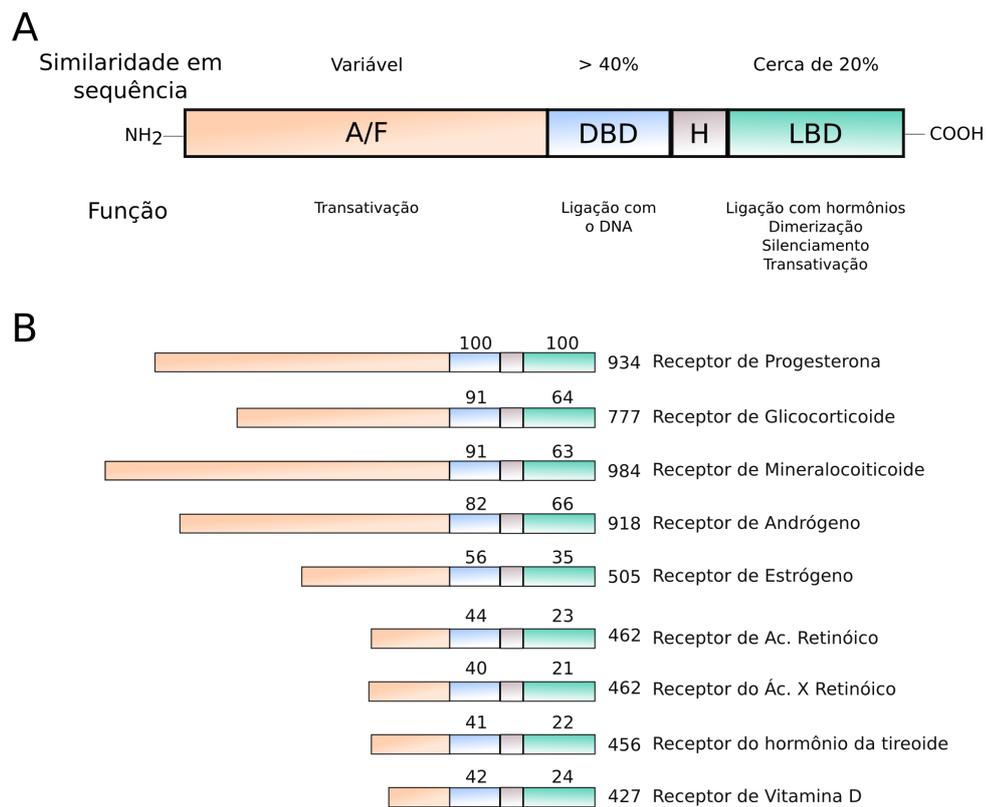


Figura 1.3: (A) representação esquemática dos domínios estruturais dos receptores nucleares e suas funções. (B) Comparação do tamanho de alguns receptores nucleares humanos. Nota-se que o domínio N-terminal é o mais variável (Figura adaptada de [12]).

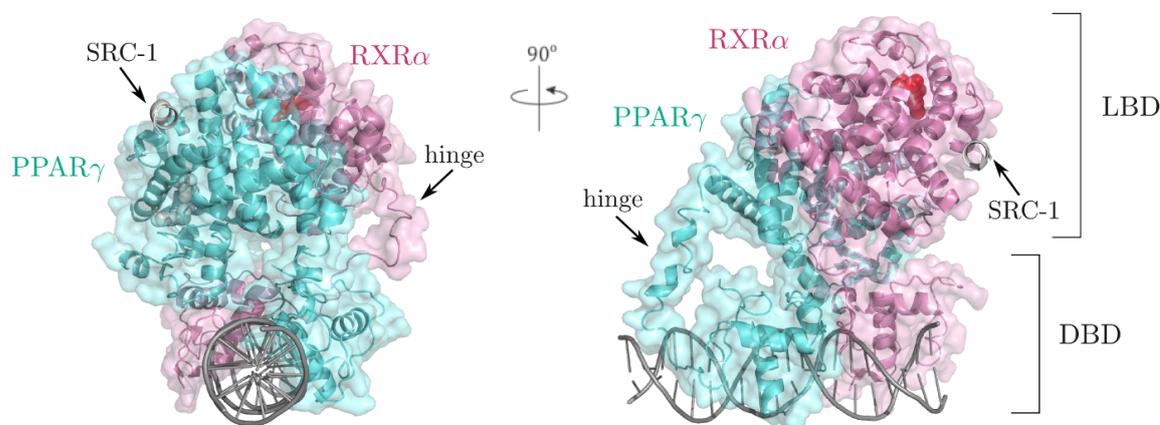


Figura 1.4: Estrutura do complexo PPAR $\gamma$ -RXR $\alpha$  ligado ao DNA (PDB: 3DZY [13]): os receptores PPAR $\gamma$  e RXR $\alpha$  estão representados em azul e rosa, respectivamente. Em cinza está mostrada a molécula de DNA e em branco o peptídeo coativador SRC-1. Os ligantes Rosiglitazona e ácido 9-cis retinoico estão representados em esferas e coloridos em roxo e vermelho, respectivamente.

independente de ligantes (AF-1). Este mecanismo de ativação ainda não está completamente estabelecido, entretanto, sabe-se que este domínio modulatório é alvo de fosforilação mediada por diferentes vias de sinalização e que estas modificações podem afetar significativamente a atividade transcricional do receptor. Além disso, o domínio N-terminal também é responsável por formar interações com proteínas correguladoras [10, 14].

### 1.2.2 O domínio de ligação com o DNA

O domínio de ligação com o DNA tem como função principal reconhecer e se ligar à sítios de DNA específicos, os HREs. Por esta razão, o DBD apresenta um alto grau de homologia dentro da superfamília dos receptores nucleares, sendo formado por aproximadamente 70 resíduos (figura 1.3B). Alguns receptores possuem ainda uma região C-terminal menos conservada, pouco estruturada e formada por cerca de 25 aminoácidos conhecida como CTE (*C-terminal extension region*), mostrada na figura 1.5A [15].

A estrutura terciária dos DBDs consiste em dois dedos de zinco intercalados por duas hélices- $\alpha$  perpendiculares entre si (figura 1.5B). Dedos de zinco são estruturas típicas de proteínas que se ligam ao DNA. No DBD, cada dedo de zinco possui 4 cisteínas conservadas, responsáveis por coordenar o íon de zinco em um arranjo tetraédrico. O reconhecimento das HREs pelo DBD é realizado por aminoácidos localizados no primeiro dedo de zinco, em uma região chamada de *P-box*. Já no outro dedo de zinco, um segundo conjunto de aminoácidos, chamados de *D-box*, é responsável pela dimerização dos DBDs quando ligados ao DNA [10].

A primeira hélice- $\alpha$  do DBD tem início após a terceira cisteína conservada. Esta hélice, conhecida como hélice de reconhecimento, liga-se no sulco maior do DNA, realizando contatos com bases específicas do HRE. A hélice C-terminal (hélice 2) contribui para a estabilização da estrutura do DBD e realiza apenas interações fracas e não específicas com o DNA [14, 16]. A estrutura do DBD do ER ligado ao DNA na forma de homodímero e um esquema das principais regiões do DBD estão mostrados na figura 1.5.

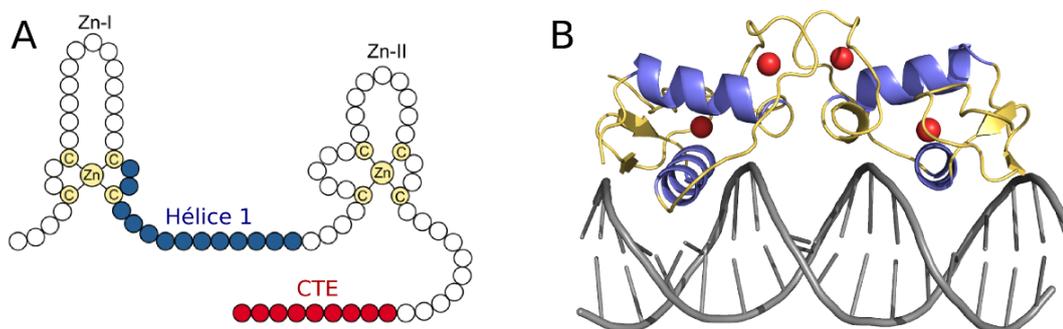


Figura 1.5: (A) Representação do Domínio de ligação com o DNA mostrando os dois dedos de zinco, a hélice 1 (hélice de reconhecimento) e a extensão C-terminal (Figura adaptada de [17]). (B) Estrutura cristalográfica do DBD do ER (PDB: 1CHQ [16]): os íons de zinco estão representados como esferas vermelhas.

### 1.2.3 O domínio de ligação com o ligante

O domínio de ligação com o ligante (LBD) é responsável por acomodar ligantes capazes de ativar ou reprimir a atividade transcricional dos receptores nucleares. Por isso, tem atraído considerável interesse no entendimento dos mecanismos de ativação dos RNs. Entretanto, LBDs são domínios multifuncionais que, além da interação com o ligante, são responsáveis pela formação de homo e heterodímeros, pela interação com as *heat shock proteins* e pelo recrutamento de proteínas correguladoras [10, 14].

As primeiras estruturas cristalográficas de LBDs foram obtidas em 1995 para os receptores RXR, RAR e TR [18–20]. Desde então, mais de 600 estruturas já foram depositadas no PDB [21], revelando que os LBDs são bastante similares. Os LBDs são domínios globulares, geralmente formados por 12 hélices- $\alpha$  arranjadas em 3 camadas, além de pequenas fitas- $\beta$ . Estas hélices estão organizadas de modo a formar uma estrutura chamada de “sanduíche” de hélices- $\alpha$  antiparalelas. As hélices H1, H3, H7, H10 e H11 formam os dois planos mais externos, já as hélices H4, H5, H6, H8, H9, compõem o plano interno do sanduíche. Alguns exceções são observadas dentro da família dos receptores nucleares. Por exemplo, o RAR $\gamma$  possui apenas 11 hélices, já para o PPAR $\gamma$ , uma hélice adicional (hélice H2') é observada [19, 22]. A figura 1.6A mostra a estrutura típica de um LBD de RNs, destacando os três planos de hélices.

O LBD também contém uma importante região de ativação da transcrição gênica, denominada AF-2 (*Activation Function 2*), cuja ativação depende da ocupação da cavidade de ligação por agonistas. Esta região, mostrada na figura 1.6B é formada pela hélice C-terminal, conhecida como hélice 12 (H12) e pelas hélices 3 e 4. Na presença de agonistas, estas hélices formam uma superfície hidrofóbica adequada para a interação com proteínas coativadoras [23].

Embora a arquitetura geral de diferentes receptores nucleares seja bastante similar, uma característica que diferencia os LBDs e confere especificidade aos RNs é o volume

da cavidade de ligação com o ligante, LBP (*Ligand Binding Pocket*). A superfície interna da cavidade de ligação é formada predominantemente por resíduos não-polares, estando de acordo com a característica hidrofóbica dos ligantes naturais. Receptores que se ligam com alta afinidade a um ligante específico, geralmente possuem cavidade de ligação pouco volumosa, como é o caso do TR e do ER. Por outro lado, receptores promíscuos, que interagem com diversos ligantes e com menor afinidade, como o PPAR $\gamma$ , possuem LBPs maiores. O maior volume da cavidade de ligação nestes receptores permite a acomodação de ligantes com diferentes naturezas e em diferentes orientações [24].

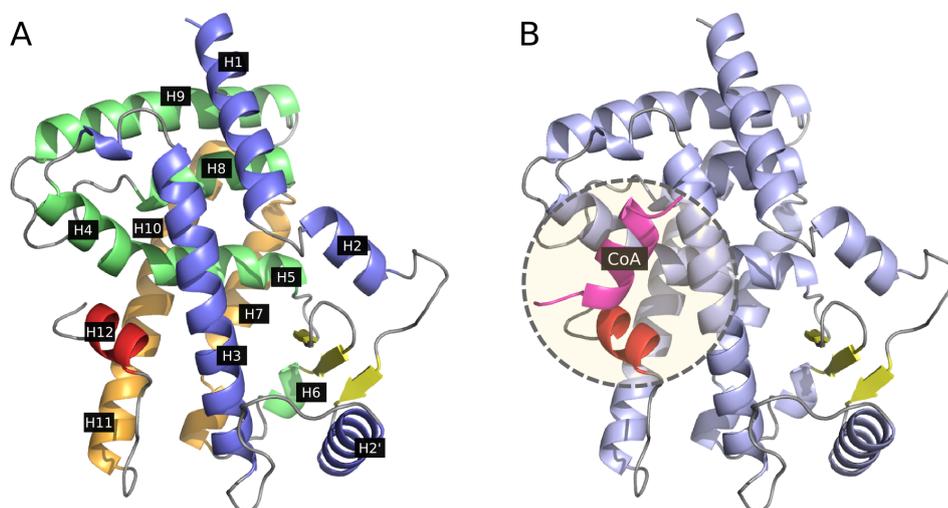


Figura 1.6: (A) Estrutura do receptor PPAR $\gamma$  [22]: o LBD forma um “sanduíche” de hélices- $\alpha$ . Em azul, verde e laranja estão mostradas as hélices dos três planos. A hélice 12 (H12) está destacada em vermelho. (B) Região AF-2 formada pelas hélices H3, H4 e H12. Na presença de agonistas estas hélices formam uma superfície adequada para a interação com proteínas coativadoras.

## 1.3 Dinâmica da Hélice 12 e o mecanismo de ativação dos RNs

A variabilidade conformacional da hélice 12 é um dos aspectos fundamentais na regulação da função dos receptores nucleares. A natureza dinâmica desta hélice passou a ser investigada após a determinação das primeiras estruturas cristalográficas dos receptores do ácido retinoico na presença (holo-RAR $\gamma$ ) e na ausência do ligante (apo-RXR $\alpha$ ) [18, 19]. Como mostrado na figura 1.7, na ausência do ligante, a H12 projeta-se para fora do corpo do LBD, deixando exposto o sítio de ligação com o ligante. Por outro lado, na presença do ácido 9-cis retinoico, a H12 encontra-se dobrada sobre a superfície da proteína. A comparação entre as duas estruturas levou os autores a propor um modelo para a ativação induzida pelo ligante que ficou conhecido como “modelo da ratoeira”. Neste modelo, a interação com agonistas promove o fechamento da H12, o que favorece a interação com proteínas coativadoras e impede a interação com correpressores. Dessa forma, o ligante seria responsável por induzir alterações conformacionais no LBD, levando de uma conformação inativa para um estado ativo [25–28].

Entretanto, estudos estruturais posteriores contrariam o mecanismo proposto pelo modelo da ratoeira. Embora a mobilidade da H12 seja importante para a ativação dos RNs, acredita-se que a conformação estendida descrita neste modelo seja resultado de artefatos cristalográficos. A estrutura cristalográfica do RXR $\alpha$  foi derivada de um tetrâmero, no qual a H12 do LBD de uma unidade interage com o LBD de outra unidade [29]. Outra estrutura cristalográfica exibindo a H12 na conformação aberta foi obtida para o ER $\alpha$ , porém, neste caso, os próprios autores sugerem que esta configuração se deve ao empacotamento cristalino [26]. Além disso, estruturas cristalográficas de LBDs sem ligantes obtidas posteriormente, sempre mostraram a H12 em posições semelhantes às observadas em LBDs com agonistas.

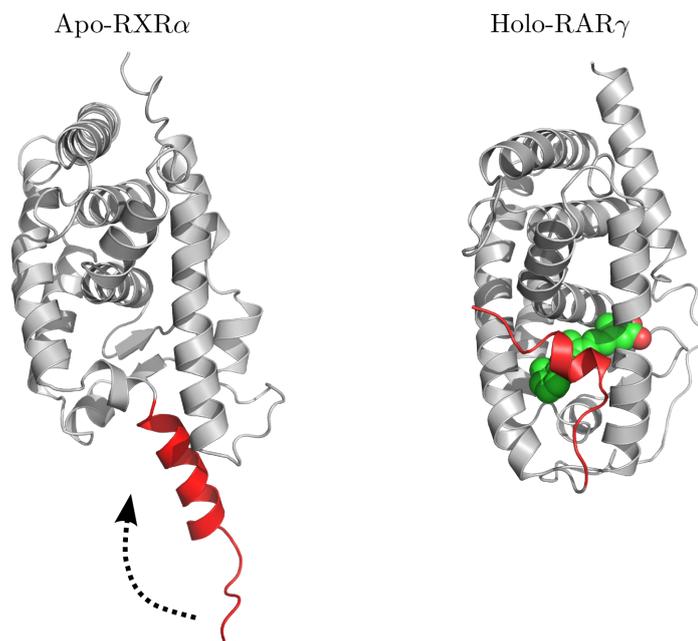


Figura 1.7: Estruturas dos receptores apo-RXR $\alpha$  (PDB 1LBD) [18] e holo-RAR $\gamma$  (PDB 2LBD) [19]. Estas estruturas levaram a proposição do modelo da ratoeira. Neste modelo, na ausência de ligantes, a H12 adota uma conformação estendida, expondo a cavidade de ligação. A interação com o ligante induz uma mudança conformacional na H12, fazendo com que esta se dobre sobre a superfície do LBD.

Um modelo alternativo para a ativação dos RN por ligantes baseia-se na estabilização da dinâmica da H12. Diversos estudos mostram que os LBDs e, particularmente a H12 de RNs, são mais flexíveis na ausência de ligantes. Um estudo fundamental para este modelo foi realizado por Schwabe et al. [30]. Neste trabalho, um conjunto de medidas de anisotropia de fluorescência resolvida no tempo foi realizado para uma sonda fluorescente acoplada a extremidade C-terminal do LBD do PPAR $\gamma$ . A taxa de decaimento da anisotropia de fluorescência está relacionada com a velocidade da reorientação da sonda em solução. Uma vez que o fluoróforo está acoplado a extremidade C-terminal do PPAR $\gamma$ , sua reorientação é dependente dos seus movimentos em relação ao LBD, dos movimentos da H12 e da rotação do LBD como um todo. Os autores demonstraram que o decaimento da anisotropia é mais rápido na ausência do ligante, o que confirma a imagem da hélice

12 mais flexível nesta situação. Estudos de ressonância magnética nuclear (RMN) para diferentes receptores nucleares também demonstraram a estabilização da H12 induzida pelo ligante [31–33].

Os trabalhos citados acima foram fundamentais na descrição da estabilização da H12 na presença de ligantes. Entretanto, somente a análise dos dados experimentais não é capaz de fornecer um modelo estrutural detalhado para a extensão dos movimentos desta hélice. Para preencher a lacuna entre os experimentos e os modelos moleculares e fornecer uma descrição dos movimentos da H12 em solução, realizamos recentemente simulações de dinâmica molecular do LDB de PPAR $\gamma$  com uma sonda fluorescente acoplada a hélice C-terminal, reproduzindo o trabalho experimental de Schwabe [34]. Neste trabalho, demonstramos que os movimentos moleculares da sonda acoplada a H12 são consistentes com as observações experimentais quando as flutuações são locais, sem o desprendimento da hélice do corpo do LBD. O deslocamento da sonda da superfície do LBD resulta em taxas de decaimento muito mais rápidas que as descritas experimentalmente. Dessa forma, as conformações da H12 devem permitir o contato entre a sonda e a superfície do LBD, implicando que a H12 não deve adotar a conformação estendida (Figura 1.8A). Foi demonstrado também que modelos do PPAR $\gamma$  com a H12 na conformação estendida implicam em taxas de decaimento muito mais rápidas que as observadas experimentalmente. Desta forma, o LBD do PPAR $\gamma$  em solução (e possivelmente da maioria dos receptores) deve ser compacto, com a H12 mantendo contato com a superfície do LBD tanto na presença quanto da ausência de ligantes (Figura 1.8B) [34].

Dois modelos são utilizados para descrever as alterações conformacionais em proteínas devido a interação com ligantes. No primeiro modelo, conhecido como seleção conformacional, proteínas são descritas como moléculas intrinsecamente dinâmicas. Na sua forma não ligada a proteína explora um conjunto de conformações, incluindo conformações estruturalmente similares a conformação ligada. O ligante se liga a um subconjunto de conformações, deslocando o equilíbrio no sentido deste subconjunto e, conseqüentemente,

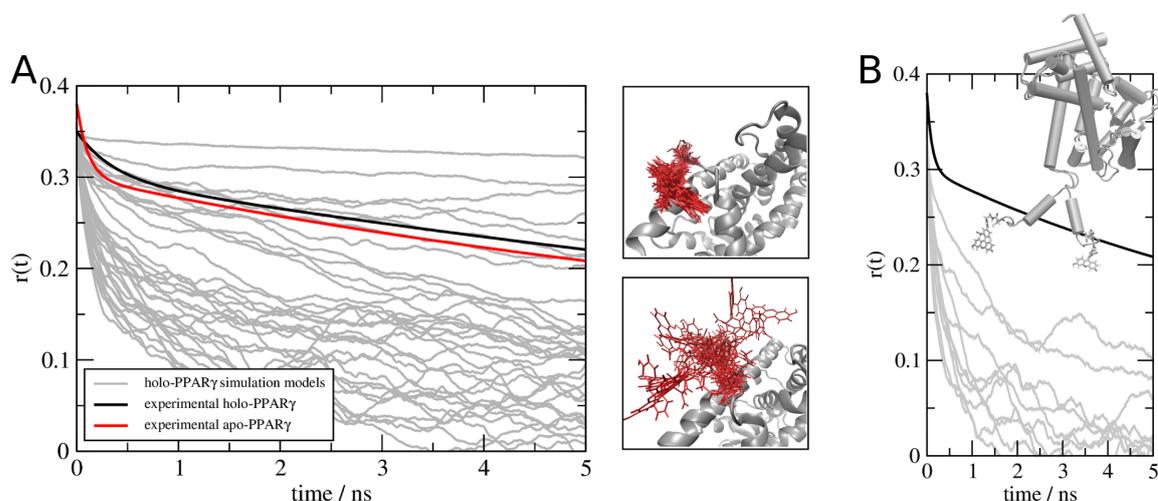


Figura 1.8: (A) Curvas de anisotropia de fluorescência calculadas para o holo-PPAR $\gamma$  (cinza) em comparação com os decaimentos experimentais do holo-PPAR $\gamma$  (preto) e apo-PPAR $\gamma$  (vermelho). As simulações foram iniciadas atribuindo diferentes conformações para a sonda. Curvas com decaimentos lentos estão associadas a pequenas flutuações na posição da sonda. Decaimentos de anisotropia rápidos são resultado da grande flexibilidade do marcador fluorescente. (B) Simulações utilizando um modelo de apo-PPAR $\gamma$  com a H12 estendida apresentaram curvas de anisotropia (cinza) com decaimentos muito mais rápidos que os descritos experimentalmente (preto). Figura adaptada de [34].

modulando a atividade da proteína. O segundo modelo, chamado de ajuste induzido, assume que o estado ligado é caracterizado por conformações não observadas na ausência do ligante [35–37]. A interação com o ligante promove uma transição conformacional do estado apo para o estado holo. Estes dois modelos estão descritos na figura 1.9.

As alterações conformacionais na hélice 12 descritas pelo modelo da ratoeira são consistentes com o mecanismo de ajuste induzido. Assim, o LBD deveria existir em duas conformações discretas (ativa e inativa) e a transição entre estas conformações seria promovida pela interação com o ligante. Entretanto, os estudos descritos acima (de anisotropia de fluorescência e de RMN) indicam a existência de um conjunto de conformações acessíveis na ausência de ligantes, que é reduzido após a interação com um agonista. Dessa forma, a ativação pelo ligante provavelmente ocorre através da estabilização de uma certa conformação (conformação ativa) e não através de uma transição conformacional.

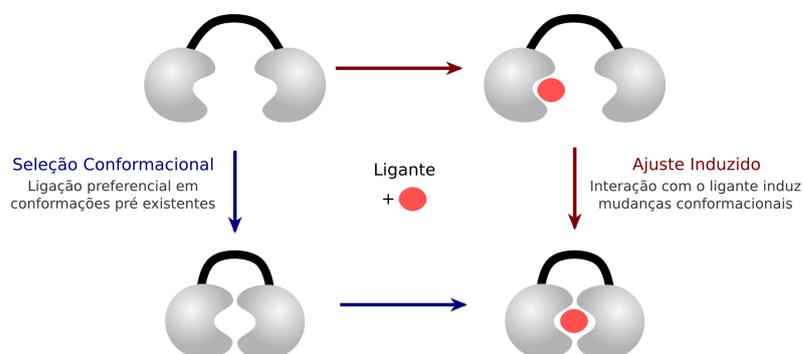


Figura 1.9: No mecanismo de seleção conformacional, o ligante se liga a um subconjunto de conformações acessíveis mesmo na ausência do ligante e estabiliza este subconjunto de conformações. Por outro lado, no mecanismo de ajuste induzido, a transição conformacional do estado não ligado para o estado ligado é promovida pela interação com o ligante.

### 1.3.1 Interação com proteínas correguladoras

A regulação da transcrição de genes pelos receptores nucleares envolve não apenas a interação com o DNA e com ligantes, mas também o recrutamento de proteínas correguladoras. Proteínas correguladoras atuam ativando ou reprimindo a transcrição através da remodelação da cromatina e também através da interação com outros fatores de transcrição [38]. Estas proteínas são divididas em coativadores e correpressores, dependendo do efeito que provocam, podendo ativar ou inibir a transcrição. Em geral, correpressores se ligam aos receptores nucleares na ausência de ligantes ou na presença de antagonistas, inibindo a transcrição. Na presença de um agonista, a proteína correpressora é liberada e o coativador é recrutado. Portanto, a interação com os correguladores é regulada, principalmente, por alterações conformacionais na H12 promovidas pela presença do ligante.

A interação com agonistas reduz a mobilidade da H12 e estabiliza esta hélice em uma conformação dobrada sobre a superfície do LBD. Muitas vezes, esta estabilização se dá através de contatos diretos entre o ligante e a hélice 12, como é o caso do PPAR $\gamma$  e da

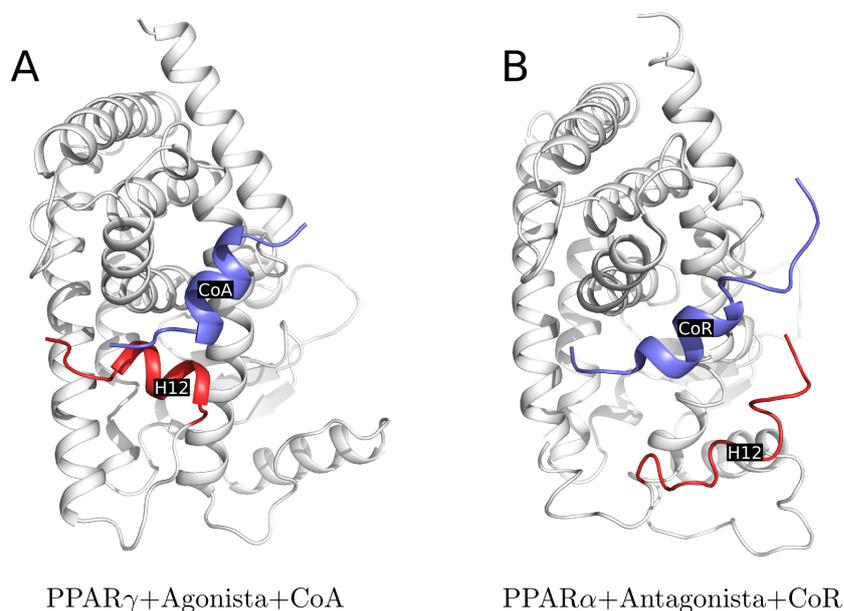


Figura 1.10: Estruturas cristalográfica do PPAR $\gamma$  ligado à Rosiglitazona e ao peptídeo coativador SRC-1 (A) e do PPAR $\alpha$  ligado ao correpressor SMRT (B). A hélice 12 está representada em vermelho e os peptídeos correguladores em azul.

Rosiglitazona (um forte agonista deste receptor). Este rearranjo estrutural cria uma superfície hidrofóbica de interação com proteínas coativadoras formada pelas hélices H3, H4 e H12. A interação entre os receptores nucleares e as proteínas coativadoras se dá através de um motivo chamado de RN box, formado pelos resíduos LxxLL<sup>1</sup>. Estes aminoácidos estão arranjados em uma hélice- $\alpha$  de duas voltas, com as três leucinas formando a superfície de interação com o receptor nuclear. Além dos contatos hidrofóbicos, o motivo LxxLL permanece ancorado na superfície do LBD através de interações eletrostáticas entre a cadeia principal da hélice do CoA e resíduos conservados de lisina e ácido glutâmico, localizados nas hélices 3 e 12, respectivamente [39, 40]. A estrutura do PPAR $\gamma$  na presença de Rosiglitazona e do coativador SRC-1 está mostrada na figura 1.10A.

Proteínas coativadoras e correpressoras compartilham a mesma superfície de interação

<sup>1</sup>A letra L representa o aminoácido Leucina. Os “x” são resíduos variáveis.

com os receptores nucleares, o que torna a associação com CoAs e CoRs eventos mutuamente exclusivos. A interação com proteínas corressoras se dá através do motivo LxxxIxxxL/I, o qual é similar ao motivo LxxLL dos coativadores, entretanto, com uma extensão N-terminal. Enquanto a sequência LxxxL forma uma hélice- $\alpha$  de duas voltas, o motivo LxxxIxxxL/I dá origem a uma hélice de 3 voltas. Esta volta adicional se sobrepõe a H12 na conformação ativa. Assim, para acomodar o corressor, é necessário que a hélice 12 seja reposicionada (figura 1.10B). O complexo LBD-corressor pode ainda ser estabilizado pela presença de ligantes antagonistas, os quais impedem que a H12 adote a conformação ativa. Portanto, o equilíbrio conformacional da H12 é controlado não somente pela interação com ligantes, mas também pela interação com proteínas correguladoras. O papel dos correguladores neste equilíbrio será discutido em um dos capítulos desta tese.

### 1.3.2 Mecanismos de dissociação de ligantes

O modelo da ratoeira, baseado nas estruturas do holo-RAR $\gamma$  e apo-RXR $\alpha$ , propõe um mecanismo para a entrada e saída do ligante do interior da cavidade de ligação do LBD. Este modelo baseia-se em um rearranjo significativo da hélice 12 expondo ou bloqueando a cavidade de ligação (Figura 1.7) [25]. Entretanto, estruturas cristalográficas de outros LBDs na ausência de ligantes e o fato de diversos RNs exibirem atividade basal (atividade na ausência de agonistas) sugerem que os movimentos da H12 sejam mais discretos do que o proposto pelo modelo da ratoeira. Além disso, outra inconsistência vem do fato de que proteínas correguladoras se ligam na mesma região do LBD envolvida neste mecanismo (região da H12). Dessa forma, a via de entrada e saída de ligantes estaria bloqueada, seja por corressores, na ausência de ligantes, ou por coativadores, na presença de agonistas [41].

A determinação de mecanismos de associação e dissociação de ligantes por métodos

experimentais pode ser bastante complexa. Assim, métodos computacionais, especialmente simulações de dinâmica molecular (MD), destacam-se como ferramentas na busca de vias de entrada/saída de ligantes. Metodologias distintas, em especial simulações SMD (*Steered Molecular Dynamics*) e simulações LES (*Locally Enhanced Sampling*), têm sido utilizadas no estudo deste mecanismo. Mecanismos de dissociação de ligantes em diferentes receptores, como RARs [42–44], TRs [41, 45, 46], PPAR $\gamma$  [47], VDR [48] e NR1H4 [49] são descritos na literatura.

Os primeiros trabalhos nesta área foram realizados para o estudo da dissociação do ácido retinoico da cavidade de ligação do RAR $\gamma$  por dois grupos distintos. Blondel et al., utilizando LES MD, observaram uma única via de saída do ligante formada através da abertura da H12 [42]. Simulações SMD para o RAR, realizadas por Kosztin et al., mostraram uma rota alternativa de saída: uma pequena abertura na superfície da proteína, entre as hélices H1 e H3 [43]. Embora os trabalhos citados tenham mostrado a dissociação do ligante por uma abertura formada a partir da movimentação da H12, como sugerido no modelo da roeteira, não foi observada a abertura total desta hélice, como na estrutura do apo-RXR $\alpha$ .

Posteriormente a esses trabalhos, os mecanismos de dissociação de diferentes ligantes de TRs foram estudados por Martínez et al. As simulações para o TR revelaram três possíveis caminhos de saída do ligante (Figura 1.11). O caminho I é uma variação do modelo da roeteira, onde a H12 afasta-se a superfície do LBD permitindo a saída do ligante por uma abertura formada entre as hélices H3 e H12. O caminho II é formado a partir da separação das hélices H8 e H11 e pela abertura do  $\Omega$ -loop (loop que conecta as hélices H2 e H3). Por fim, o caminho III envolve uma abertura formada pela movimentação da folha- $\beta$  e das hélices H2 e H3. Para a dissociação de ligantes do TR foi observado que o caminho III é o mais favorável [41, 41, 45]. Mecanismos similares aos caminhos II e III foram descritos para a dissociação de ligantes em outros receptores, incluindo o PPAR $\gamma$  [47]. Mais detalhes sobre os mecanismo de dissociação em PPARs serão descritos no

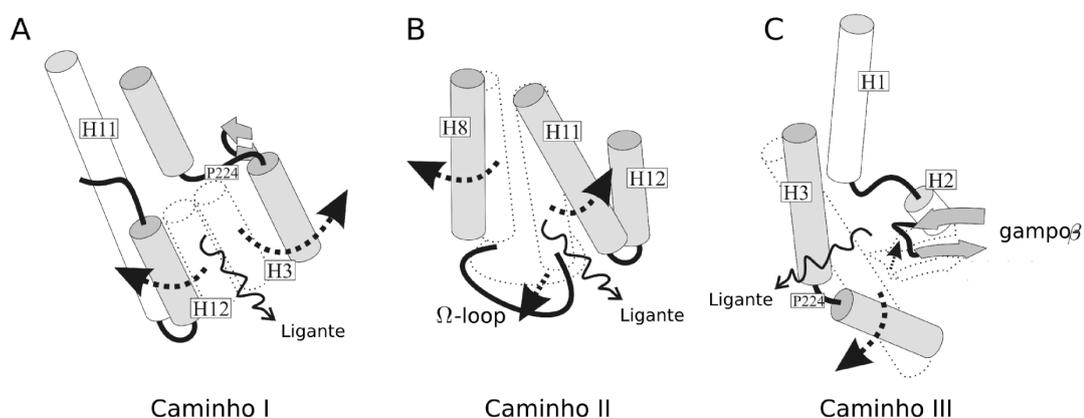


Figura 1.11: Caminhos de dissociação no TR: (A) No caminho I, a saída do ligante se dá através de uma abertura formada entre as hélices H3 e H12. (B) No caminho II, o ligante se dissocia através da cavidade formada pela separação das hélices H8 e H11. (C) No caminho II, a quebra da H3 e a movimentação da folha- $\beta$  cria uma cavidade por onde o ligante escapa. Reproduzido de [45].

capítulo 6, onde serão mostrados resultados de simulações ABF (*Adaptive Biasing Force*) para o estudo da dissociação da Rosiglitazona.

## Capítulo 2

# Receptor Ativador da Proliferação de Peroxissomo

Os Receptores Ativadores da Proliferação de Peroxissomos (PPARs, *Peroxisome Proliferator Activated Receptor*) são receptores nucleares envolvidos, principalmente, na regulação do metabolismo de lipídeos e da glicose. Em mamíferos são encontradas três isoformas de PPARs:  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ . Essas isoformas são produtos de diferentes genes, e diferem em relação as suas distribuições nos tecidos, especificidades aos ligantes e funções biológicas [50, 51]. O nome PPAR deriva da habilidade do primeiro subtipo identificado, o PPAR $\alpha$ , de induzir a proliferação de peroxissomos em hepatócitos de roedores. Entretanto, foi observado posteriormente que essa função não é compartilhada pelas demais isoformas do PPAR [52, 53]. Neste capítulo serão apresentados detalhes dos aspectos funcionais, estruturais e dinâmicos dos PPARs, em especial para a isoforma  $\gamma$ .

## 2.1 Funções biológicas dos PPARs e importância farmacológica

Embora a subfamília dos PPARs esteja ligada ao metabolismo de lipídios, as três isoformas exibem padrões de expressão distintos, que estão relacionados com as funções

específicas que desempenham no organismo. O PPAR $\alpha$  é expresso predominantemente no fígado e, em menor proporção, em outros tecidos como coração, rins e intestino, onde é essencial no processo de oxidação de ácidos graxos. Nesses tecidos, o PPAR $\alpha$  participa da regulação de diversos genes envolvidos em diferentes etapas da utilização de ácidos graxos. Essas etapas incluem a absorção e o transporte destes para a mitocôndria e a  $\beta$ -oxidação <sup>1</sup> [52, 54]. Agonistas do PPAR $\alpha$ , como os fibratos (Figura 2.2), são utilizados eficientemente no tratamento da dislipidemia <sup>2</sup>. Além disso, agonistas deste receptor possuem ação anti-inflamatória e anti-aterosclerótica <sup>3</sup> [50].

Ao contrário das isoformas  $\alpha$  e  $\gamma$  que são expressas preferencialmente em tecidos específicos, o PPAR $\beta$  é expresso ubiquamente em diversos tecidos do organismo. Essa isoforma é a menos estudada das três e seu papel biológico ainda é pouco compreendido. Entretanto, estudos farmacológicos e genéticos mostram sua importância na regulação do catabolismo de ácidos graxos e na homeostase energética [54]. Além disso, o PPAR $\beta$  parece estar indiretamente envolvido na adipogênese, através da regulação da isoforma  $\gamma$  do PPAR [51].

O PPAR $\gamma$  é expresso predominantemente no tecido adiposo e, em menores níveis, é encontrado também no intestino, rins e fígado [55]. Enquanto o PPAR $\alpha$  opera no catabolismo dos ácidos graxos, o PPAR $\gamma$  atua no armazenamento destes no tecido adiposo [56]. Assim, a isoforma  $\gamma$  do PPAR desempenha papel fundamental na regulação da adipogênese e no metabolismo dos lipídios. Além destas funções, a ativação do PPAR $\gamma$  estimula a expressão de adipocinas, sinalizadores celulares relacionados a sensibilidade dos tecidos à insulina [57]. Dessa forma, o PPAR $\gamma$  desperta interesse como alvo farmacológico para o tratamento da diabetes do tipo II. Atualmente, uma classe de fármacos

---

<sup>1</sup> $\beta$ -oxidação é o processo catabólico no qual ácidos graxos são hidrolisados para gerar acetil-Coenzima A (acetil-CoA)

<sup>2</sup>Dislipidemia é uma condição metabólica caracterizada pela concentração anormal de ácidos graxos livre no sangue.

<sup>3</sup>Aterosclerose é uma doença inflamatória crônica caracterizada pela formação de placas, compostas principalmente por lipídeos e tecido fibroso, na parede dos vasos sanguíneos.

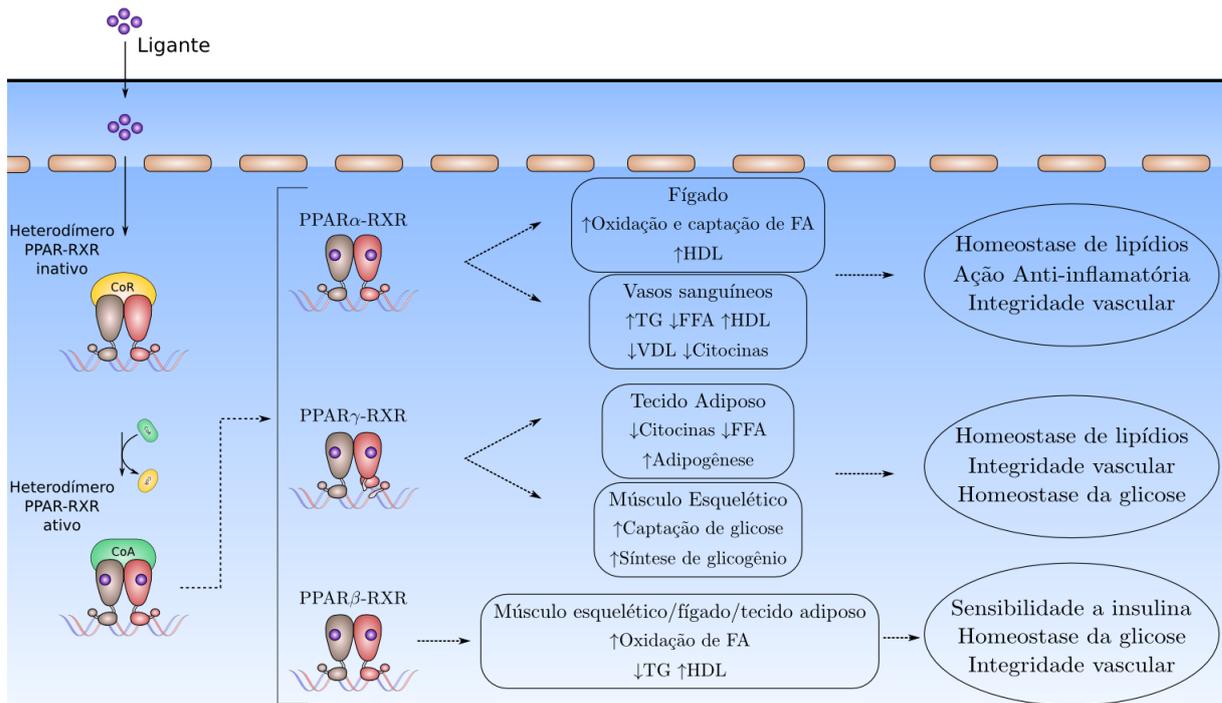


Figura 2.1: Efeitos biológicos dos PPARs em diferentes tecidos. O PPAR $\alpha$  é expresso predominantemente no fígado e, em menor escala, no coração, vasos sanguíneos, rins e intestino. Essa isoforma regula a expressão de genes relacionados com o metabolismo de lipídios e com o controle de processos inflamatórios. O PPAR $\gamma$ , expresso principalmente no tecido adiposo, possui papel fundamental na adipogênese e na homeostase de lipídios e açúcares. A isoforma PPAR $\beta$  é expressa em diversos tecidos e está envolvida no controle da expressão de genes relacionados com o metabolismo da glicose e de lipídios. (FA: Fatty acid; HDL: high density lipoprotein; VDL: very low density lipoprotein; TG: triglicerídios).

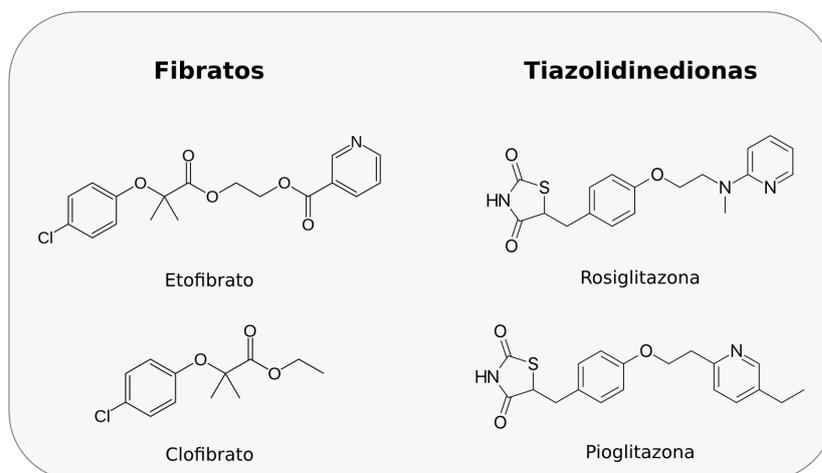


Figura 2.2: Exemplos de fármacos que atuam em PPARs: Fibratos são agonistas da isoforma PPAR $\alpha$  e são utilizados no tratamento da dislipidemia. Tiazolidinedionas são agonistas seletivos do PPAR $\gamma$  e são (ou foram) utilizados no controle da diabetes do tipo 2.

conhecida como tiazolidinedionas (TZDs), atuam como agonistas seletivos do PPAR $\gamma$  e são utilizados como medicamentos anti-diabéticos (Figura 2.2). Entretanto, o sucesso das TZDs no tratamento da diabetes do tipo II é controverso. Devido ao papel adipogênico do PPAR $\gamma$ , a ativação constante deste receptor pelas TZDs resulta em ganho de peso [57]. Outros efeitos colaterais associados ao uso das tiazolidinedionas são o aumento da retenção de líquidos e, especialmente, aumento da incidência de problemas cardiovasculares [58]. Devido à esses efeitos adversos, alguns fármacos da classe dos TZDs, como a Rosiglitazona, tiveram sua venda proibida recentemente em vários países.

Estudos recentes mostraram que agonistas parciais do PPAR $\gamma$ , embora ativem o receptor com taxas significativamente menores que os agonistas totais, apresentam atividade anti-diabética comparável. Além disso, esses agonistas apresentam pouca atividade adipogênica. Acredita-se que o efeito anti-diabético de agonistas do PPAR $\gamma$  esteja relacionado com a capacidade destes de bloquear a fosforilação da Ser273 pela proteína quinase Cdk5 [59, 60]. Choi et al. demonstraram que a fosforilação do PPAR $\gamma$  não ativa e nem suprime a atividade transcricional do receptor, entretanto, altera a expressão de genes específi-

cos, como por exemplo genes relacionados com a expressão das adipocinas. Assim, a inibição da fosforilação é vista como o mecanismo mais provável por trás da atividade anti-diabética dos ligantes do PPAR $\gamma$  [61].

## 2.2 Estrutura dos PPARs

Como proteínas pertencentes à superfamília dos receptores nucleares, os PPARs possuem estrutura modular formada por três domínios: o domínio N-terminal, o domínio central de ligação com o DNA e o domínio de ligação com o ligante. As três isoformas do PPAR compartilham  $\sim 80\%$  e  $\sim 70\%$  de identidade de aminoácidos entre os seus DBDs e LBDs, respectivamente (Figura 2.3A) [62]. Assim como os demais membros da classe II dos receptores nucleares, o PPAR atua obrigatoriamente na forma de heterodímeros com o receptor RXR. Em 2008, foi determinada através de difração de raios-X a primeira estrutura de PPAR $\gamma$  contendo o DBD e o LBD em complexo com o RXR $\alpha$ . Esta estrutura revelou que a interface de dimerização entre estes receptores é formada por três regiões distintas: a primeira envolvendo os DBD dos dois receptores, a segunda formada entre o LBD do PPAR e o DBD do RXR e a terceira, e mais importante, a superfície de dimerização entre os LBDs. Esta interface é formada por uma rede de interações hidrofóbicas e polares envolvendo as hélices H7, H9 e H10 e o loop entre as hélices H8 e H9 de ambos os receptores [13, 63]. Uma vez que as três isoformas do PPAR são estruturalmente bastante similares, acredita-se que as superfícies de dimerização para as demais isoformas sejam formadas pelas mesmas regiões.

### 2.2.1 O LBD do PPAR $\gamma$

Devido à sua importância na regulação do metabolismo de lipídios, a estrutura do LBD de PPARs tem sido intensivamente estudada ao longo dos anos. Desde a determinação

da primeira estrutura cristalográfica do PPAR $\gamma$  em 1998 [22], diversas estruturas foram determinadas para as três isoformas do PPAR, na presença e na ausência de ligantes, e associados a coativadores ou correpressores. Todas estas estruturas mostraram uma estrutura tridimensional comum aos receptores nucleares: um LBD globular formado por hélices- $\alpha$  e pequenas fitas- $\beta$ . Entretanto, ao contrário dos demais receptores nucleares, o LBD dos PPARs possui uma hélice extra, chamada de hélice H2', localizada entre a primeira fita- $\beta$  e a H3. Além disso, nestes receptores, as hélices H10 e H11 formam uma única hélice.

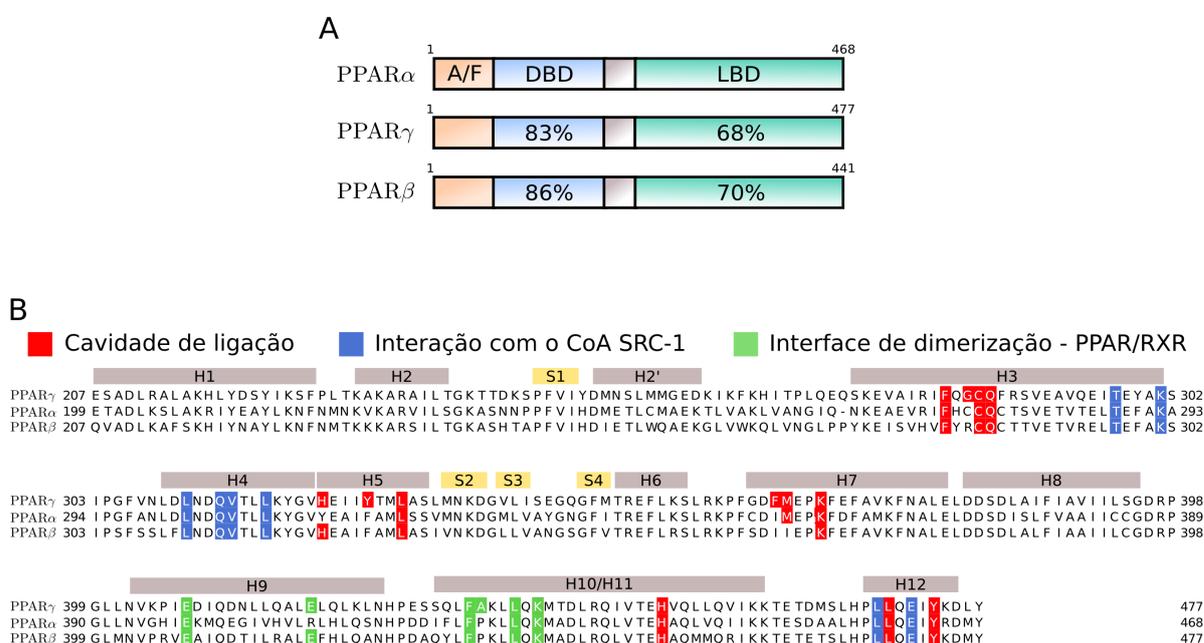


Figura 2.3: (A) Porcentagem de identidade das sequências das três isoformas do PPAR. (B) Alinhamento das sequências dos LBDs do PPAR $\gamma$ , PPAR $\alpha$  e PPAR $\beta$ .

Outra particularidade dos PPARs, em especial do PPAR $\gamma$ , é o volume da sua cavidade de ligação com o ligante (LBP). O sítio de ligação deste receptor é uma cavidade bastante volumosa, com aproximadamente 1400 Å<sup>3</sup>, consideravelmente maior que os LBPs dos demais receptores (Figura 2.4A). O LBP volumoso explica a habilidade do PPAR $\gamma$  de se ligar a uma variedade de ligantes naturais e sintéticos. Além disso, neste receptor,

diferentes ligantes se ligam a regiões distintas da cavidade. De fato, estruturas cristalográficas mostram a presença de até três moléculas de ácidos graxos acomodados no sítio de ligação do PPAR $\gamma$  (Figura 2.4B) [60, 64]

O sítio de ligação do PPAR $\gamma$  é delimitado pelas hélices H2', H3, H4, H5, H7, H10/11 e H12 e pelas fitas- $\beta$  S3 e S4. Esta cavidade é geralmente descrita como um bolsão em forma de “Y”, com cada um dos três braços medindo cerca de 12 Å. (Figura 2.4A). O braço I é o único predominantemente polar. Já os braços II e III são formados principalmente por resíduos apolares. Estas características estão de acordo com a natureza dos ligantes naturais deste receptor. Agonistas do PPAR $\gamma$  são formados geralmente por uma cabeça polar e uma cauda hidrofóbica. Para a maioria dos agonistas, a cabeça polar realiza ligações de hidrogênio com resíduos do braço I, incluindo um resíduo da H12. Já a cauda hidrofóbica pode ocupar as regiões dos braços II e III [55].

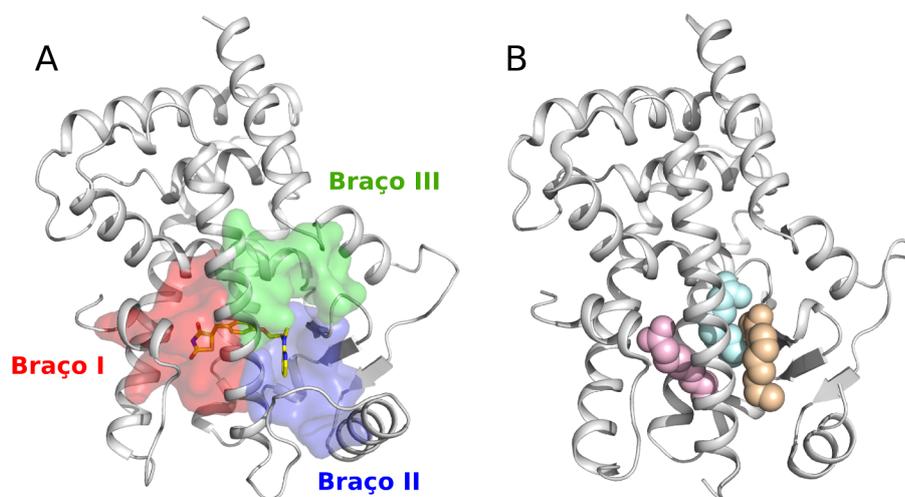


Figura 2.4: (A) Cavidade de ligação do PPAR $\gamma$ : a cavidade de ligação do PPAR $\gamma$  é descrita como um bolsão em forma de “Y”. Os resíduos de cada braço estão representados em cores diferentes. (B) Estruturas cristalográfica do PPAR $\gamma$  ligado a três moléculas de ácidos graxos.

Outra região de destaque na estrutura do PPAR $\gamma$  é o loop entre as hélices H2' e H3, conhecido como  $\Omega$ -loop (Figura 2.5). Nos PPARs, esta região é particularmente longa e

bastante móvel. Em dois trabalhos complementares, Waku et al. demonstraram que a conformação adotada por este loop é sensível ao ligante, sugerindo que esta região pode ser importante na ativação do PPAR $\gamma$  por ácidos graxos [65, 66]. Nestes trabalhos, os autores demonstraram que a ativação do receptor está relacionada com o reposicionamento do  $\Omega$ -loop, saindo de uma conformação aberta para uma conformação fechada, mais próxima da superfície do LBD [65, 66]. Além disso, o fato desta região ser bastante flexível sugere uma via de acesso para os ligantes à cavidade de ligação sem perturbações significativas na estrutura do LBD [67]. A importância deste loop para o mecanismo de dissociação de ligantes será discutida no capítulo 6.

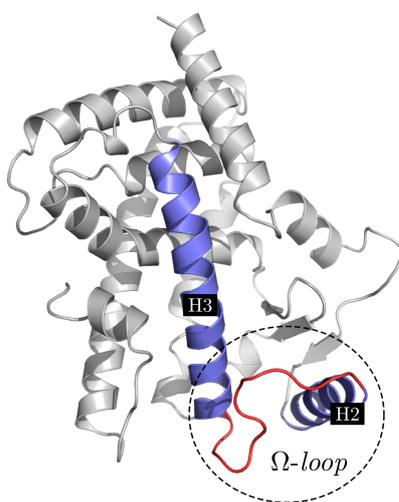


Figura 2.5: Estrutura do PPAR $\gamma$  com destaque para o  $\Omega$ -loop.

## 2.3 Mecanismos de ativação do PPAR $\gamma$

Estruturas cristalográficas revelam poucas diferenças entre as conformações de LBDs do PPAR $\gamma$  na ausência de ligantes e na presença de agonista, sejam parciais ou totais. Em geral, as estruturas deste receptor mostram a H12 sempre na conformação ativa. Nesta conformação, a hélice 12 dobra-se sobre as hélices H3 e H11 formando, juntamente com as hélices H3 e H4, a superfície de interação com proteínas coativadoras. Embora os

modelos cristalográficos forneçam o modo interação de diferentes ligantes com o receptor, pouco dizem sobre seu mecanismo de ativação. A grande similaridade entre as estruturas cristalográficas sugere que além da conformação, a dinâmica dos receptores nucleares seja fundamental para a função destas proteínas.

### 2.3.1 Estabilização do LBD

Estruturas cristalográficas do PPAR $\gamma$  na presença de agonistas totais ou parciais mostram diferenças significativas no modo de interação destes ligantes com o receptor. Agonistas totais, como o Rosiglitazona, realizam sistematicamente interações entre suas cabeças polares (ácido carboxílico ou grupo TZD para os ligantes da família das tiazolidinedionas) e aminoácidos da região AF-2, como mostrado na figura 2.6. Em especial, estes ligantes realizam contato direto com a H12 através de uma ligação de hidrogênio com o resíduo Tyr473. Esta interação é capaz de estabilizar a hélice 12 na conformação ativa e possui papel determinante para a ativação completa do PPAR $\gamma$  [6, 55]. Por outro lado, estruturas cristalográficas do PPAR $\gamma$  ligado a agonistas parciais mostram que estes ocupam uma região distinta do sítio de ligação daquela observada para agonistas totais (Figura 2.7). Dessa forma, agonistas parciais não realizam contato direto com a H12 e, portanto, sua atividade transcricional não esta associada com estabilização desta hélice.

A comparação entre o modo de ligação de agonistas totais e parciais sugere uma relação direta entre o grau de ativação do receptor e a estabilização de regiões específicas da proteína [58]. De fato, esta relação foi comprovada por diferentes trabalhos utilizando RMN [31, 32, 68], troca H/D (HDX, *Hydrogen/Deuterium exchange*) [32, 58] e anisotropia de fluorescência [30]. Estudos de RMN mostram que a cavidade de ligação, a H12 e a superfície AF-2 do LBD do PPAR $\gamma$  são conformacionalmente dinâmicas na ausência de ligantes [31, 32]. Além disso, estas regiões exibem uma rápida troca em experimentos de HDX [32]. Por outra lado, agonistas totais, como a Rosiglitazona, promovem uma

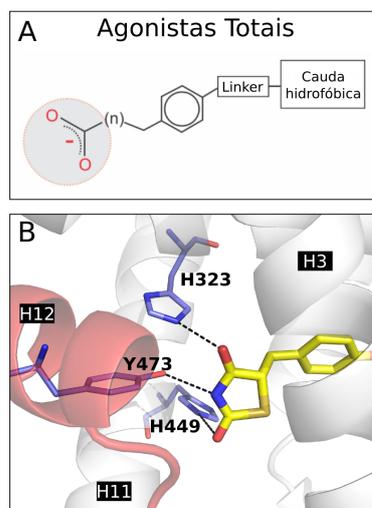


Figura 2.6: (A) Estrutura comum aos agonistas totais do PPAR $\gamma$ . Para moléculas da classe das TZDs, o ácido carboxílico é substituído pelo grupo TZD. (B) Modo de ligação da Rosiglitazona, mostrando as ligações de hidrogênio entre o ligante e resíduos da região AF-2.

estabilização robusta do LBD, e especialmente da H12. Já agonistas com atividade parcial, como o MRL20 e o MRL24, estabilizam parcialmente o LBD, de acordo com seu grau de ativação. Estes ligantes estabilizam em particular a hélice 3 e as fitas- $\beta$ .

Além do mecanismo clássico de ativação (dependente do ligante), o PPAR $\gamma$  é regulado também por modificações pós traducionais, como fosforilação, ubiquitinação e acetilação. Como discutido no início deste capítulo, a fosforilação do PPAR $\gamma$  ganhou destaque recentemente por ser uma via alternativa de regulação, promovendo somente a atividade anti-diabética do receptor. No PPAR $\gamma$ , dois sítios de fosforilação foram identificados. O primeiro, localiza-se na Ser84 do domínio N-terminal. A fosforilação desta serina está associada com a regulação do recrutamento de proteínas correguladoras. O segundo sítio de fosforilação está localizado na Ser245. Esta serina encontra-se no domínio de ligação com o ligante e é fosforilada pela proteína quinase Cdk5. Entretanto, as bases moleculares da ativação do PPAR $\gamma$  devido a fosforilação pela Cdk5 ainda são pouco compreendidas [71–73].

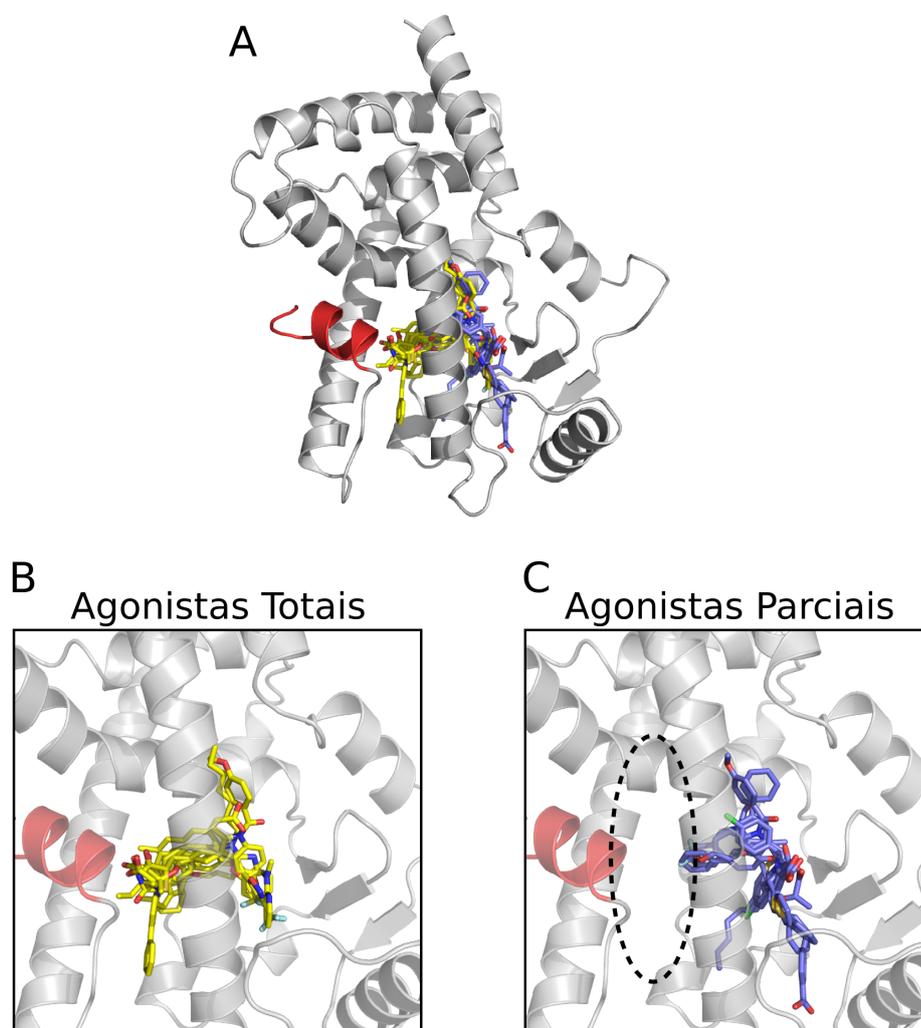


Figura 2.7: Sobreposição de diferentes agonistas na cavidade de ligação do PPAR $\gamma$ : em amarelo estão representados agonistas totais e em azul, agonistas parciais. (Agonistas totais: PDB 2PRG [22], 1FM9 [63], 2ATH [58], 2I4J [58], 2Q59 [58] e 3B3K [69]. Agonistas parciais: 4PRG [70], 2Q5P [58], 2Q5S [58], 2Q6R [58], 2Q61 [58] e 3D6D [69]). (B) Ampliação do sítio de ligação na presença de agonistas totais. (C) Ampliação do sítio de ligação na presença de agonistas parciais. Estes ocupam uma região alternativa, não interagindo diretamente com a H12. Adaptado de [66].

### 2.3.2 O PPAR $\gamma$ e as proteínas correguladoras

A regulação da atividade transcricional dos receptores nucleares se dá não somente através da interação com os ligantes, mas também pela interação com coativadores e correpressores. Utilizando anisotropia de fluorescência estacionária, Tamrazi et al. demonstraram que tanto a interação com ligantes quanto com coativadores estabilizam a estrutura do LBD, tornando-o mais resistente à proteólise. Além disso, os autores mostraram que proteínas coativadoras induzem o LBD a assumir a conformação ativa, mesmo na ausência de ligantes [74]. Estes resultados sugerem que, assim como os ligantes, proteínas correguladoras afetam o equilíbrio conformacional do LBD. Um dos objetivos desta tese foi verificar o papel dos correguladores no equilíbrio conformacional da H12 do PPAR $\gamma$ . Desta forma, entender as diferenças estruturais relacionadas à interação com os correguladores é fundamental para o entendimento deste equilíbrio. Nesta seção serão descritos os aspectos estruturais dos modelos experimentais de PPARs ligados ao coativador e ao correpressor, utilizados neste trabalho.

A estrutura cristalográfica do complexo PPAR $\gamma$ +CoA+Rosiglitazona (PDB: 2PRG) mostra que a superfície hidrofóbica do peptídeo coativador SRC-1 interage com um bolsão hidrofóbico do receptor formado pelas hélices H3, H4 e H12 (Figuras 2.8A-B). Esta superfície de interação é formada pelos resíduos Thr297 e Lys301, da H3, Leu311, Gln314, Val315 e Leu 318 da H4 e Leu468 e Glu471 da H12. A área total da superfície de interação entre o motivo LxxLL do coativador e o PPAR $\gamma$  é de aproximadamente 800 Å<sup>2</sup>. Além das interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio entre as cadeias laterais dos resíduos Lys301 e Glu471 e a cadeia principal do CoA são formadas. Estas interações são conhecidas como “grampos de carga” e, como descrito no capítulo anterior, são fundamentais para a estabilização do complexo PPAR $\gamma$ +CoA [22].

O modo de interação entre PPARs e correpressores tem sido estudado através da estrutura cristalográfica do complexo do receptor PPAR $\alpha$  ligado ao peptídeo correpressor

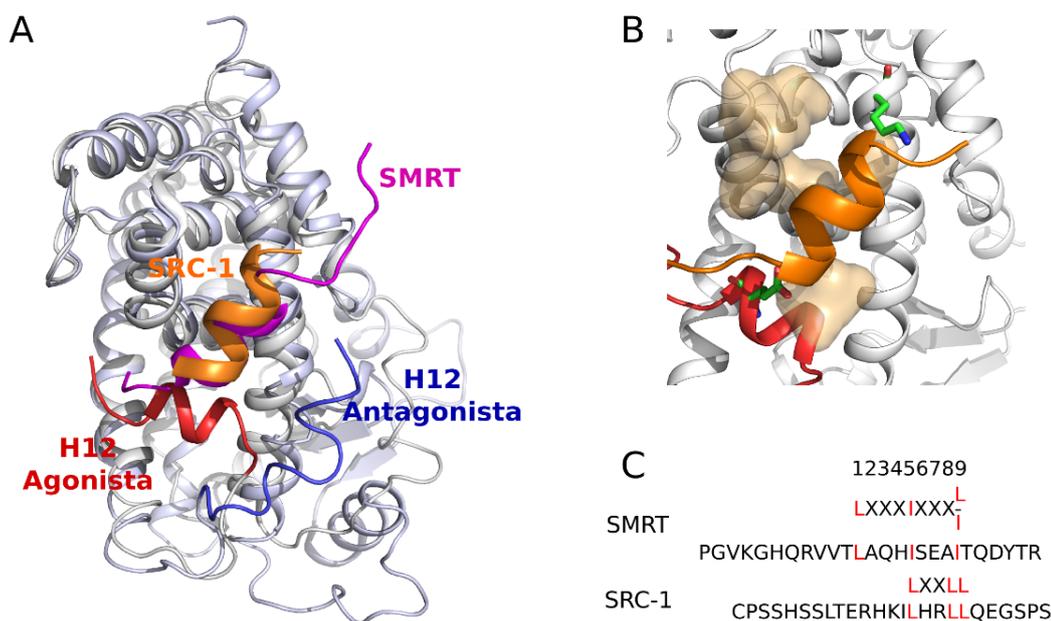


Figura 2.8: (A) Sobreposição das estruturas cristalográficas do PPAR $\gamma$  ligado ao coativador SRC-1 (PDB 2PRG) e do PPAR $\alpha$  na presença do correpessor SMRT (PDB 1KKQ). (B) Detalhe da superfície de interação entre o PPAR $\gamma$  e o CoA. Os resíduos Lys301 e Glu471 que formam o grupo de carga estão coloridos em verde. (C) Comparação das seqüências do coativador e do correpessor.

SMRT e ao antagonista GW6471. Até o momento, não existem modelos experimentais para o PPAR $\gamma$  ligado a correpessores. Entretanto, uma vez que os resíduos envolvidos na interação com correguladores são bastante conservados (como mostrado na figura 2.3B), acredita-se que o modo de ligação seja bastante similar para as três isoformas do PPAR. A estrutura cristalográfica do PPAR $\alpha$  na presença do correpessor SMRT exibe a H12 parcialmente desenovelada e dobrada sobre a hélice H3. Esta conformação, mostrada na figura 2.8A, será chamada de conformação antagonista ao longo desta tese. Embora coativadores e correpessores ocupem a mesma superfície de interação com o PPAR, existem diferenças importante nos seus modos de ligação. O rearranjo da H12 na conformação antagonista resulta em uma maior superfície de interação, necessária para acomodar a volta extra do motivo LxxxIxxxL do correpessor. Além disso, a hélice do correpessor ancora-se no PPAR $\gamma$  através de ligações de hidrogênio com o resíduo Lys292 da hélice 3. Ao

---

comparar as estruturas cristalográficas do PPAR $\alpha$  ligado ao coativador e ao correpressor nota-se que os resíduos de Ile e Ala das posições +5 e +8 do motivo LxxxIxxxL do correpressor correspondem aos primeiros resíduos de Leucina no motivo LxxLL do coativador (Figura 2.8C). A presença das Leucinas, com cadeias laterais mais volumosas, impedem que o coativador se ligue fortemente ao LBD quando a H12 encontra-se na conformação antagonista [75]. Estas diferenças explicam a preferência pelo correpressor em relação ao coativador na presença de antagonistas.

## Capítulo 3

# Dinâmica Molecular de Proteínas

A estrutura tridimensional das proteínas está diretamente relacionada com a função que elas desempenham. Dentre as técnicas experimentais para a determinação de estruturas de proteínas destacam-se a cristalografia por difração de raios-X e a ressonância magnética nuclear. Entretanto, a apreciação completa de como estas macromoléculas funcionam requer a conexão entre as suas características estruturais, obtidas experimentalmente, e sua dinâmica. O estudo da dinâmica de proteínas por técnicas experimentais muitas vezes é limitado. A cristalografia de raios-X fornece uma conformação favorecida pelo ambiente cristalino. Já experimentos de RMN, embora forneçam um conjunto de conformações, tem sua aplicação limitada ao tamanho das proteínas [76].

Simulações de dinâmica molecular fornecem a ligação entre a estrutura e a dinâmica de proteínas. A dinâmica molecular é capaz de descrever em detalhes o movimento de partículas em função do tempo. Assim, pode ser utilizada para estudar o comportamento dinâmico de macromoléculas. Naturalmente, técnicas experimentais possuem papel fundamental na validação das simulações: comparações entre simulações e dados experimentais servem para avaliar a precisão dos resultados calculados, além de contribuir para a melhoria da metodologia [77].

Neste capítulo serão apresentados alguns conceitos fundamentais das simulações de dinâmica molecular e também do método ABF, utilizado para a determinação do perfil energético do PPAR $\gamma$ .

## 3.1 Simulações de dinâmica molecular

As primeiras simulações de dinâmica molecular foram descritas por Alder e Wainwright em 1957 para o estudo da interação de esferas rígidas [78]. Embora esse trabalho tenha utilizado um modelo bastante simples, serviu como base para o estudo de gases e líquidos simples [79]. Vinte anos depois, a primeira simulação de dinâmica molecular de uma macromolécula biológica foi publicada [80]. Nesse trabalho, o inibidor da tripsina pancreática bovina foi estudado em vácuo e foi gerada uma trajetória de apenas 9,2 ps. Como resultado desse trabalho, a antiga visão de proteínas como estruturas rígidas foi substituída por uma visão onde proteínas são sistemas dinâmicos cujo movimento interno é essencial para a sua função. Durante os anos seguintes uma grande diversidade de trabalhos envolvendo a dinâmica de proteínas foi realizada. A maioria desses estudos tiveram como foco os aspectos físicos dos movimentos internos dessas macromoléculas e a interpretação de resultados experimentais [77].

Simulações de dinâmica molecular (MD) baseiam-se na determinação do movimento dos átomos que constituem um sistema a partir do conhecimento de uma configuração inicial, dos potenciais de interação e das equações de movimentos. Dessa forma, a dinâmica molecular permite, em princípio, explorar o espaço de fases do sistema e obter as propriedades termodinâmicas de interesse. O esquema da figura 3.1 resume os principais passos envolvidos em uma simulação de dinâmica molecular. Nas seções seguintes será apresentada uma visão geral das etapas consideradas fundamentais para a realização de simulações de MD.

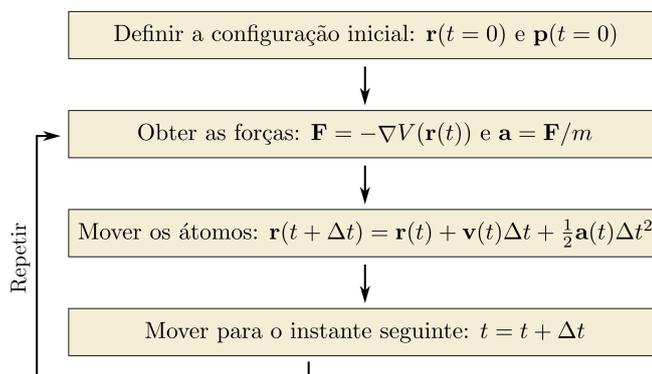


Figura 3.1: Etapas de uma simulação de dinâmica molecular. Figura adaptada de [81]

### 3.1.1 Configurações e velocidades iniciais

A primeira etapa em uma simulação de dinâmica molecular é a definição da configuração inicial a partir da qual o sistema irá evoluir temporalmente, ou seja, a definição do conjunto de coordenadas e velocidades iniciais para cada átomo do sistema.

Para sistemas complexos, como soluções proteicas, a configuração inicial pode ser obtida a partir de técnicas experimentais como difração de raio-X ou ressonância magnética nuclear, ou a partir de modelos teóricos, como modelos gerados por estudos de homologia [82]. No banco de dados Protein Data Bank (PDB) é possível encontrar as coordenadas atômicas da estrutura tridimensional de diversas moléculas biológicas. Entretanto, muitas vezes, as estruturas depositadas apresentam alguns defeitos, como a falta de loops ou de parte de cadeias laterais de aminoácidos. Para a realização das simulações de dinâmica molecular de proteínas, esses problemas na estrutura terciária devem ser corrigidos. Os loops e as cadeias laterais ausentes podem ser obtidos a partir da comparação com a estrutura de uma proteína homóloga à de interesse. Além disso, as coordenadas dos átomos de hidrogênio não podem ser obtidas por difração de raio-X, devido sua baixa densidade eletrônica, assim, esses devem ser adicionadas de acordo com a geometria de cada resíduo (comprimento de ligação, ângulos e diedros). Por fim, para completar a caixa de simula-

ção, moléculas de água e contra-íons são adicionados, de modo a reproduzir a densidade e a concentração iônica da solução fisiológica e de garantir a neutralidade de cargas do sistema.

As simulações de MD requerem, além das coordenadas iniciais, as velocidades iniciais para cada átomo do sistema. As velocidades iniciais costumam ser atribuídas aleatoriamente através da distribuição de Maxwell-Boltzmann para uma dada temperatura, de acordo com a equação:

$$p(v_{ix}) = \left( \frac{m_i}{2\pi k_B T} \right)^{1/2} \exp \left[ -\frac{1}{2} \frac{m_i v_{ix}^2}{k_B T} \right] \quad (3.1)$$

onde  $p(v_{ix})$  é a probabilidade de um átomo  $i$  com massa  $m_i$  ter velocidade  $v_{ix}$  na direção  $x$  e na temperatura  $T$ . É importante que as velocidades sejam definidas de tal forma que o momento linear total seja nulo para que o centro de massa do sistema não sofra translação durante a simulação.

### 3.1.2 Potenciais de interação

A etapa seguinte nas simulações de dinâmica molecular consiste na determinação das forças que atuam sobre cada átomo do sistema resultantes das interações intra e intermoleculares. Em princípio, a descrição do movimento e das interações entre partículas pode ser obtida através da resolução da equação de Schroedinger dependente do tempo, que fornece a probabilidade de encontrar a partícula em uma posição  $\mathbf{x}$  no instante de tempo  $t$ :

$$-\frac{\hbar}{2m} \nabla^2 \Psi(\mathbf{x}, t) + V(\mathbf{x}, t) \Psi(\mathbf{x}, t) = i\hbar \frac{\partial \Psi(\mathbf{x}, t)}{\partial t} \quad (3.2)$$

Entretanto, a resolução desta equação é inviável computacionalmente para sistemas complexos, como sistemas biológicos. Assim, problemas dessa escala são geralmente trata-

dos por modelos físicos baseados em potenciais clássicos. O conjunto de funções empíricas que descrevem a energia potencial do sistema é conhecido como campo de força. Embora os campos de força ignorem os movimentos eletrônicos e o cálculo da energia do sistema seja função somente da posição dos núcleos atômicos, as contribuições eletrônicas estão implicitamente representadas nos parâmetros que compõem os potenciais.

Diversos potenciais clássicos foram desenvolvidos e são utilizados com sucesso em simulações de proteínas. Dentre eles, destacam-se os campos de força CHARMM [83, 84], OPLS [85], AMBER [86] e GROMOS [87]. Estes potenciais descrevem as interações entre diferentes átomos como a soma de interações entre pares de átomos ligados ( $V^{intra}$ ) e não ligados ( $V^{inter}$ ) covalentemente. A forma geral desses campos de força segue a seguinte equação:

$$V^{total} = V^{intra} + V^{inter} \quad (3.3)$$

onde

$$V^{intra} = \underbrace{\frac{1}{2} \sum_{est} k_b (r - r_0)^2}_{V^{est}} + \underbrace{\frac{1}{2} \sum_{ang} k_\theta (\theta - \theta_0)^2}_{V^{ang}} + \underbrace{\frac{1}{2} \sum_{n,died} k_\varphi [1 + \cos(n\varphi - \delta)]}_{V^{died}} \quad (3.4)$$

e

$$V^{inter} = \underbrace{\sum_{i,j} 4\varepsilon_{ij} \left[ \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right]}_{V^{LJ}} + \underbrace{\sum_{i,j} \frac{q_i q_j}{4\pi\varepsilon_0 r_{ij}}}_{V^{elec}} \quad (3.5)$$

Os termos da equação 3.4 descrevem as penalidades energéticas atribuídas às deformações entre átomos próximos em uma sequência de ligações covalentes. Esses termos correspondem ao estiramento de ligações, a deformação angular e a rotação diedral. Os dois primeiros termos são descritos por potenciais harmônicos, como se os átomos fossem massas pontuais conectadas por molas, cujas constantes de força ( $k_b$  e  $k_\theta$ ) representam a rigidez da geometria molecular. Já o potencial diedral ( $V^{died}$ ), que descreve a energia as-

sociada a rotação em torno de uma ligação é modelado por uma soma de cossenos. Nesta função, a constante  $k_\varphi$  está relacionada com a altura da barreira energética associada à torção, a multiplicidade  $n$  define o número de mínimos de energia, e o ângulo de fase  $\delta$  determina a localização desses mínimos.

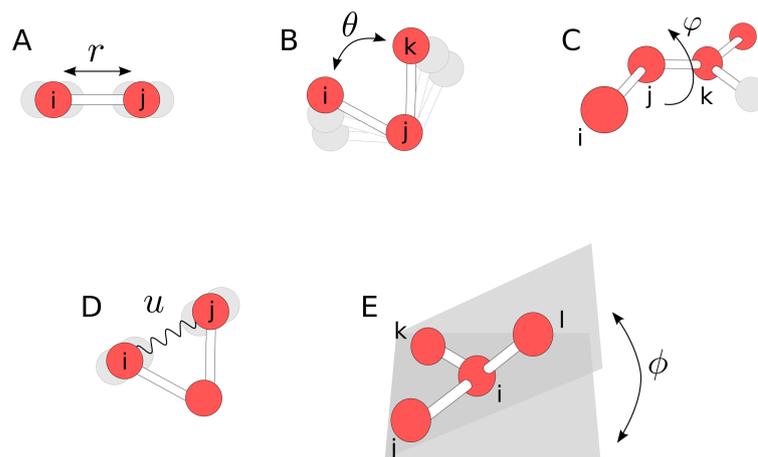


Figura 3.2: Parâmetros geométricos utilizados no campo de força CHARMM para modelar as interações entre átomos ligados covalentemente: (A) Estiramento das ligações químicas. (B) Deformação angular. (C) Deformação diedral. (D) Potencial de Urey-Bradley. (E) Deformação de diedros impróprios.

Além dos termos da equação 3.4, no campo de força CHARMM (utilizado neste trabalho), as interações entre átomos ligados covalentemente são modeladas por dois termos adicionais: o potencial de Urey-Bradley e as torções impróprias. O potencial de Urey-Bradley é um termo cruzado entre dois átomos separados por duas ligações, utilizado para restringir o movimento dos átomos que formam tais ligações (Figura 3.2D). Já as torções impróprias descrevem distorções fora do plano e são utilizadas para manter a planaridade de certas moléculas. Ambos são descritos por potências harmônicas e possuem as seguintes formas:

$$V_{UB} = k_{UB}(u - u_0)^2 \quad (3.6)$$

$$V_{improp} = k_{improp}(\phi - \phi_0)^2 \quad (3.7)$$

onde  $u$  é a distância entre os átomos  $i$  e  $j$ ,  $u_0$  a distância de equilíbrio (Figura 3.2D),  $\phi$  o ângulo entre os planos e  $\phi_0$  o ângulo de equilíbrio (Figura 3.2E).

As interações entre pares de átomos não ligados são descritas pela soma dos potenciais de Lennard-Jones ( $V^{LJ}$ ) e de Coulomb ( $V^{elec}$ ), como mostrado na equação 3.5. O potencial de Lennard-Jones é composto de um termo atrativo que varia com  $r^{-6}$  e um termo repulsivo, proporcional a  $r^{-12}$ . O termo atrativo decai rapidamente com a distância e está associado às interações atrativas de Van der Waals. Já o termo repulsivo representa a forte repulsão de curto alcance provocada pela sobreposição das nuvens eletrônicas de dois átomos, de acordo com o princípio de Exclusão de Pauli. A combinação desses termos faz com que o potencial de Lennard-Jones assuma a forma de um poço de potencial, como mostrado na figura 3.3. O segundo termo da equação 3.5 ( $V^{elec}$ ) descreve as interações eletrostáticas entre o par de átomos  $i$  e  $j$ , com cargas parciais  $q_i$  e  $q_j$ , respectivamente. Uma vez que o potencial de Coulomb é proporcional a  $r^{-1}$ , seu decaimento é lento e portanto, dá origem a interações de maior alcance que as interações de Lennard-Jones.

Todos os parâmetros utilizados nestes potenciais, como constantes de força, posições de equilíbrio e cargas parciais são determinados de forma a reproduzir propriedades do sistema de estudo e são obtidos através de métodos experimentais (como técnicas espectroscópicas) ou de cálculos quânticos. O processo de obtenção desses parâmetros é conhecido como parametrização e varia de acordo com o campo de força.

### 3.1.3 Equações de movimento

Uma vez geradas as configurações iniciais e definidos os potenciais de interação, é possível calcular as forças que atuam sobre cada partícula:  $\mathbf{F}_i(t) = -\nabla V^{total}(t)$ . Conhecidas as forças atuando sobre cada átomo em um dado instante de tempo,  $t$ , as acelerações são

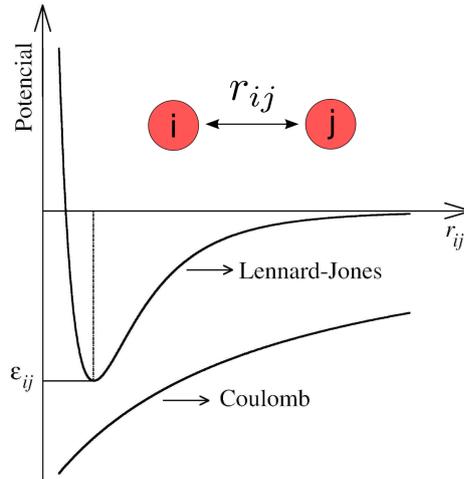


Figura 3.3: Representação gráfica dos potenciais de Lennard-Jones e de Coulomb. Enquanto o potencial de Coulomb decai lentamente, o potencial de Lennard-Jones é de curto alcance e tem a forma de um poço de potencial, por ser formado pela combinação de um termo repulsivo e um atrativo.

determinadas através da Segunda Lei de Newton:

$$\mathbf{F}_i(t) = -\nabla V^{total}(t) = m_i \mathbf{a}_i(t) \quad (3.8)$$

Definidos o conjunto de coordenadas ( $\mathbf{r}_i(t)$ ), velocidades ( $\mathbf{v}_i(t)$ ) e acelerações ( $\mathbf{a}_i(t)$ ) iniciais para cada partícula, é possível determinar as configurações no instante seguinte,  $t + \delta t$ . Entretanto, em uma simulação, a força atuante em um átomo está constantemente variando em resposta ao seu próprio movimento e ao movimentos dos demais átomos do sistema. Ou seja, os movimentos das partículas estão acoplados, o que caracteriza um problema de muitos corpos, o qual não pode ser resolvido analiticamente. Dessa forma, as equações de movimentos são resolvidas utilizando métodos de diferenças finitas.

Existem vários algoritmos de integração das equações de movimento baseados em métodos de diferenças finita, muitos dos quais são comumente utilizados em simulações de dinâmica molecular. Estes assumem que a integração pode ser dividida em uma série

de pequenos estágios, separados por um intervalo de tempo fixo  $\delta t$  e que as posições, velocidades e acelerações podem ser expandidas como séries de Taylor:

$$\mathbf{r}(t + \delta t) = \mathbf{r}(t) + \delta t \mathbf{v}(t) + \frac{1}{2} \delta t^2 \mathbf{a}(t) + \frac{1}{6} \delta t^3 \mathbf{b}(t) + \dots \quad (3.9)$$

$$\mathbf{v}(t + \delta t) = \mathbf{v}(t) + \delta t \mathbf{a}(t) + \frac{1}{2} \delta t^2 \mathbf{b}(t) + \frac{1}{6} \delta t^3 \mathbf{c}(t) + \dots \quad (3.10)$$

$$\mathbf{a}(t + \delta t) = \mathbf{a}(t) + \delta t \mathbf{b}(t) + \frac{1}{2} \delta t^2 \mathbf{c}(t) + \frac{1}{6} \delta t^3 \mathbf{d}(t) + \dots \quad (3.11)$$

onde  $\mathbf{v}$  é a velocidade (ou a primeira derivada da posição em relação ao tempo)  $\mathbf{a}$  é a aceleração (ou segunda derivada),  $\mathbf{b}$  é a terceira derivada e assim por diante. Um dos métodos de integração mais utilizados em MD é o algoritmo *Velocity-Verlet*. Esse algoritmo consiste no cálculo das posições e velocidades utilizando três etapas. Na primeira etapa, as posições nos instante  $t + \delta t$  e as velocidades em  $t + \frac{1}{2} \delta t$  são calculadas segundo as equações:

$$\mathbf{r}(t + \delta t) = \mathbf{r}(t) + \delta t \mathbf{v}(t) + \frac{1}{2} \delta t^2 \mathbf{a}(t) \quad (3.12)$$

$$\mathbf{v}\left(t + \frac{1}{2} \delta t\right) = \mathbf{v}(t) + \frac{1}{2} \delta t^2 \mathbf{a}(t) \quad (3.13)$$

Uma vez conhecidas as novas coordenadas, novas acelerações,  $\mathbf{a}(t + \delta t)$ , são calculadas. Por fim, as velocidades em  $t + \delta t$  são determinadas utilizando a equação 3.14, completando o ciclo. Essa implementação é utilizada para que somente um vetor de velocidades seja armazenado por passo de simulação.

$$\mathbf{v}(t + \delta t) = \mathbf{v} \left( t + \frac{1}{2}\delta t \right) + \frac{1}{2}\delta t[\mathbf{a}(t + \delta t)] \quad (3.14)$$

Além da truncagem da expansão de Taylor, outra aproximação dos métodos de integração é o fato de que tanto as velocidades quanto as acelerações são consideradas constantes durante o passo de integração ( $\delta t$ ). Esses erros são reduzidos com a redução de  $\delta t$ . Entretanto, quanto menor o passo de integração, maior será o custo computacional para que o sistema explore satisfatoriamente o espaço de fases (Figura 3.4A). Por outro lado, um passo de integração grande resulta em instabilidades, o que costuma levar a interrupção da simulação (Figura 3.4B). Com um passo de integração adequado, instabilidades provocadas pelo aumento do termo repulsivo do potencial de Lennard-Jones são suavizadas e o espaço de fases pode ser amostrado eficientemente com um menor custo computacional (Figura 3.4C).

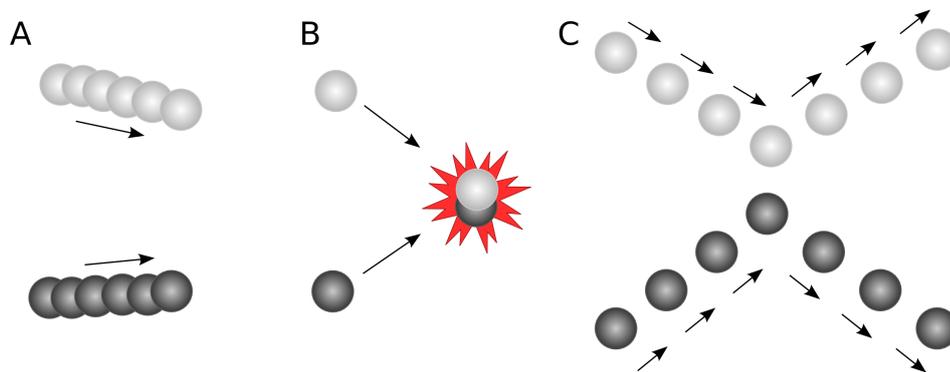


Figura 3.4: Efeito da escolha do passo de integração: (A) Com um passo de integração muito pequeno, o espaço de fase é amostrado lentamente. (B) Um passo de integração muito grande resulta em instabilidades. (C) Com um passo de integração apropriado, o espaço de fases é amostrado eficientemente e instabilidades são suavizadas. Figura adaptada de [82].

### 3.1.4 Ensembles

Um ensemble é o conjunto de todos os estados microscópicos distintos consistentes com um estado macroscópico ou termodinâmico. A escolha das condições termodinâmicas deve ser realizada de acordo com as propriedades que se deseja calcular. Durante uma simulação, é possível manter constante alguns parâmetros termodinâmicos, como o número de partículas (N), a temperatura (T), a energia (E), a pressão (P) e o volume (V). A escolha de quais parâmetros serão mantidos fixos define diferentes ensembles.

A integração das equações de movimento segundo as equações 3.12 e 3.14 é suficiente apenas para gerar configurações do ensemble micro-canônico (ou NVE). Uma simulação nesse ensemble corresponde a um sistema isolado, sem troca de calor com o meio externo, ou seja, um processo adiabático totalmente reversível. Entretanto, a maioria dos processos químicos e biológicos normalmente são estudados a temperatura e volume constantes (ensemble NVT ou canônico) e, principalmente, a temperatura e pressão constantes (ensemble NPT ou isotérmico-isobárico). Assim, é desejável reproduzir estas condições nas simulações de dinâmicas molecular. Existem vários algoritmos para o controle da temperatura e pressão, dentre os quais destacam-se os métodos de Berendsen, Nóse-Hoover e Langevin [88]

Todas as simulações descritas nesta tese foram realizadas no ensemble NPT. Para o controle da temperatura foi utilizada a dinâmica de Langevin, implementada no software NAMD [89]. Esse método consiste em adicionar forças de fricção e randômicas ao sistema. Assim, a equação de movimento para cada átomo mostrada na 3.8 assume a seguinte forma:

$$m_i \vec{a}_i = -\nabla V(r) - m_i \gamma \vec{v}_i + R_i(t) \quad (3.15)$$

onde  $\gamma$  é o coeficiente de fricção e  $R_i(t)$  a força aleatória adicionada ao sistema. Essas

forças representam um banho térmico ao qual o sistema é acoplado. A intensidade do acoplamento é proporcional ao coeficiente de fricção  $\gamma$  [82].

Em um sistema macroscópico, a pressão é mantida constante através de alteração do volume. Da mesma forma, uma simulação no ensemble isotérmico-isobárico mantém a pressão constante alterando o volume da caixa de simulação. Para o controle de pressão, está implementado no NAMD um método que é uma combinação do método de Nosé-Hoover com a dinâmica de Langevin [90]. O método de Hoover é baseado na adição de um grau de liberdade extra, que realiza o papel de um pistão externo acoplado ao sistema. O volume, que pode variar durante a simulação, atua como esse grau de liberdade adicional. A dinâmica de Langevin é utilizada para controlar as flutuações no barostato, ou seja, à equação de movimento do pistão são adicionados um termo de fricção e uma força aleatória. Esses termos amortecem o movimento do pistão, que no método de Hoover, está completamente livre para oscilar [91].

### 3.1.5 Etapas preliminares

#### Minimização

Antes de iniciar a simulação de dinâmica molecular de uma proteína, é necessária uma etapa preliminar de minimização de energia, onde as coordenadas de cada partícula são variadas sistematicamente na direção que minimiza a energia potencial do sistema. O objetivo da etapa de minimização não é a determinação da estrutura referente ao mínimo global. Métodos de minimização de energia são utilizados para eliminar “maus contatos” e tensões locais na estrutura. Existem diversos métodos de minimização disponíveis, sendo os mais utilizados em simulações de sistemas biológicos o Método dos Gradientes Conjugados e o algoritmo *Steepest Descent* [88].

## Equilibração

Os instantes iniciais da dinâmica molecular são geralmente reservados para a relaxação ou equilibração do sistema. O objetivo da etapa de relaxação é permitir que o sistema evolua a partir da configuração inicial para atingir o equilíbrio. A equilibração deve ocorrer até que um conjunto de propriedades termodinâmicas, como energia, temperatura e pressão, tornem-se compatíveis com as condições de interesse. Quando as condições termodinâmicas desejadas são atingidas, iniciam-se as simulações de produção, que serão utilizadas para as análises. A etapa de produção será tão extensa quanto for necessário para estudar as propriedades de interesse, tendo em vista as escalas de tempo em que os processos de interesse ocorrem.

## 3.2 Cálculos teóricos de diferenças de energia livre

Proteínas são macromoléculas com milhares de graus de liberdade, compostas por partes móveis, que funcionam em conjunto para realizar uma ampla gama de funções fisiológicas. A teoria que descreve a dinâmica molecular de proteínas é chamada de Teoria da Paisagem Energética [92]. A paisagem energética de uma proteína é descrita geralmente como um “funil rugoso”, onde cada ponto da superfície representa uma conformação possível para a proteína. Assim, esse modelo fornece uma descrição qualitativa do espaço conformacional da proteína, incluindo o estado nativo enovelado (considerado como o estado de menor energia), conjuntos de conformações similares ou distantes do estado nativo, estados desenovelados e estados intermediários do processo de enovelamento (Figura 3.5A). Mesmo no seu estado nativo, a superfície de energia das proteínas apresenta diversos mínimos, separados por barreiras energéticas de alturas variadas (Figura 3.5B). A rugosidade na paisagem energética é justamente o que torna possível uma proteína assumir diferentes conformações, que embora sejam estruturalmente distintas, possuem

energias próximas, se comparada com a energia das flutuações térmicas. A transição entre esses mínimos, ou seja, o “navegar” da estrutura sobre sua superfície de energia ao longo do tempo, é o que caracteriza a dinâmica de uma proteína [93]

A dinâmica das proteínas é formada por dois componentes que em conjunto definem a forma da paisagem energética: um componente termodinâmico e um componente cinético. O fator termodinâmico define as probabilidades relativas das conformações. Já o fator cinético descreve as taxas de transições entre elas. Estas características estão exemplificadas na figura 3.5B. O perfil de energia de uma proteína enovelada é formada por diferentes mínimos de energia. Cada mínimo na superfície de energia define um conjunto de conformações. Conformações de transição localizam-se no máximos entre os poços de energia. A população de cada conjunto de conformações é definida pelas distribuições de Boltzmann com base na diferença de energia livre ( $\Delta G$ ) entre os mínimos. Transições do tipo 1 (Figura 3.5B) são raras, uma vez que a barreira energética entre as conformações é alta. Estas transições geralmente envolvem movimentos coletivos de grande escala e ocorrem em escalas de tempo de  $\mu\text{s}$  a  $\text{ms}$ . Já as transições 2 e 3 ocorrem em escalas de tempo menores ( $\text{ps}$  a  $\text{ns}$ ), devido à baixa barreira energética entre os estados e são caracterizadas por flutuações locais em torno das conformações de mínimo. Além disso, a paisagem energética é dinâmica. Mudanças no sistema, como alterações nas condições físicas (temperatura, pressão,  $\text{pH}$ , etc) ou funcionais (associação com um ligante, mutações, etc) alteram a forma da superfície de energia, modificando o equilíbrio conformacional (alteração da curva preta para a curva cinza na figura 3.5B) [94].

Para descrever em detalhes as superfícies de energia livre de proteínas, ou seja, o números de mínimos de energia, a população relativa entre os estados, a altura das barreiras energéticas que os separam e como esse perfil se altera devido as condições físicas e funcionais são necessários métodos capazes de fornecer um conjunto de conformações representativas do sistema de interesse. Simulações de dinâmica geralmente são descritos como um método de amostragem para o estudo de alterações conformacionais em

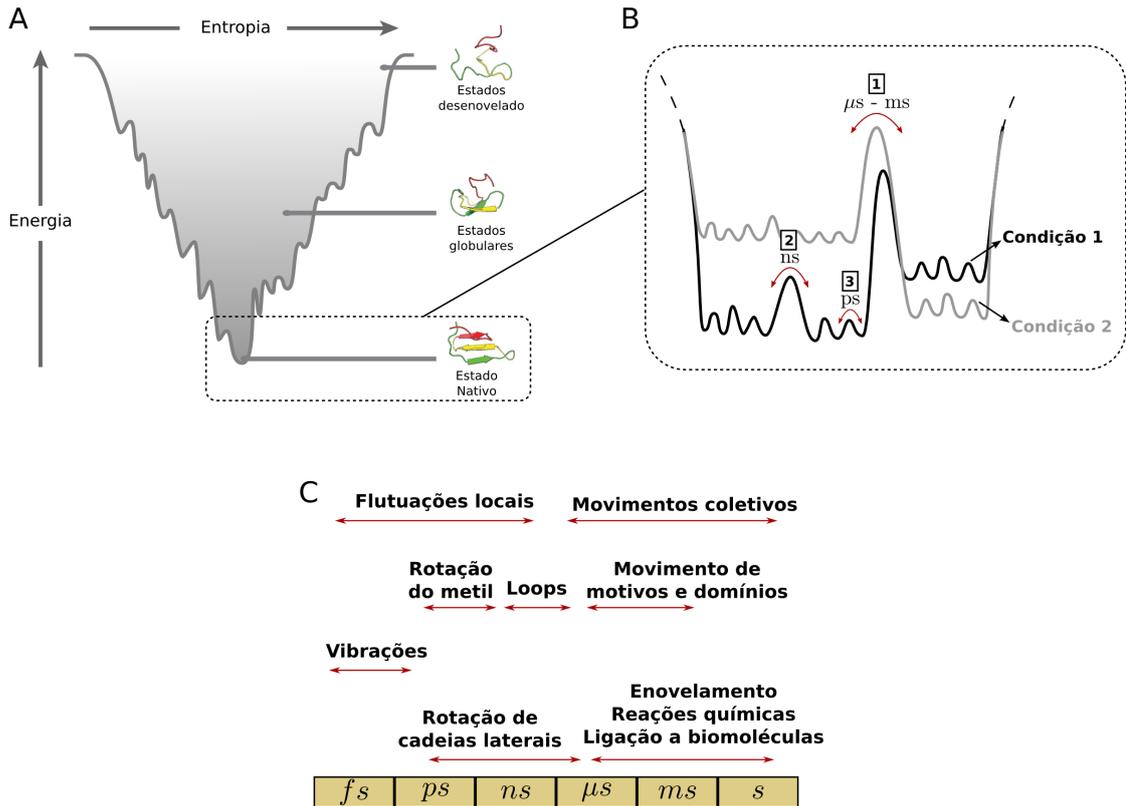


Figura 3.5: (A) Esquema da superfície de energia livre ou paisagem energética de proteínas. (B) Ampliação da região da superfície de energia livre contendo os estados enovelados. Diferentes níveis de energia estão envolvidos com movimentos em diferentes escalas de tempo. (C) Escala de tempo dos principais tipos de movimentos em proteínas. Figura adaptada de [94].

biomoléculas. Entretanto, como mostrado na figura 3.5B proteínas apresentam uma superfície de energia livre rugosa, com múltiplos mínimos locais, muitas vezes separados por altas barreiras energéticas. Estas características dificultam a transição entre estados fisicamente importantes, levando a uma amostragem incompleta e, conseqüentemente, a uma caracterização pobre do comportamento dinâmico da proteína. A amostragem de processos que envolvem alterações conformacionais geralmente está acima da capacidade de simulações de dinâmica molecular convencionais, dessa forma, métodos de amostragem ampliada são necessários.

Em cálculos de energia livre, a quantidade de interesse normalmente é a diferença de energia livre ( $\Delta G$ ) entre diferentes estados. Uma grande variedade de métodos foi desenvolvida com esse objetivo. A seguir será descrito os fundamentos do método ABF (*Adaptive Biasing Force*), utilizado nesta tese. Uma descrição formal pode ser encontrada em [95]

### 3.2.1 Integração termodinâmica

Em simulações computacionais de sistemas biológicos, frequentemente é desejável calcular o perfil de energia livre ao longo de um parâmetro de ordem (ou coordenada de reação),  $\xi$ . A coordenada de reação é definida de tal forma que caracterize o processo de interesse. No contexto de sistema proteicos, parâmetros de ordem são geralmente definidos em termos de coordenadas internas, como por exemplo a distância ou o ângulo entre átomos, ou ainda em termos de funções que envolvem as coordenadas de um conjunto de átomos, como o raio de giração, RMSDs, etc. Um dos métodos mais tradicionais para o cálculo de diferenças de energia livre em função de  $\xi$  é o método da Integração Termodinâmica (TI, *Thermodynamic Integration*). Nessa metodologia, a diferença de energia livre ( $\Delta G$ ) é obtida pela integração da derivada de  $G$  em função da coordenada de reação  $\xi$ :

$$G(\xi_1) - G(\xi_0) = \int_{\xi_0}^{\xi_1} \frac{dG}{d\xi} d\xi \quad (3.16)$$

onde  $dG/d\xi$  é dado por:

$$\frac{dG}{d\xi} = \left\langle \frac{\partial H}{\partial \xi} \right\rangle_{\xi} \quad (3.17)$$

sendo  $H$  a Hamiltoniana do sistema. O sub-escrito  $\xi$  indica que a média é calculada para um valor fixo da coordenada de reação, ou seja, para um ponto da curva de energia livre da figura 3.6. A equação 3.17 pode ser interpretada em termos de grandezas físicas. Por exemplo, ao assumir que a coordenada  $\xi$  é simplesmente uma das coordenadas de um átomo, como a coordenada  $x$  do átomo 1 ( $x_1$ ), a equação 3.17 pode ser escrita como:

$$\frac{dG}{dx_1} = \left\langle \frac{\partial H}{\partial x_1} \right\rangle_{x_1} = \left\langle \frac{\partial U}{\partial x_1} \right\rangle_{x_1} = - \left\langle \vec{F}_1 \right\rangle_{x_1} \quad (3.18)$$

onde  $\vec{F}_1$  é a força sobre a coordenada atômica  $x_1$ . Assim,  $dG/dx_1$  é a força média atuando em  $x_1$  e  $G(x_1)$  é o potencial de força média (PMF) para  $x_1$ . Entretanto, a coordenada de reação  $\xi$  pode ser qualquer função das posições atômicas. Nesses casos, a grandeza  $dG/d\xi$  não é necessariamente uma força. Porém, a mesma interpretação pode ser utilizada:  $-dG/d\xi$  é a força média exercida pelo sistema sobre a “partícula” generalizada  $\xi$  ( $\langle \vec{F}_{\xi} \rangle_{\xi}$ ). Para uma coordenada  $\xi$  qualquer, a derivada da energia livre pode ser escrita como (ver apêndice A):

$$\frac{dG}{d\xi} = \left\langle \frac{\partial H}{\partial \xi} \right\rangle_{\xi} = \left\langle \frac{\partial U}{\partial \xi} - k_B T \frac{\partial \ln |J|}{\partial \xi} \right\rangle_{\xi} \quad (3.19)$$

o termo  $|J|$  é o determinante da matriz Jacobiana da mudança de coordenadas cartesianas para coordenadas generalizadas ( $\xi, q_1, \dots, q_{N-1}$ ). Dessa forma, a derivada de  $G$  é dada pela soma de dois termos: a força mecânica atuando ao longo de  $\xi$  ( $\partial U/\partial \xi$ ) e a contribuição entrópica dada pelo termo  $-k_B T \partial \ln |J|/\partial \xi$ . Portanto, se uma amostragem efetiva das

conformações for realizada para uma dada coordenada de reação de interesse, o perfil de energia livre relativo a qualquer estado pode ser obtido a partir do cálculo da força média e da componente entrópica.

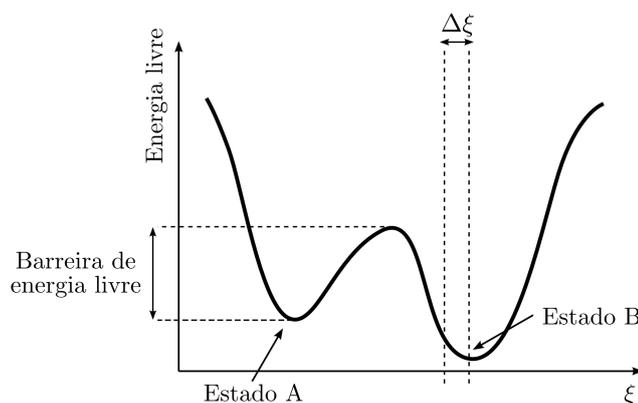


Figura 3.6: Exemplo de uma curva de energia livre em função da coordenada de reação  $\xi$ .

### 3.2.2 O método ABF

O método ABF visa melhorar a eficiência da amostragem de simulações de dinâmica molecular em situações onde a superfície de energia é amostrada inefficientemente devido à presença de barreiras de potencial. Essas barreiras dificultam a transição entre estados fisicamente importantes, resultando em uma amostragem incompleta. Um vez que o método ABF faz parte do conjunto de métodos de Integração termodinâmica, a diferença de energia livre  $\Delta G$  é calculada segundo a equação 3.16. Adicionalmente ao cálculo de  $\Delta G$ , o método ABF permite a melhora da amostragem ao longo da coordenada de reação. Essa combinação torna o método robusto para o cálculo de energias livres e tem sido aplicado a diversos problemas biológicos [96, 97].

O princípio do algoritmo ABF é suavizar a superfície de energia livre, removendo as barreiras energéticas, de forma a acelerar a transição entre os estados. Isso é feito de forma adaptativa, sem o conhecimento prévio sobre a superfície de energia, como é necessário

em outros métodos. Para isso, a força média  $\langle \vec{F}_\xi \rangle_\xi$  que atua sobre o sistema ao longo da coordenada de reação é calculada, fornecendo uma estimativa da derivada da energia livre (Equação 3.20). Do ponto de vista prático, durante a simulação, a força instantânea  $\vec{F}_\xi$  atuando em  $\xi$  é acumulada para pequenos intervalos (janelas) com largura  $\Delta\xi$  (Figura 3.6). Assim, a força média para uma dada janela  $k$  após  $n$  de passos de dinâmica molecular é dada por:

$$\langle \vec{F}_\xi(n, k) \rangle_\xi = \frac{1}{n^k} \sum_{i=1}^{n^k} \vec{F}_{\xi_i} \quad (3.20)$$

onde  $n^k$  é o número de passos dentro da janela  $k$ .

Para permitir que o sistema percorra todos os pontos da coordenada de reação, após uma estimativa eficiente da força média atuando sobre o sistema, uma força externa ( $\vec{F}_{ABF}$ ) com mesmo módulo, porém com direção oposta é adicionada (Equação 3.21). Dessa forma, a força média atuando ao longo da coordenada de reação passa a ser nula e o sistema move-se difusivamente.

$$\vec{F}_{ABF} = R_\xi(n^k, N_{full}) \left( - \langle \vec{F}_\xi(n, k) \rangle_\xi \nabla_{\xi\xi} \right) \quad (3.21)$$

A função  $R_\xi(n^k, N_{full})$  controla o número mínimo de passos em que o sistema permanece em cada janela antes da completa aplicação da força  $F_{ABF}$ . Se o número de passos de simulação em uma determinada janela ( $n^k$ ) for menor ou igual ao valor  $N_{full}$  (parâmetro definido no início da simulação),  $R_\xi(n^k, N_{full}) = n^k/N_{full}$ . Se  $n^k$  for maior que  $N_{full}$ , então  $R_\xi(n^k, N_{full}) = 1$ . Dessa forma, o parâmetro  $N_{full}$  define a amostragem mínima dentro de cada intervalo. A forma como a força  $\vec{F}_{ABF}$  é adicionada ao sistema permite que a  $\vec{F}_\xi$  seja amostrada por mais tempo em regiões importantes da coordenada de reação.

## Capítulo 4

# Variabilidade conformacional da H12 do PPAR $\gamma$

Embora diversos estudos experimentais e teóricos mostrem que o LBD e, particularmente a H12 de receptores nucleares são mais flexíveis na ausência de ligantes, a extensão da mobilidade da H12 e a estabilidade relativa entre as conformações acessíveis ainda não são bem compreendidas. Neste capítulo serão descritos em detalhes o equilíbrio conformacional da H12 na presença e na ausência de Rosiglitazona. Com esse objetivo, foram realizadas simulações ABF bidimensionais para a obtenção das superfícies de energia livre associadas à variabilidade conformacional da H12. Nossos resultados permitiram a compreensão dos movimentos envolvidos na ativação do PPAR $\gamma$ , os quais provavelmente podem ser aplicados a outros receptores nucleares. Os resultados apresentados neste e no capítulo seguinte foram publicados no artigo “Conformational Diversity of the Helix 12 of the Ligand Binding Domain of PPAR $\gamma$  and Functional Implications” [98].

## 4.1 Conformação alternativa da H12

Uma das dificuldades fundamentais em simulações ABF é a definição da coordenada de reação. O objetivo principal das simulações apresentadas neste capítulo é o estudo da variabilidade conformacional da H12 do PPAR $\gamma$ . Assim, o RMSD dessa hélice em relação

a uma conformação de referência foi escolhido como coordenada reacional, uma vez que essa medida é capaz de representar os deslocamentos da H12. Entretanto, o RMSD pode ser uma medida ambígua, já que diversas conformações podem apresentar o mesmo RMSD em relação à estrutura de referência. Esse problema pode ser amenizado com a utilização de múltiplas estruturas de referência. Dessa forma, a coordenada de reação passa a ser definida como os RMSDs em relação às múltiplas conformações (ABF multidimensional).

Os modelos experimentais do LBD do PPAR $\gamma$ , tanto na ausência de ligantes, quanto na presença de agonistas totais ou parciais, exibem, em sua maioria, a H12 na conformação ativa. Dessa forma, antes simulações ABF multidimensionais, utilizadas para a construção do perfil de energia livre da H12, foram realizadas simulações ABF unidimensionais para a obtenção de conformações alternativas da H12. Essas simulações iniciais foram realizadas somente como uma ferramenta para facilitar a amostragem de distintas conformações do LBD e não como metodologia para o cálculo de energia livre.

#### 4.1.1 Simulações de Dinâmica Molecular

Para a obtenção de uma estrutura do PPAR $\gamma$  com uma conformação alternativa para a H12 foram realizadas simulações de dinâmica molecular utilizando a metodologia ABF. Todas as simulações descritas nesta tese foram realizadas com o software NAMD [89]. A estrutura cristalográfica do PPAR $\gamma$  na presença de Rosiglitazona e do peptídeo coativador SRC-1 (PDB: 2PRG - resolução de 2.3 Å) [22] foi utilizada como estrutura inicial para as simulações de dinâmica molecular que serão descritas nesta seção. Para a construção do modelo utilizado nestas simulações, o peptídeo coativador foi removido. A estrutura do PPAR $\gamma$  ligado à Rosiglitazona foi solvatada utilizando o software Packmol [99, 100] com aproximadamente 22.000 moléculas de água. Íons de sódio e cloro foram adicionados para neutralizar o sistema. Para a proteína foi utilizado o campo de força CHARMM27 [83]. Os parâmetros descritos por Anders et al. [101] e o modelo TIP3P [102] foram utilizados

para a Rosiglitazona e para as moléculas de água, respectivamente.

Todas as simulações foram realizadas no ensemble NPT a 298.15 K e 1 atm, com *time-step* de 2 fs. O controle de temperatura foi realizado através da dinâmica de Langevin, com coeficiente de fricção de  $10 \text{ ps}^{-1}$ . Para o controle de pressão foi utilizado o algoritmo Nosé-Hoover, com período de oscilação do pistão de 200 fs e taxa de decaimento de 100 fs. Interações eletrostáticas de longo alcance foram calculadas com o método PME. Para as interações de Van der Waals foi utilizado o cutoff de 12 Å. O sistema foi equilibrado da seguinte forma:

1. Minimização: 1000 passos de minimização GC (Gradientes Conjugados) mantendo toda a proteína fixa;
2. Dinâmica: 200 ps mantendo toda a proteína fixa;
3. Minimização: 500 passos mantendo os carbonos- $\alpha$  fixos;
4. Dinâmica: 200 ps mantendo os carbonos- $\alpha$  fixos;
5. Dinâmica: 2.0 ns sem restrições.

As duas primeiras etapas foram realizadas para permitir a relaxação do solvente ao redor da proteína. Já as etapas 3 e 4 foram realizadas para permitir a relaxação das cadeias laterais da proteína, sem alterar a estrutura global do LBD. Na etapa 5, foi permitida a relaxação de todo o sistema.

### **Simulações ABF**

Para as simulações ABF iniciais, realizadas para facilitar a amostragem de distintas conformações da H12, foi utilizada como coordenada de reação, o RMSD em relação a conformação agonista (Estrutura cristalográfica PDB: 2PRG). O RMSD que define a

coordenada de reação foi calculado somente para os carbonos- $\alpha$  do loop que conecta as hélices H11 e H12. Essa escolha foi feita uma vez que a força externa aplicada no sistema (Força ABF) atua somente sobre os átomos que definem a coordenada de reação. Ao aplicar a força externa sobre átomos da H12 foi observado que esta perde rapidamente sua estrutura secundária. A coordenada de reação foi amostrada dentro do intervalo de 1 a 10 Å em intervalos de 0.1 Å. Para limitar a amostragem à região de interesse, potenciais de fronteira harmônicos com constante de força de 10 kcal mol<sup>-1</sup> foram aplicados ao sistema. Foram realizadas 4 simulações ABF independentes, de 80 ns cada.

### 4.1.2 Resultados

As quatro simulações ABF realizadas mostraram comportamentos bastante distintos. Para caracterizar a mobilidade da H12, foram realizados dois cálculos do RMSD da hélice utilizando diferentes alinhamentos estruturais. No primeiro, o alinhamento foi aplicado à todos os carbonos- $\alpha$  do LBD e no segundo, aos átomos da cadeia principal da H12. No primeiro caso, os RMSDs fornecem informações sobre o movimento da H12 em relação ao LBD. Já no segundo, a análise diz respeito ao movimento interno da H12, carregando informações sobre sua estrutura secundária. O RMSD foi calculado utilizando a seguinte equação:

$$\text{RMSD}(t) = \left[ \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N [\mathbf{r}_i(t) - \mathbf{r}_i(0)]^2 \right]^{1/2} \quad (4.1)$$

onde  $N$  é o número de átomos considerados, no caso, os carbonos- $\alpha$  da H12,  $\mathbf{r}_i(t)$  é a posição do átomo  $i$  no instante  $t$  e  $\mathbf{r}_i(0)$  a posição inicial do átomo  $i$ . Os RMSDs calculados para as quatro simulações estão mostrados na figura 4.1.

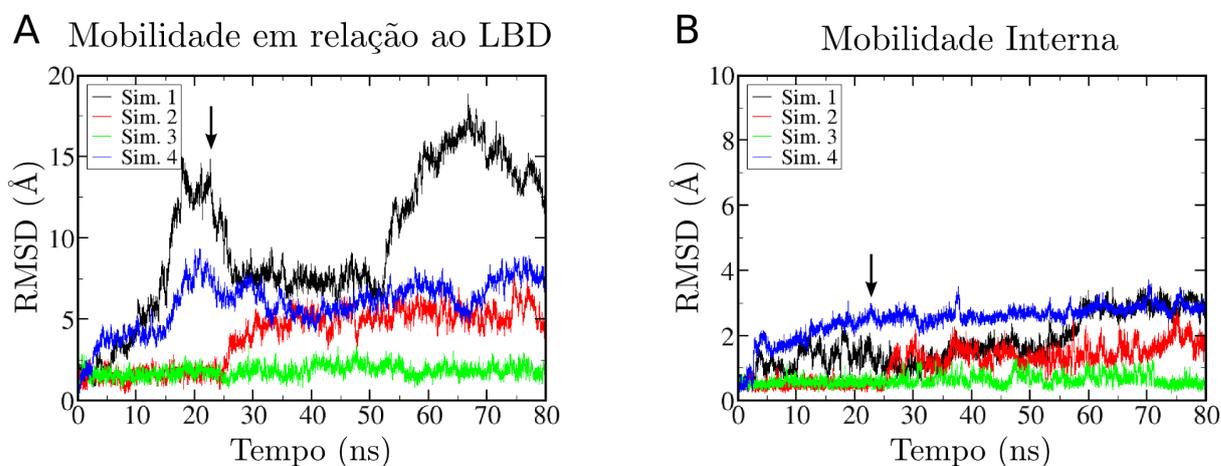


Figura 4.1: (A) RMSD da hélice 12 alinhando todos os carbonos- $\alpha$  do LBD. (B) Mobilidade interna da H12.

A figura 4.1A mostra que a mobilidade da H12 em relação ao LBD é bastante distinta para as quatro simulações. Enquanto nas simulações 1 e 4 a H12 desloca-se significativamente da conformação inicial, para a simulação 3 e, em menor proporção, para a simulação 2, são observadas apenas pequenas flutuações em torno da estrutura inicial. A baixa mobilidade da H12 nessas simulações é resultado da escolha da coordenada de reação. Para evitar perturbações na estrutura secundária da proteína, a força ABF foi aplicada em um conjunto pequeno de átomos. Possivelmente, essa perturbação externa não foi suficiente para permitir que o sistema amostrasse conformações de maior energia.

Embora tanto as simulações 1 e 4 tenham gerado estruturas com a H12 em conformações alternativas, o gráfico da figura 4.1B mostra que a mobilidade interna da H12 para a simulação 4 é maior. Isso significa que para essa simulação, ocorrem maiores perturbações na estrutura secundária da H12 e, em muitos momentos, essa hélice perde completamente sua estrutura. Dessa forma, da simulação 1, foi selecionada a estrutura que a apresentou o maior deslocamento da H12, porém preservando sua estrutura secundária. Essa estrutura, mostrada na figura 4.2, foi utilizada juntamente com a conformação agonista como

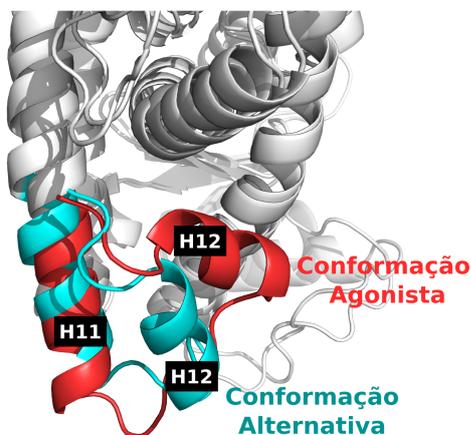


Figura 4.2: Conformações agonista e alternativa utilizadas como estruturas de referência nas simulações ABF multidimensionais.

estrutura de referência para as simulações ABF bidimensionais.

## 4.2 Variabilidade conformacional da H12

### 4.2.1 Simulações de dinâmica Molecular

As estruturas iniciais utilizadas nas simulações ABF bidimensionais foram construídas a partir do modelo cristalográfico 2PRG. Para gerar a estrutura do apo-PPAR $\gamma$  tanto a molécula de Rosiglitazona quanto o peptídeo coativador foram removidos. Já para o sistema holo-PPAR $\gamma$ , somente os átomos do CoA foram retirados. Os dois sistemas foram solvatados, neutralizados e equilibrados da mesma forma como descrito na seção 4.1.1.

Para as simulações ABF, foram utilizadas duas estruturas de referência para definir uma coordenada de reação multidimensional baseada no RMSDs da H12 em relação aos modelos. Os dois modelos utilizados, mostrados na figura 4.2 serão chamados de “conformação agonista” (ou ativa) e “conformação alternativa” ao longo desta tese. Os RMSDs que definem as coordenadas de reação foram calculados para os carbonos- $\alpha$  dos resíduos

449 a 477, ou seja, os C $\alpha$  da região C-terminal da H11, do loop que conecta as hélices H11 e H12 e da H12. O mesmo intervalo de amostragem, precisão e potenciais de fronteira descritos na seção anterior foram utilizados aqui. Entretanto, para estas simulações, a amostragem foi muito superior. Para cada sistema, foram realizadas no total 1.2  $\mu$ s de simulações ABF. Essas simulações foram divididas em 12 simulações independentes de 100 ns cada. Para reduzir a influência da conformação inicial na amostragem, as simulações foram iniciadas tanto na conformação agonista quanto na conformação alternativa. Para o apo-PPAR $\gamma$ , também foram realizadas simulações ABF partindo de uma estrutura similar à conformação C2 (figura 4.6B). Para verificar a convergência das superfícies de energia livre obtidas, foi definida a função de convergência mostrada na equação 4.2:

$$C = \left[ \frac{1}{N_{bins}} \sum_{i=1}^{N_{bins}} [\Delta G(\text{RMSD}_1, \text{RMSD}_2) - \Delta F(\text{RMSD}_1, \text{RMSD}_2)]^2 \right]^{1/2} \quad (4.2)$$

onde  $\Delta G(\text{RMSD}_1, \text{RMSD}_2)$  é a diferença de energia livre final, ou seja, considerando todos os 1.2  $\mu$ s de simulação ABF. A função  $\Delta F(\text{RMSD}_1, \text{RMSD}_2)$  também é a diferença de energia livre para um certo ponto da coordenada de reação, entretanto, obtida após a remoção de cada conjunto de 100 ns de simulações.  $N_{bins}$  é o número de pontos da superfície de energia considerados. Para o cálculo da convergência das superfícies de energia livre, foi considerada somente a região com  $\Delta G < 4$  kcal mol $^{-1}$  em relação ao mínimo de energia livre. Essa função, nada mais é que uma medida do desvio médio da energia livre para as regiões de baixa energia. Os perfis de energia livre foram considerados convergidos quando  $C < 0.5$  kcal mol $^{-1}$ .

### 4.2.2 Conformações acessíveis da H12 do apo-PPAR $\gamma$

A partir das simulações ABF para o apo-PPAR $\gamma$  foi obtida a superfície de energia livre mostrada na figura 4.3. Essa superfície de energia exibe uma larga região de baixa energia, com pelo menos dois mínimos locais discerníveis. A presença de mínimos locais separados por barreiras de energia de poucas kcal mol<sup>-1</sup> sugere a existência de distintas conformações da H12 acessíveis na temperatura ambiente. Esse resultado, como esperado, é coerente com a observação experimental de que a H12, na ausência de ligantes, é flexível.

As simulações apresentadas aqui permitiram uma descrição detalhada das conformações acessíveis para o PPAR $\gamma$  na ausência de ligantes. Para esse sistema, o mínimo global da superfície de energia livre localiza-se aproximadamente nas coordenadas RMSD<sub>1</sub> = 3 Å e RMSD<sub>2</sub> = 4 Å. As conformações em torno dessas coordenadas foram selecionadas ( $\pm 0.1$  Å) e a estrutura representativa <sup>1</sup> foi identificada, utilizando o pacote AmberTools 14 [104]. Esta estrutura está mostrada na figura 4.4, sobreposta com o modelo cristalográfico do PPAR $\gamma$  ligado a Rosiglitazona. Na conformação de menor energia, o apo-PPAR $\gamma$  exibe a H12 em uma conformação bastante similar a conformação agonista, dobrada sobre a superfície do LBD e perpendicular a H3. Nessa conformação, a H12 é estabilizada por ligações de hidrogênio independentes do ligante. Essas interações envolvem os resíduos Glu324 (loop entre a H4 e a H5), Arg397 (loop entre a H8 e a H9), Arg443 (H11) e Tyr477 (H12). A atividade basal dos PPARs parece estar relacionada com a estabilização da H12 na conformação ativa promovida por essa rede de ligações de hidrogênio, o que permite o recrutamento de proteínas coativadoras mesmo na ausência de agonistas. A importância dessas interações foi demonstrada tanto por estudos experimentais [105, 106] quanto por dinâmica molecular [50] envolvendo mutações nesses aminoácidos. Ao substituir individualmente cada um desses resíduos por alaninas, foi observada uma redução significativa na

---

<sup>1</sup>A estrutura representativa é a conformação mais similar ao centroide de um cluster de conformações. O centroide é definido como a conformação hipotética com propriedades médias de todo o cluster [103]. Para a obtenção da conformação representativa de menor energia, todas as conformações foram agrupadas em um único cluster.

atividade basal do PPAR $\gamma$ .

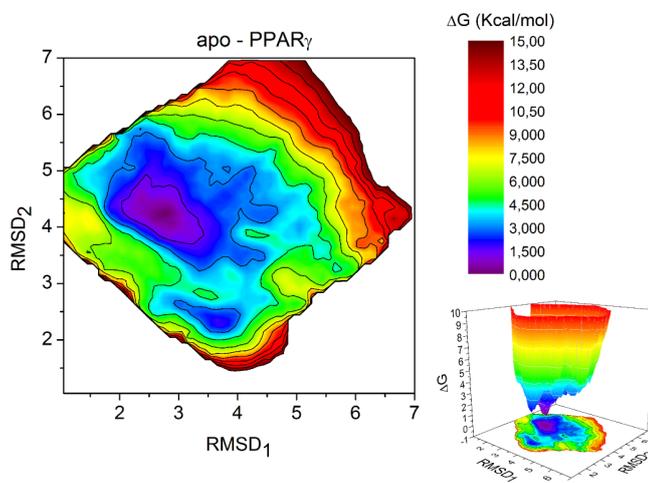


Figura 4.3: Superfície de energia livre da variabilidade conformacional da H12 do apo-PPAR $\gamma$ .

A atividade dos receptores nucleares depende também da associação com proteínas coativadoras. A superfície de interação entre o PPAR $\gamma$  e o CoA é formada pelas hélices H3, H4 e H12. Entretanto, para a estabilização do complexo PPAR $\gamma$ +CoA é essencial a formação de ligações de hidrogênio entre o coativador e os resíduos Lys301 (H3) e Glu471 (H12) do PPAR $\gamma$  (essas interações são conhecidas como grampos de carga). Mutações nesses resíduos estão associadas com uma redução de até 30% na atividade basal do PPAR $\gamma$ . Através da comparação de diversas estruturas de PPARs ligados a agonistas e coativadores, Molnar et al. [106] obteve que a distância entre os carbonos- $\alpha$  da Lys301 e Glu471 varia de 18 a 20 Å. Por outro lado, na presença de antagonistas e correpressores, essa distância é superior a 26 Å, devido à reorientação da H12. Na conformação representativa do mínimo global para o apo-PPAR $\gamma$ , a posição dos resíduos Lys301 e Glu471 é similar à observada na conformação ativa. A distância entre os C $\alpha$  destes resíduos para essa conformação é de 19.9 Å e, portanto, dentro do intervalo proposto por Molnar et al. Dessa forma, nossas simulações indicam a capacidade do PPAR $\gamma$  de adotar a conformação ativa e recrutar proteínas coativadoras mesmo na ausência de ligantes, o que justifica a

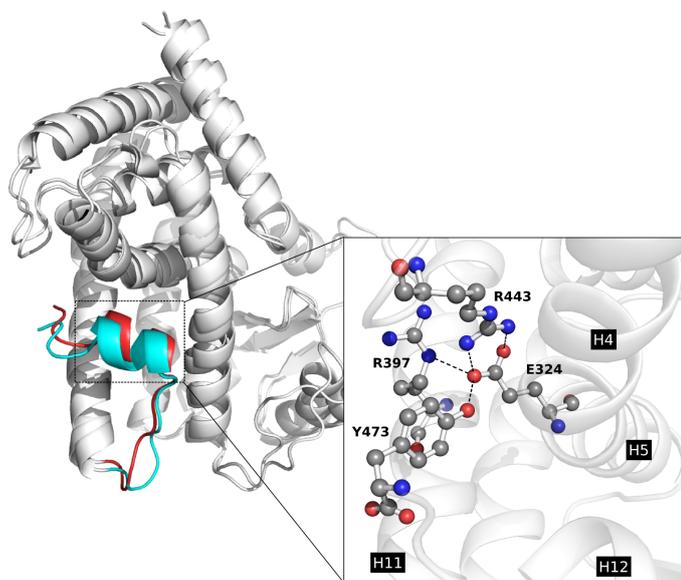


Figura 4.4: Comparação entre a conformação representativa do mínimo global para o PPAR $\gamma$  na ausência de ligante (azul) e a estrutura cristalográfica 2PRG (vermelho). Em destaque estão mostradas as interações responsáveis pela estabilização da H12 na conformação ativa na ausência de ligantes.

atividade basal deste receptor.

A 298.15K, um aumento de 1 kcal mol<sup>-1</sup> na energia livre representa um decréscimo de 80% na probabilidade de observação de uma estrutura. Portanto, estados com  $\Delta G \sim 4$  kcal mol<sup>-1</sup> em relação ao mínimo global possuem 0.1% de probabilidade de serem observados e, representam um limite superior para a energia dos estados observáveis na temperatura ambiente. Dessa forma, na superfície de energia livre da figura 4.3 somente as regiões em roxo, azul e azul claro são consideradas acessíveis.

Na ausência do ligante, a conformação ativa compete com outras conformações acessíveis na temperatura ambiente. Para estudar a variabilidade conformacional da H12, conformações com  $\Delta G \leq 4$  kcal mol<sup>-1</sup> em relação ao mínimo global foram selecionadas e estudadas com o auxílio de um algoritmo de clusterização presente no pacote AmberTools 14. A clusterização das conformações acessíveis foi realizada utilizando o RMSD de todo o LBD como medida de similaridade. Os clusters foram gerados utilizando um algo-

ritmo hierárquico aglomerativo. Nesse algoritmo, inicialmente cada uma das  $n$  estruturas é considerada como sendo um cluster. A cada passo, através de sucessivos processos de agrupamento, o número de clusteres diminui até que todas as estruturas estejam em um único grupo (ou em um número de grupos pré definidos). A medida de distância entre os clusteres foi realizada através do método *Average-linkage*, no qual a média da distância entre objetos de um cluster e outro é utilizada [107]. As conformações foram separadas em três clusteres. A figura 4.5 mostra a distribuição das conformações em cada cluster na superfície de energia livre. Os RMSDs utilizados para a geração dos clusteres são diferentes dos utilizados como coordenadas de reação, por isso, na figura 4.5 não é possível observar uma separação clara entre as estruturas.

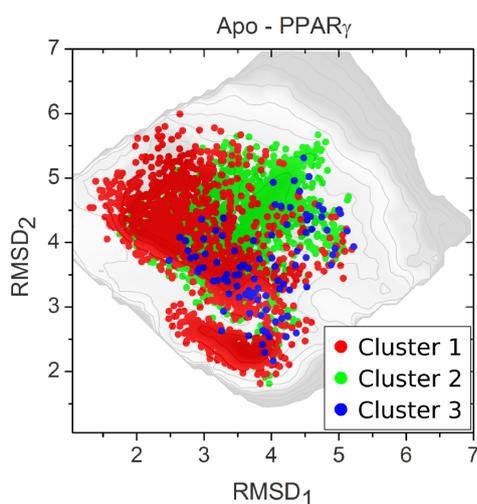


Figura 4.5: Localização das conformações de cada cluster no mapa de energia livre.

As conformações representativas de cada cluster estão mostradas na figura 4.6, alinhadas ao modelo cristalográfico de holo-PPAR $\gamma$ . A conformação representativa do cluster 1 (figura 4.6A) exhibe a H12 em uma conformação similar à observada na estrutura cristalográfica do PPAR $\gamma$  ligado a Rosiglitazona. Este cluster é caracterizado por flutuações em torno da conformação agonista da H12 e, além disso, contém a estrutura de mínimo global. Portanto, nossas simulações mostram que, na ausência de ligantes, conformações similares à conformação ativa, além de serem acessíveis, são as mais frequentes e correspondem ao

mínimo global de energia. Estes resultados justificam o fato de que, para o PPAR $\gamma$ , a hélice 12 é observada na conformação ativa na maior parte das estruturas cristalográficas, seja na ausência de ligante ou na presença de diferentes agonistas [22, 58, 66, 69].

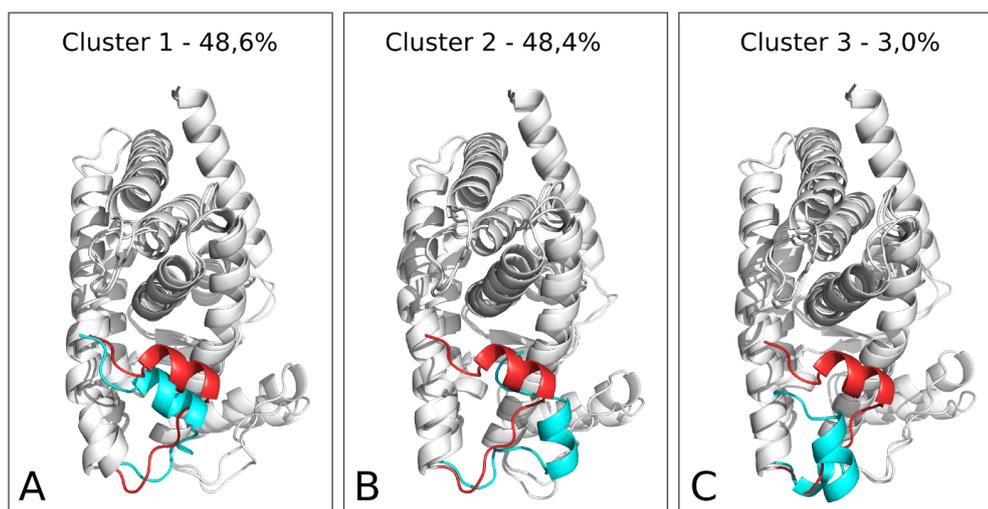


Figura 4.6: Conformações representativas da H12 para cada cluster para as simulações ABF do apo-PPAR $\gamma$ : (A) Conformação representativa do cluster mais frequente. (B) Conformação representativa do segundo cluster mais importante. (C) Conformação representativa do menor cluster. Em todas as figuras o modelo cristalográfico está representado em vermelho e as conformações obtidas nas simulações ABF em azul.

Por outro lado, a conformação representativa do cluster 2 (Conformação C2), mostrada na figura 4.6B, exibe a hélice 12 deslocada da conformação agonista, estando quase paralela à H3. Nesta estrutura, o reposicionamento da hélice 12 impede a interação com proteínas coativadoras, uma vez que a ligação de hidrogênio entre o resíduo Glu471 do receptor e o CoA é perdida. A distância entre os C $\alpha$  dos resíduos que formam o grupo de carga é de 24.5 Å, superior à observada para o PPAR $\gamma$  ligado a coativadores.

Ao comparar a acessibilidade da cavidade de ligação na conformação agonista e na conformação C2, são observadas diferenças significativas. Na conformação agonista, a H12 bloqueia o acesso do ligante ao sítio de ligação (figura 4.7A). Por outro lado, o rearranjo da H12 na conformação C2, cria uma abertura entre as hélices 11 e 12, o que pode permitir o acesso do ligante à cavidade de ligação (figura 4.7B). Portanto, esta conforma-

ção pode ser importante no mecanismo de associação e dissociação do ligante. Alterações conformacionais da H12 desta natureza foram observadas em estudos computacionais da dissociação de ligantes em outros receptores nucleares [42, 43, 45].

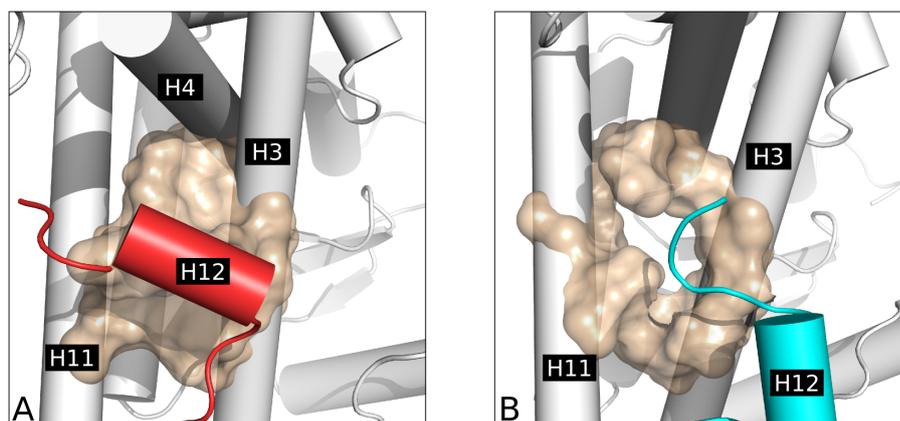


Figura 4.7: Cavidade de ligação com o ligante para as conformações agonista (A) e C2 (B).

A conformação C2 é bastante similar à estrutura obtida por Nolte et al. [22] para o PPAR $\gamma$  na ausência de ligante, como mostrado na figura 4.8A. Nossos resultados mostram que esta conformação, além de bastante frequente, está separada da estrutura de mínimo global por apenas algumas kcal mol $^{-1}$ . Dessa forma, estes dados sugerem que a estrutura de Nolte et al. deve corresponder a uma estrutura representativa do PPAR $\gamma$  em solução. Ainda comparando a conformação C2 com modelos experimentais de PPARs, observa-se que, nesta conformação, a H12 encontra-se em uma posição intermediária às observadas nas conformações agonista e antagonista (figura 4.8B). Este resultado sugere que a conformação C2 seja um estado de transição entre estes dois estados, sendo a transição facilitada pela interação com agonistas, antagonistas ou peptídeos correguladores.

Por fim, a conformação representativa do cluster 3, mostrada na figura 4.6C, exhibe a H12 em uma conformação bastante distinta da agonista, expondo a cavidade de ligação com o ligante. Embora essa conformação seja menos frequente que as demais, ainda representa uma conformação acessível que pode ser importante no mecanismo de entrada e

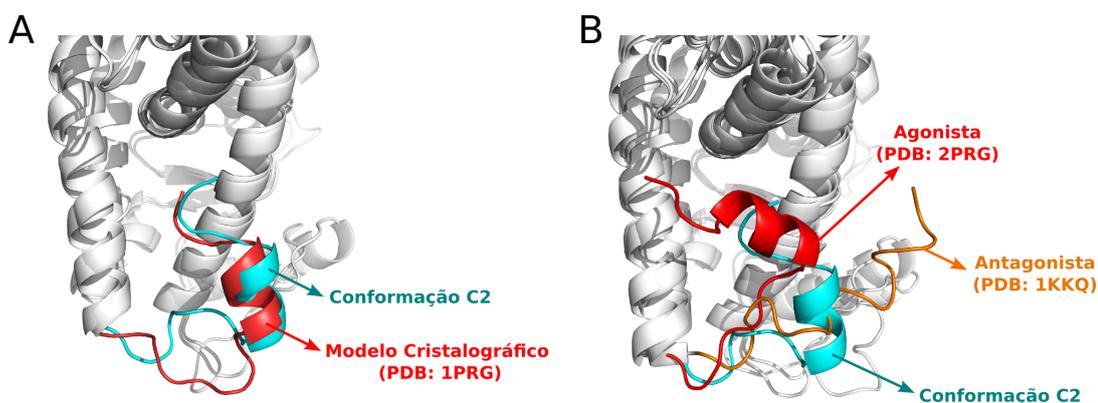


Figura 4.8: (A) Sobreposição do modelo cristalográfico obtido por Nolte et al. [22] (vermelho) e a conformação representativa do cluster 2 (azul). (B) Comparação entre as conformações agonista (vermelho), antagonista (laranja) e C2 (azul).

saída de ligantes. Essa conformação não é consistente com a associação de coativadores ou correpressores e deve ser, portanto, uma conformação de transição entre estados funcionais do PPAR.

### 4.2.3 Estabilização do PPAR $\gamma$ pela Rosiglitazona

As simulações ABF para o PPAR $\gamma$  na ausência de ligantes revelaram a existência de um conjunto de conformações da H12 acessíveis na temperatura ambiente. Destas conformações, estruturas similares à conformação agonista correspondem a aproximadamente 49% das conformações observadas, já o segundo conjunto de conformações mais frequente, apresenta a H12 deslocada da conformação agonista e é consistente com estruturas do apo-PPAR $\gamma$  observadas experimentalmente.

A presença de Rosiglitazona altera significativamente a superfície de energia livre. Para o PPAR $\gamma$  ligado a Rosiglitazona, a superfície de energia livre conformacional, mostrada na figura 4.9A apresenta um único mínimo, sendo que a conformação do mínimo global possui energia livre muito menor do que qualquer outra conformação. Assim, pode-se dizer que o ligante estabiliza a conformação de menor energia em relação às demais conformações.

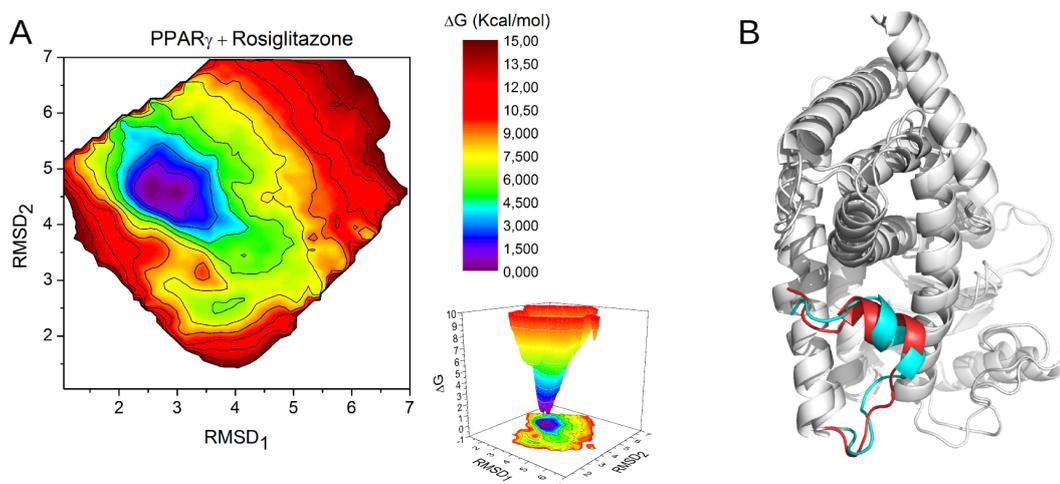


Figura 4.9: (A) Superfície de energia livre da variabilidade conformacional da H12 do holo-PPAR $\gamma$ . (B) Comparação entre a conformação representativa do mínimo global para o PPAR $\gamma$  na presença de Rosiglitazona e a estrutura cristalográfica 2PRG.

Como esperado, a conformação de menor energia é bastante similar a conformação agonista da H12 observada em modelos cristalográficos, e também similar à conformação de menor energia obtida nas simulações ABF para o apo-PPAR $\gamma$  (figura 4.9B). Entretanto, para o holo-PPAR $\gamma$ , somente pequenas perturbações em torno da conformação de mínimo são permitidas. A região acessível na temperatura ambiente, ou seja, com  $\Delta G < 4 \text{ kcal mol}^{-1}$ , é significativamente reduzida na presença de Rosiglitazona (Figura 4.10). A clusterização das conformações acessíveis nesse sistema resulta em um único cluster dominante compreendendo essencialmente todas as estruturas.

Os perfis de energia livre obtidos nos permitem classificar as alterações conformacionais induzidas pela interação com ligantes de acordo com os modelos descritos no capítulo 1: modelo do ajuste induzido ou seleção conformacional (Figura 1.9). Os esquemas mostrados na figura 4.10 ilustram o efeito do ligante no perfil de energia livre da H12. Na ausência de ligantes, a H12 é flexível e múltiplas conformações são acessíveis. Os mínimos de energia observados apresentam pequenas diferenças de energia livre e estão separados por barreiras também de baixa energia, o que facilita a transição entre os estados. A

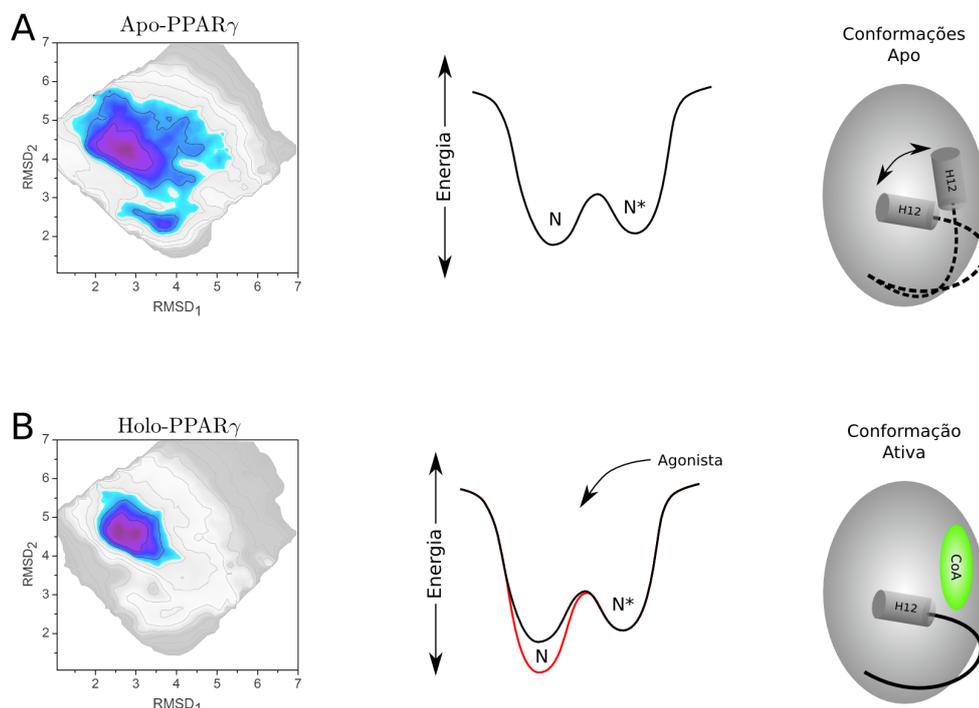


Figura 4.10: (A) Na ausência de ligantes, múltiplas conformações da H12 são acessíveis, sendo a conformação ativa a mais estável. (B) A presença do ligante promove uma seleção conformacional, estabilizando a conformação agonista em relação às demais.

interação com o ligante não altera a natureza estrutural da conformação mais estável, entretanto torna essa conformação a única termodinamicamente acessível. Dessa forma, esse mecanismo pode ser classificado como um mecanismo de seleção conformacional.

Esses resultados são consistentes com estudos experimentais sobre a flexibilidade da H12 em solução. Na ausência de ligantes, a H12 é flexível, podendo assumir a conformação ativa, o que justifica a atividade basal do PPAR $\gamma$ . Recentemente, transições entre as conformações ativa e inativa foram observadas também para o receptor de estrógeno através de simulação de dinâmica molecular [108]. Por outro lado, na presença de agonistas, a flexibilidade da H12 é reduzida de forma significativa, e a conformação ativa torna-se a única conformação acessível. Além disso, as simulações descritas forneceram uma dimensão do deslocamento sofrido pela H12 na ausência de ligantes. Nossos resul-

tados mostram que este deslocamento é relativamente pequeno, particularmente quando comparado com o deslocamento observado no modelo cristalográfico do apo-RXR [18] e proposto pelo modelo da ratoeira. Embora a H12 seja flexível na ausência de ligantes, as conformações acessíveis apresentam a H12 sempre dobrada sobre a superfície do LBD, concordando com nossa análise dos resultados de anisotropia de fluorescência resolvida no tempo, obtidos anteriormente [30, 34].

### 4.3 Discussões

Neste capítulo, as alterações conformacionais da hélice 12 do PPAR $\gamma$  foram descritas do ponto de vista das superfícies de energia livre. Nossos resultados confirmam a flexibilidade da H12 na ausência de ligantes. Embora a conformação ativa da H12 seja a mais estável, conferindo a atividade basal observada para o PPAR $\gamma$ , outras conformações são acessíveis. Entretanto, embora múltiplas conformações da H12 sejam acessíveis, deslocamentos da hélice 12 como descrito no modelo da ratoeira não são observados. Estruturas com a H12 em conformações similares à observada para o apo-RXR estão associadas à altos valores de energia livre e, portanto, não são acessíveis na temperatura ambiente.

Ao contrario do sugerido pela observação das primeiras estruturas cristalográficas do LBD de RNs, o ligante não altera a estrutura do receptor. Nossos resultados mostram que o ligante age estabilizando a conformação ativa em relação às demais. Dessa forma, a imagem de dois estados discretos para o LBD, ou seja, um estado inativo na ausência do ligante e outro ativo na presença de agonistas, não se aplica. Baseado em nossas simulações ABF, pode-se dizer que a ativação do PPAR $\gamma$  é resultado do deslocamento do equilíbrio conformacional da H12 no sentido da conformação ativa devido à interação com o ligante.

## Capítulo 5

# Correguladores e o equilíbrio conformacional da H12

A interação dos receptores nucleares com ligantes e proteínas coativadoras é descrita geralmente como eventos sequenciais: a presença do ligante estabiliza a conformação ativa do receptor, o que cria uma superfície hidrofóbica de interação com os coativadores. Entretanto, trabalhos anteriores demonstraram que ligantes e coativadores possuem um efeito cooperativo na estabilização da H12 e do LBD como um todo. Gee et al. [109] mostraram que na presença de peptídeos coativadores, a taxa de dissociação de ligantes no ER é reduzida, o que sugere a estabilização da conformação ativa pelos CoAs. Estruturas cristalográficas do receptor HNF-4 $\alpha$  mostram que, embora a presença do ligante seja necessária, não é suficiente para estabilizar a conformação ativa, o que ocorre somente na presença do coativador [110]. Proteínas correpressoras também exercem um efeito alostérico sobre o LBD. Devido ao seu maior tamanho, o ancoramento dos correpressores na superfície do LBD exige o reposicionamento da hélice 12, como observado em estruturas cristalográficas. Além disso, os correpressores, assim como ligantes e coativadores, estabilizam conformações específicas do LBD [74, 111]. Esses trabalhos mostram que assim como os ligantes, proteínas correguladoras também alteram o equilíbrio conformacional da H12 e, conseqüentemente, são importantes na regulação da atividade dos receptores nucleares.

No capítulo anterior abordamos o efeito do ligante no equilíbrio conformacional da H12. Para complementar o estudo da variabilidade conformacional da hélice 12, determinamos também as superfícies de energia livre desta hélice para o PPAR $\gamma$  ligado a peptídeos coativadores e correpressores. Neste capítulo serão apresentados os resultados para as simulações ABF do PPAR $\gamma$  na presença de CoA e CoR e discutidos os papéis destes nas conformações acessíveis do LBD.

## 5.1 Estabilização da hélice 12 pelos coativadores

Para verificar o papel dos coativadores no equilíbrio conformacional da H12, foram realizadas simulações ABF para o PPAR $\gamma$  na presença do peptídeo coativador SRC-1. A estrutura cristalográfica do complexo PPAR $\gamma$ +CoA+Rosiglitazona (PDB 2PRG) foi novamente utilizada para a construção da estrutura inicial usada nas simulações. Entretanto, para estas simulações, a molécula do ligante foi removida, uma vez que gostaríamos de avaliar somente o efeito do coativador na estabilização da H12. Os mesmos parâmetros descritos no capítulo anterior foram utilizados nas simulações ABF para o PPAR $\gamma$  ligado ao CoA SRC-1. Para este sistema, foram realizadas 10 simulações independentes de 100 ns cada.

O perfil de energia livre obtido a partir das simulações ABF para o PPAR $\gamma$  ligado ao CoA está mostrado na figura 5.1A. Assim como a superfície de energia para o PPAR $\gamma$  ligado à Rosiglitazona, observa-se que a região acessível na temperatura ambiente ( $\Delta G < 4 \text{ kcal mol}^{-1}$ ) é bastante restrita. As estruturas acessíveis podem ser agrupadas em um único conjunto de conformações, uma vez que a clusterização destas estruturas resulta em um cluster dominante contendo mais de 99% das conformações. A conformação representativa desse cluster exibe a H12 na conformação ativa, como mostrado na figura 5.1B. A estabilização da H12 nessa conformação ocorre pelas mesmas interações descritas para o apo-PPAR $\gamma$  envolvendo a Tyr477 da H12. Entretanto, ligações de hidro-

gênio entre o resíduo Glu471 e a cadeia principal do coativador também contribuem para a estabilização da conformação ativa da H12 (Figura 5.1B).

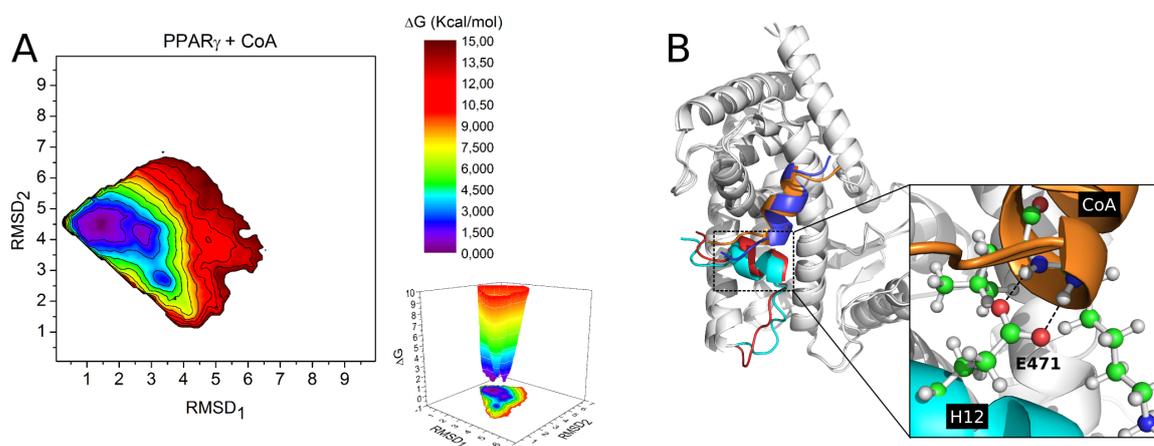


Figura 5.1: (A) Superfície de energia livre do equilíbrio conformacional da H12 do PPAR $\gamma$  ligado ao peptídeo coativador SRC-1. (B) Comparação entre a conformação de mínimo de energia obtida nas simulações ABF (azul e azul claro) e a estrutura cristalográfica (vermelho e laranja). O CoA estabiliza a H12 na conformação ativa através de ligações de hidrogênio entre a cadeia lateral do resíduo Glu471 da H12 e a cadeia principal do coativador.

Três mínimos de energia locais diferindo em poucas kcal mol $^{-1}$  são observados na superfície de energia livre para o sistema PPAR $\gamma$ +CoA. Entretanto, como mostrado na figura 5.2, as estruturas associadas à esses mínimos apresentam a H12 em conformações similares à conformação agonista. Somente pequenas perturbações no loop que conecta as hélices H11 e H12 são observadas.

Estruturas com a H12 deslocada da conformação ativa e similares a conformação antagonista são observadas nas simulações ABF na presença do peptídeo coativador. Entretanto, essas estruturas estão associadas a altos valores de  $\Delta G$ . Além disso, o rearranjo da H12 em direção a conformações inativas exige o deslocamento do coativador, como mostrado na figura 5.3 e é, portanto, desfavorável. Os resultados apresentados aqui mostram a capacidade do coativador de estabilizar a conformação ativa do PPAR $\gamma$  mesmo na ausência de agonistas. Ligantes e proteínas coativadoras possuem papéis complementares

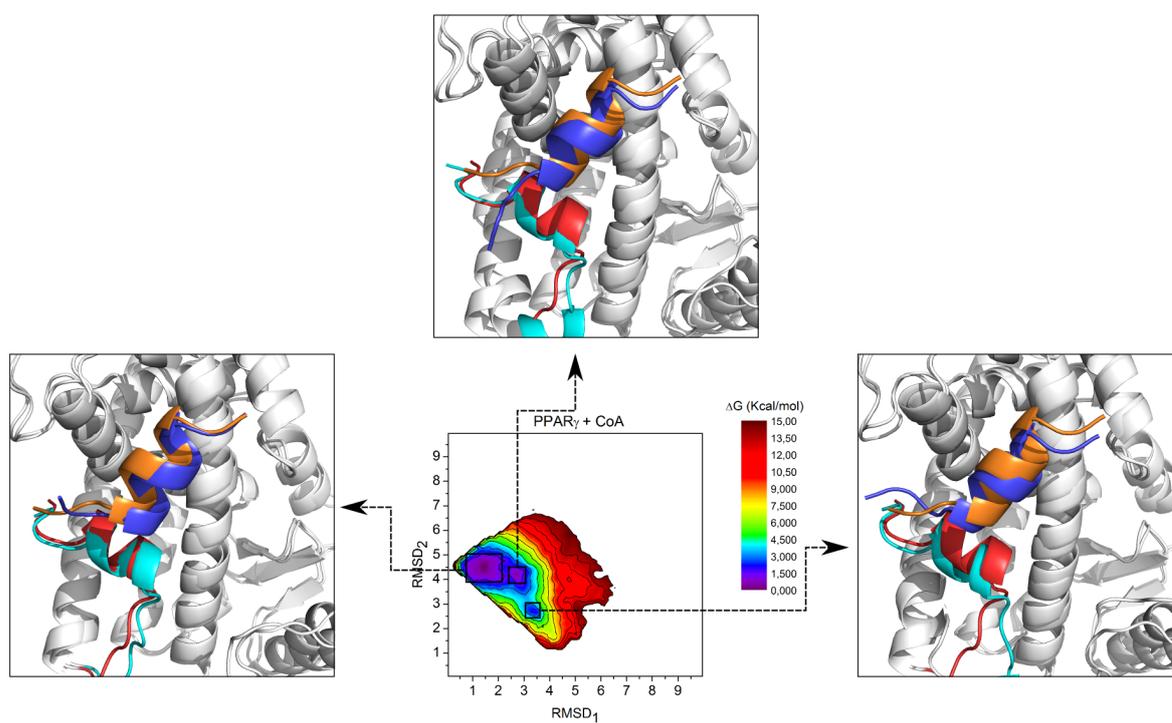


Figura 5.2: Conformações representativas de cada mínimo local para o PPAR $\gamma$  ligado ao peptídeo coativador SRC-1.

na estabilização da H12. Em conjunto, as superfícies de energia livre obtidas sugerem que a interação com ligantes e o recrutamento dos coativadores ocorrem em escalas de tempo diferentes: a associação e dissociação do ligante deve ocorrer no receptor livre do coativador. A interação com o ligante desloca o equilíbrio conformacional no sentido da conformação ativa, favorecendo o recrutamento do CoA. Após a interação com o coativador, a conformação agonista torna-se ainda mais estável. Dessa forma, a dissociação do coativador pode ser considerada como o evento limitante para a restauração do receptor inativo.

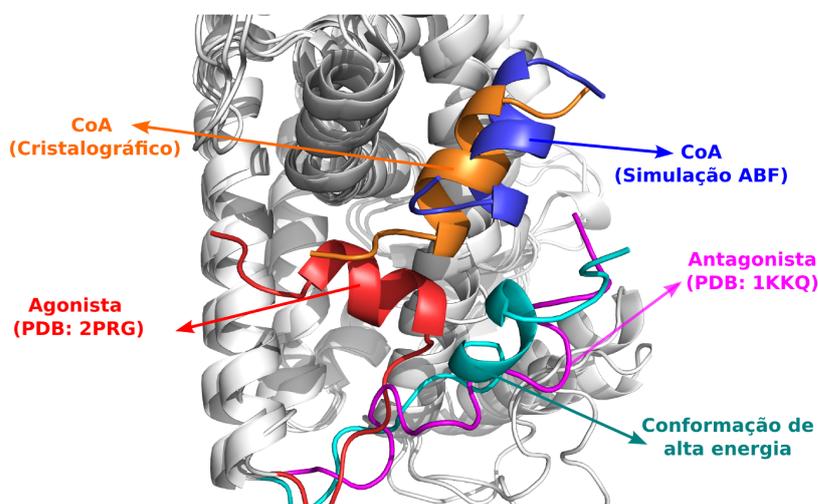


Figura 5.3: Conformação de alta energia para o PPAR $\gamma$  ligado ao peptídeo coativador. Estruturas exibindo a H12 em conformações similares à antagonista foram observadas em todos os sistemas. Entretanto, estão associadas a altos valores de energia livre. Para o PPAR $\gamma$  ligado ao CoA, observa-se ainda que o deslocamento da H12 resulta na desestabilização da interação entre o coativador e o receptor.

## 5.2 Efeito do correpressor no equilíbrio conformacional da H12

Nas simulações ABF para o PPAR $\gamma$  livre de ligante, ligado a Rosiglitazona e ligado ao peptídeo coativador, foram obtidas configurações da H12 similares à observada para o modelo experimental do receptor ligado ao correpressor (conformação antagonista). Entretanto, essas conformações possuem energia  $\sim 30$  kcal mol $^{-1}$  acima da conformação agonista e são, portanto, inacessíveis nesses sistemas. Experimentalmente, a interação com correpressores está associada com um deslocamento significativo da H12. Desta forma, o peptídeo correpressor deve alterar a superfície de energia livre, permitindo que conformações antagonistas da H12 sejam amostradas.

Para verificar o efeito da presença do correpressor no equilíbrio conformacional da H12, foram realizadas simulações ABF para o receptor na presença do peptídeo correpressor SMRT. As simulações foram realizadas com a isoforma PPAR $\alpha$  (PDB 1KKQ), uma vez que para o PPAR $\gamma$  não existem modelos experimentais na presença de correpressores. Como mostrado no capítulo 2, os resíduos envolvidos na interação com proteínas correguladoras são conservados nas três isoformas do PPAR (Figura 2.3B). Dessa forma, acreditamos que a interpretação para o papel do correpressor no equilíbrio conformacional da H12 mostrado aqui para o PPAR $\alpha$ , possa ser estendido para as demais isoformas. As simulações foram realizadas da mesma forma como descrita para os demais sistemas. A superfície de energia livre para esse sistema, mostrada na figura 5.4, foi obtida a partir de 10 simulações ABF de 100 ns cada.

Ao comparar a superfície de energia livre calculada para o PPAR $\alpha$ +CoR com as anteriores, observa-se que a posição do mínimo global de energia livre é deslocada. Regiões de baixa energia para os sistemas anteriores tornam-se proibidas, enquanto regiões de alta energia para o PPAR livre e ligado a Rosiglitazona são estabilizadas. Portanto, pode-se

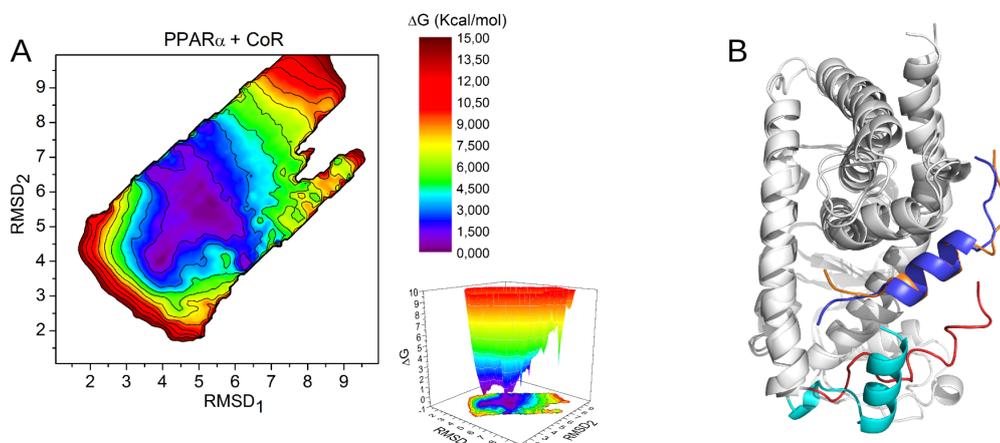


Figura 5.4: (A) Perfil de energia livre para o PPAR $\alpha$  ligado ao peptídeo correpressor SMRT. (B) Comparação entre a conformação de mínimo de energia obtida nas simulações ABF (azul e azul claro) e a conformação antagonista, obtida experimentalmente (vermelho e laranja).

dizer que o correpressor estabiliza conformações da H12 não acessíveis na sua ausência e, por outro lado, promove um aumento significativo na energia livre da conformação agonista.

No sistema ligado ao correpressor, a região acessível na temperatura ambiente é bastante larga se comparada aos demais sistemas, e apresenta dois mínimos locais (Figuras 5.4A e 5.6). É interessante notar que um dos mínimos locais corresponde a conformações da H12 que se aproximam da conformação agonista. Entretanto, estas conformações, de baixa energia e similares à agonista, estão associadas com o deslocamento do peptídeo correpressor em relação à posição observada no modelo experimental (conformação B da figura 5.5A). Na estrutura cristalográfica, o peptídeo SMRT adota uma hélice- $\alpha$  de três voltas e liga-se ao PPAR $\alpha$  em uma superfície hidrofóbica formada pelas hélices H3, H4 e H5. Além das interações hidrofóbicas, o correpressor forma ligações de hidrogênio com a Lys292 do PPAR $\alpha$ , como mostrado na figura 5.5B. O rearranjo da H12 no sentido de reestabelecer a conformação ativa exige o deslocamento do CoR e a ruptura da interação entre este e o receptor. Os estágios iniciais do rearranjo da H12 são termodinamicamente

permitidos. O LBD pode assumir conformações similares à agonista, mesmo na presença do correpressor, desde que este esteja parcialmente deslocado. A presença de agonistas, ao estabilizar a conformação ativa da hélice 12, deve promover a completa dissociação do peptídeo correpressor.

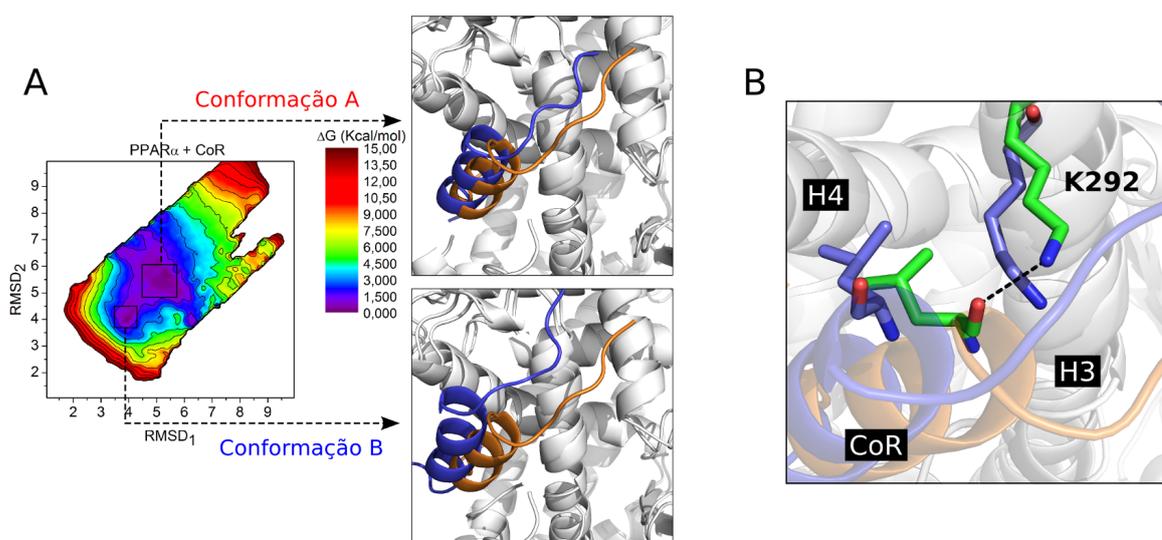


Figura 5.5: (A) Conformações da H12 similares à conformação agonista do PPAR $\gamma$  são observadas nas simulações ABF e possuem  $\Delta G \sim 2 \text{ kcal mol}^{-1}$  em relação à conformação de menor energia. Embora acessíveis, essas conformações (conformação B) estão associadas com o deslocamento do peptídeo correpressor. (B) Ligação de hidrogênio entre o correpressor SMRT e o PPAR $\alpha$ . Os resíduos que formam esta ligação estão mostrados em verde para o modelo cristalográfico e em azul para a estrutura obtida nas simulações ABF.

As superfícies de energia livre para o receptor na ausência de ligante e na presença do correpressor apresentam regiões de baixa energia em comum, ou seja, existe uma sobreposição dos conjuntos de conformações acessíveis para os dois sistemas. Estruturas similares à conformação C2 são observadas nas simulações do PPAR $\alpha$  ligado ao CoR (Figura 5.4B). Esse resultado sugere que a conformação C2 é capaz de interagir com o peptídeo correpressor, o que reforça a imagem dessa conformação como um estado de transição entre as conformações ativa e inativa. Entretanto, a conformação antagonista, observada experimentalmente somente na presença do correpressor, deve ainda ser estabilizada pela

interação do receptor com antagonistas.

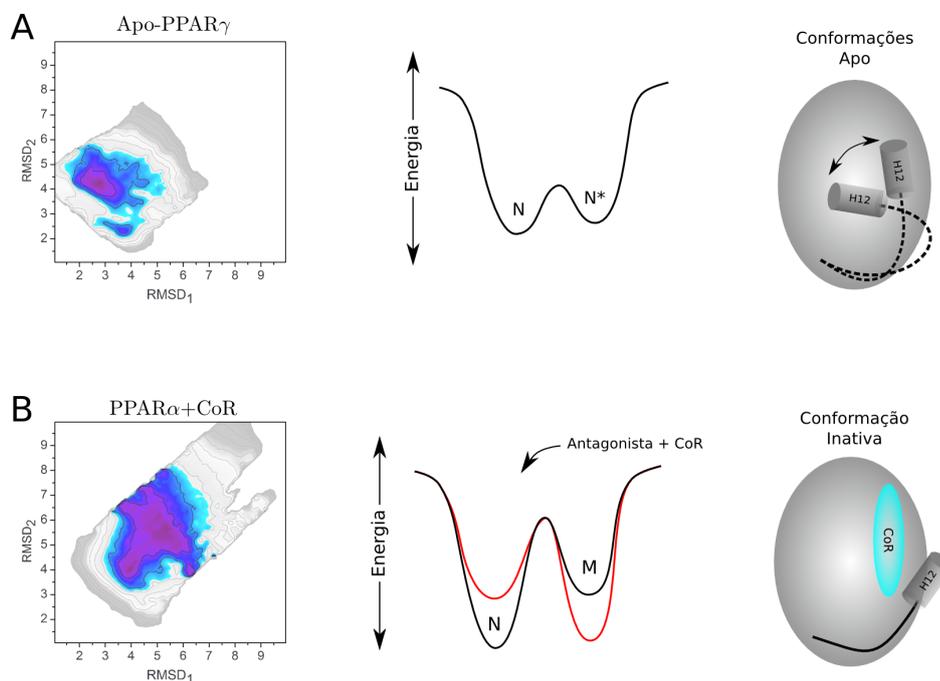


Figura 5.6: Mecanismo de repressão das proteínas correpressoras: A interação com o correpressor perturba a superfície de energia livre. O correpressor promove uma transição conformacional na H12, estabilizando conformações anteriormente inacessíveis.

A figura 5.6 ilustra o mecanismo de repressão das proteínas correpressoras. Para o PPAR livre, múltiplas conformações são acessíveis, com destaque para as conformações ativa e C2. O peptídeo correpressor não é capaz de se ligar ao PPAR na conformação agonista, entretanto, o rearranjo da H12 na conformação C2 cria espaço suficiente para acomodar a volta adicional da hélice do CoR. A associação com o correpressor altera o perfil da curva de energia livre, favorecendo conformações anteriormente inacessíveis. As estruturas favorecidas na presença do CoR são aquelas com grandes deslocamentos da H12, as quais não são observadas nas demais condições. Dessa forma, o correpressor induz uma transição conformacional na H12 e, o mecanismo de repressão pode ser classificado como o mecanismo de ajuste induzido.

## 5.3 Regulação da atividade do PPAR pelos correguladores

A análise das superfícies de energia livre do PPAR na presença de proteínas coativadoras e correpressoras permitiu a proposição de modelos para o modo como as proteínas correguladoras controlam as transições entre conformações ativas e inativas do receptor, como mostrado no esquema da figura 5.7. Na ausência de ligantes, a conformação ativa encontra-se em equilíbrio com outras conformações, as quais apresentam a hélice 12 dobrada sobre a superfície do LBD, porém deslocada da conformação agonista. Proteínas coativadoras ligam-se ao PPAR $\gamma$  na conformação ativa, deslocando o equilíbrio conformacional no sentido destas conformações. Por outro lado, a interação com correpressores não é permitida para o PPAR $\gamma$  nessa conformação. Embora a H12 tenha assumido conformações similares à agonista e de baixa energia na presença do CoR, isso só foi possível com o deslocamento do peptídeo correpressor.

O rearranjo da H12 na conformação C2 não bloqueia a superfície de interação com as proteínas correguladoras e, portanto, tanto coativadores quanto correpressores são capazes de se ligar a essa conformação. Entretanto, como mencionado no Capítulo 2, os modos de ligação destas proteínas com o receptor apresentam diferenças importantes. Devido a volta adicional do correpressor e o menor volume das cadeias laterais presentes no CoR (Figura 2.8), a interação com proteínas correpressoras é favorecida em relação aos coativadores. Na presença do correpressor, estruturas com grandes deslocamentos da H12 passam a ser observadas. Na conformação C2, interações entre o receptor e proteínas coativadoras são possíveis de ocorrer, entretanto, não são estáveis, uma vez que a ligação de hidrogênio entre o Glu471 (H12) e o CoA não pode ser formada.

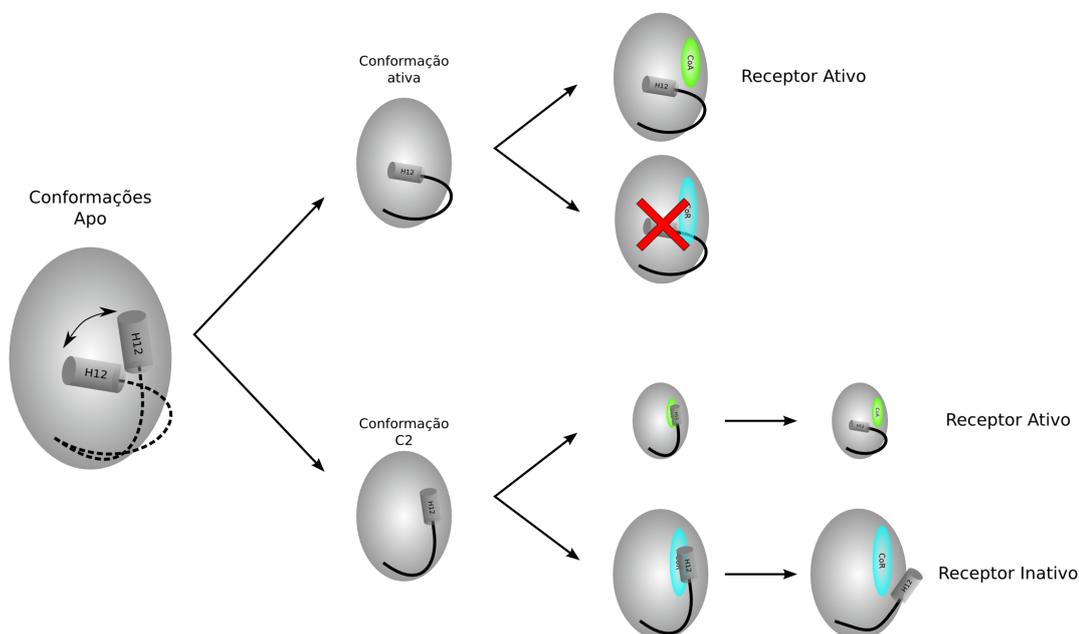


Figura 5.7: Transições entre estados ativos e inativos devido à interação com proteínas correguladoras: Na ausência de ligantes a H12 é flexível. A interação com coativadores desloca o equilíbrio conformacional no sentido de conformações ativas. Na conformação C2, tanto a interação com CoAs quanto com CoRs são possíveis, porém, a interação com correpressores é favorecida. Após a interação com estas proteínas, conformações antagonistas passam a ser observadas.

## 5.4 Discussões

Apresentamos neste capítulo o papel das proteínas correguladoras no controle da diversidade conformacional da H12. Nossos resultados mostraram que a interação com coativadores possui um efeito similar ao do ligante na estabilização da conformação ativa. Nem o ligante nem o peptídeo coativador induzem uma mudança conformacional no LBD, porém, atuam estabilizando uma conformação acessível na sua ausência. Entretanto, os mecanismos pelos quais ligante e coativador estabilizam a H12 são distintos e devem possuir efeito aditivo. As superfícies de energia para o PPAR $\gamma$  na presença de Rosiglitazona e do peptídeo coativador mostram que a estabilização promovida pelo CoA é mais intensa

que a promovida pelo ligante.

Por outro lado, a associação com proteínas correpressoras altera significativamente a superfície de energia livre. Conformações acessíveis para o apo-PPAR $\gamma$  e na presença de Rosiglitazona ou do coativador tornam-se desfavoráveis. Na presença do correpressor, estruturas com grandes deslocamentos da H12 passam a ser acessíveis. Portanto, o correpressor induz uma transição conformacional no LBD, estabilizando estados inativos do receptor.

## Capítulo 6

# Mecanismos de dissociação da Rosiglitazona

Nos capítulos anteriores mostramos o equilíbrio conformacional da H12 do PPAR $\gamma$  em diferentes condições: na ausência de ligantes, na presença de Rosiglitazona e de cofatores. Na ausência de ligantes, a H12 é flexível e amostra distintas conformações, de acordo com resultados experimentais. Estas conformações são consistentes com a imagem de um LBD compacto, ou seja, deslocamentos da H12 como o observado para o apo-RXR $\alpha$  não são esperados. As conformações acessíveis na temperatura ambiente para o PPAR $\gamma$  sem ligante exibem diferenças no que concerne a acessibilidade à cavidade de ligação.

A exposição da cavidade de ligação devido à orientação da H12 na conformação C2 sugere um possível mecanismo de entrada e saída de ligantes envolvendo perturbações nesta hélice. Para compreender o papel da conformação do receptor na formação do complexo com o ligante e nos mecanismos de dissociação, novas simulações ABF foram realizadas. Neste capítulo será apresentado o estudo da dissociação da Rosiglitazona da cavidade de ligação do PPAR $\gamma$  em função das conformações da H12. O papel do coativador na estabilização do complexo PPAR $\gamma$ +Rosiglitazona também será abordado.

## 6.1 Estudos dos mecanismos de entrada e saída de ligantes para o PPAR $\gamma$

No Capítulo 1, os principais trabalhos relacionados ao estudo dos mecanismo de entrada e saída de ligantes para diferentes receptores nucleares foram apresentados [41–46, 48, 49]. Em geral, estes trabalhos foram realizados utilizando uma única conformação do LBD: a conformação agonista. Nas simulações que serão descritas neste capítulo, além de estudar os mecanismos de saída da Rosiglitazona, buscamos verificar o efeito da conformação inicial da H12 e do peptídeo coativador na estabilização do complexo com o ligante e nos mecanismos de dissociação, aspectos ainda não abordados em estudos de dissociação.

Para o PPAR $\gamma$ , os mecanismos de entrada e saída do agonista parcial GW0072 foram estudado por Genest et al. através de simulações TMD (*Targeted molecular dynamics*) [47, 112]. Nesta metodologia, um grupo de átomos é guiado a partir de uma configuração inicial para uma configuração final através da diminuição, a cada passo, do desvio quadrático médio (RMSD) entre as duas estruturas. Os autores observaram duas rotas principais de saída do ligante. A primeira, e mais frequente, corresponde a uma abertura delimitada pelas hélices H1, H2, H2' e H3 e pelo loop entre as hélices H2' e H3. Este mecanismo de dissociação é similar ao caminho III (Figura 1.11C) observado para o TR. Além disso, este caminho foi obtido como única via de entrada para o mesmo ligante [112].

A segunda rota de saída observada é delimitada pelas hélices H2', H3 e H6 e os loops entre as hélices H2' e H3 e H6 e H7. Para os dois caminhos de saída observados, o ligante escapa do interior da proteína através de regiões intrinsecamente flexíveis, sem perturbar drasticamente a estrutura do receptor [47]. Outro aspecto interessante apresentado nestes trabalhos foi a observação da diminuição da mobilidade da H12 após a entrada do agonista parcial [112]. Embora o agonista GW0072 não interaja diretamente com a H12,

a menor flexibilidade desta hélice parece ser necessária para a estabilização do complexo Receptor+Ligante.

Embora o trabalho realizado por Genest et al. tenha fornecido informações sobre os mecanismos de associação e dissociação de ligantes em PPAR $\gamma$ , este foi realizado para um agonista parcial. Enquanto agonistas totais induzem a conformação ativa do receptor através da interação direta com a Tyr473, a interação com agonistas parciais possivelmente resulta em um equilíbrio entre as conformações ativa e inativa (similar ao demonstrado para o apo-PPAR $\gamma$ ). Para complementar o estudo da dissociação de ligantes no PPAR $\gamma$ , estudamos os mecanismos de saída da Rosiglitazona, uma agonista total deste receptor, através de simulações ABF.

## 6.2 Simulações ABF

Para o estudo da dissociação da Rosiglitazona foram realizados três conjuntos de simulações ABF. Os mecanismos de saída do ligante foram estudados para o PPAR $\gamma$  inicialmente na conformação agonista e na conformação C2. Além disso, o efeito de proteínas coativadoras sobre este mecanismo também foi estudado. O objetivo destas simulações foi, além de conhecer as vias de dissociação da Rosiglitazona, verificar se com o rearranjo da H12 na conformação C2, mecanismos envolvendo a hélice 12 seriam favorecidos.

A estrutura cristalográfica do PPAR $\gamma$  ligado à Rosiglitazona e ao peptídeo coativador SRC-1 (PDB: 2PRG) foi novamente utilizada como estrutura inicial. Esta estrutura foi utilizada para as simulações na conformação agonista e na presença do CoA. Para as simulações do PPAR $\gamma$  com a H12 na conformação C2 foi utilizada a estrutura obtida nas simulações ABF anteriores. Os sistemas foram solvatados e neutralizados de acordo com o descrito no capítulo 4. As etapas iniciais de minimização e equilíbrio e os parâmetros utilizados foram os mesmos descritos para as simulações anteriores.

Uma vez que o objetivo destas simulações é o estudo da dissociação do ligante, foi necessária a escolha de uma coordenada capaz de representar o afastamento do ligante em relação ao sítio de ligação. Assim, a distância entre o centro de massa da Rosiglitazona e o centro de massa de alguns resíduos da cavidade de ligação (Resíduos Phe282, Cys285, His323, Ile326 e Leu330) foi utilizada como coordenada reacional (Figura 6.1). Essa distância foi amostrada dentro do intervalo de 2 a 20 Å, em intervalos de 0.1 Å. Nestas simulações, a força ABF foi aplicada somente aos átomos da Rosiglitazona para permitir a saída do ligante sem perturbar diretamente a estrutura da proteína. Para cada sistema, foram realizadas 15 simulações de 20 ns.

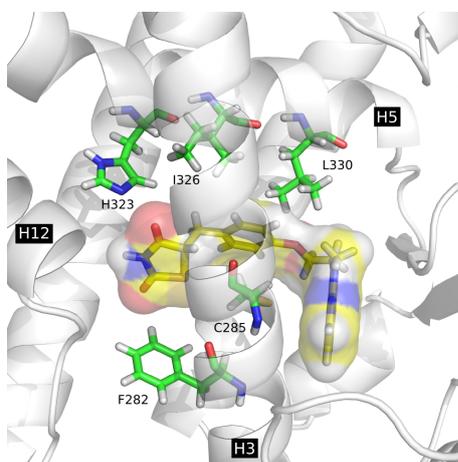


Figura 6.1: Para o estudo da dissociação da Rosiglitazona foram realizadas simulações ABF utilizando como coordenada reacional a distância entre o centro de massa do ligante e dos carbonos- $\alpha$  dos resíduos Phe282, Cys285, His323, Ile326 e Leu330 localizados na cavidade de ligação do PPAR $\gamma$ .

## 6.3 Resultados

Para investigar os caminhos pelos quais a Rosiglitazona escapa da cavidade de ligação do PPAR $\gamma$ , foram realizadas simulações ABF para o receptor partindo das conformações ativa, C2 e na presença do peptídeo coativador. No método ABF, o movimento do sistema

ao longo da coordenada de reação é determinado por suas propriedades difusivas. Neste estudo, como a coordenada de reação não é direcional, nenhum caminho de dissociação predeterminando é favorecido.

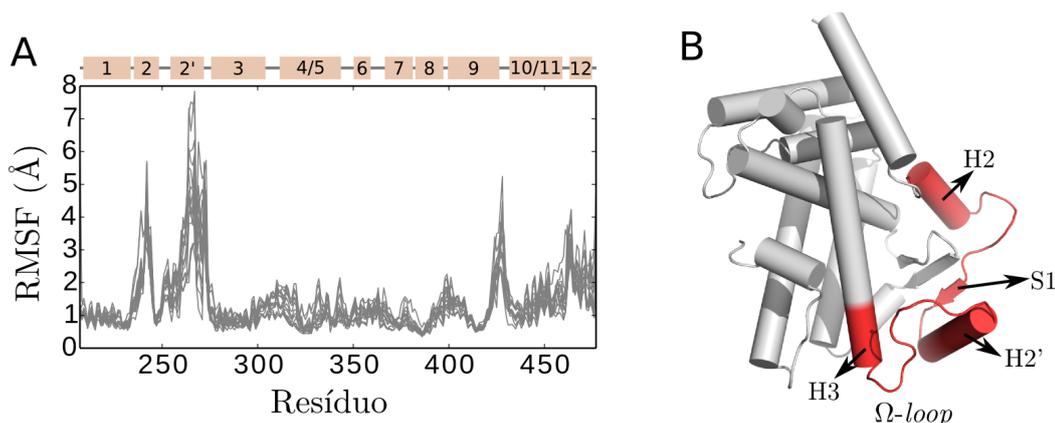


Figura 6.2: (A) Flutuações atômicas dos carbonos- $\alpha$  do LBD do PPAR $\gamma$  obtidas nas simulações ABF. (B) A saída da Rosiglitazona do interior da cavidade de ligação está associada à perturbações nas hélices H2, H2' e H3, na fita  $\beta$  S1 e no  $\Omega$ -loop.

Para dimensionar a mobilidade interna do PPAR $\gamma$  durante o processo de saída do ligante, a flutuação quadrática média (RMSF) dos carbonos- $\alpha$  do LBD foi calculada (Figura 6.2A). As regiões com maiores flutuações são aquelas que sofrem mudanças conformacionais significativas para permitir a saída do ligante. Estas regiões correspondem às hélices H2, H2', à região N-terminal da H3, à fita- $\beta$  S1 e ao  $\Omega$ -loop (Figura 6.2B). Os fatores de temperatura da estrutura cristalográfica 2PRG também indicam que estas regiões da proteína são flexíveis. Assim, as simulações mostram que a saída do ligante ocorre através de regiões da proteína que são naturalmente móveis. Os RMSFs mostrados na figura 6.2 foram calculados para as simulações ABF partindo da conformação agonista. Resultados similares foram obtidos para as simulações iniciadas na conformação C2. Entretanto, nestes casos, foi observada uma maior mobilidade da H12, uma vez que as ligações de hidrogênio envolvendo da Tyr477 da H12 são perdidas (a importância desta ligação para a estabilização da H12 foi discutida no capítulo 4). A maior mobilidade da H12 nestas

simulações não parece afetar as características gerais dos mecanismos de dissociação da Rosiglitazona.

### 6.3.1 Caminhos de dissociação

Nas simulações ABF realizadas tanto para o PPAR $\gamma$  na conformação ativa quanto na conformação C2 foram observadas duas vias de saída da Rosiglitazona, como mostrado na figura 6.3. Os dois caminhos envolvem rearranjos nas hélices H2, H2' e H3 e no  $\Omega$ -loop. Devido a sua flexibilidade, essa região dos receptores nucleares já foi sugerida como via de entrada de ligantes em diversos trabalhos [22, 62, 113]. Mecanismos de saída bastante similares a estes foram observados em trabalhos anteriores para diferentes RNs. Estas rotas de saída foram observadas por Kosztin et al. [43] e Carlsson et al. [44] para a dissociação do ácido retinoico da cavidade do RAR, por Martínez et al. [45] para diferentes ligantes do TR e por Genest et al. [47] para a dissociação de um agonista parcial do PPAR $\gamma$ .

Embora os dois caminhos de dissociação da Rosiglitazona observados nas simulações ABF ocorram na mesma região do PPAR $\gamma$ , existem pequenas diferenças entre estes. No caminho 1, a saída do ligante se dá através de uma abertura formada pela reorientação da Hélice H2' e do  $\Omega$ -loop (Figura 6.4). Na estrutura cristalográfica, a H2' e o  $\Omega$ -loop adotam uma conformação fechada, dobrados sobre a superfície do LBD, como mostrado na figuras 6.3B e 6.4A . Entretanto, para permitir a saída do ligante, estas regiões da proteína se rearranjam adotando uma conformação aberta e criando uma cavidade por onde o ligante escapa. Esta abertura é delimitada por resíduos da extremidade N-terminal da H3, pela H2' e pelo  $\Omega$ -loop, como mostrado na figura 6.4B.

Na segunda via de saída, foram observados rearranjos na hélice H2' e no  $\Omega$ -loop bastante similares aos descritos para o caminho I (Figura 6.3C). Ou seja, estes que inicialmente encontram-se em uma conformação fechada, se afastam da superfície do LBD,

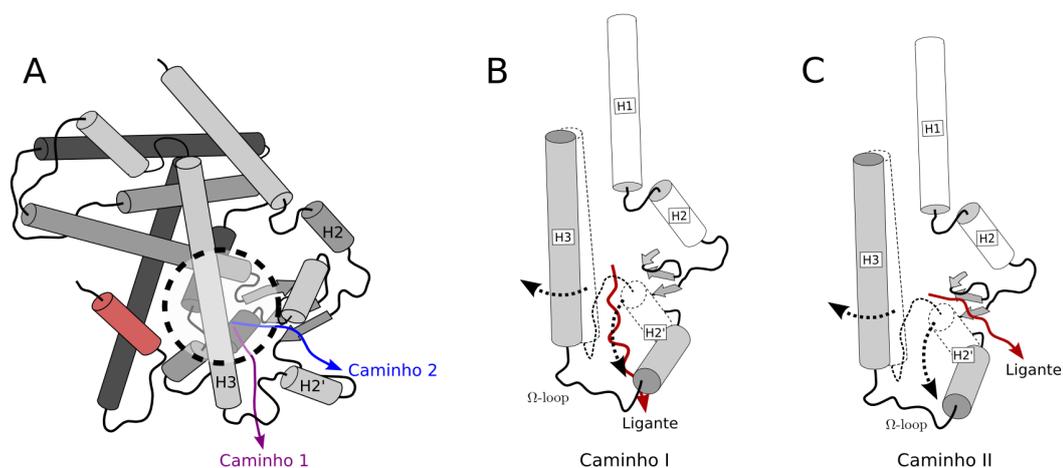


Figura 6.3: (A) Mecanismos de dissociação da Rosiglitazona. Nos dois caminhos obtidos foram observadas perturbações nas hélices H2, H2', H3 e no  $\Omega$ -loop. Entretanto, no caminho I (B), a saída do ligante ocorre através de uma abertura delimitada pelas hélices H2' e H3 e pelo  $\Omega$ -loop. Já o segundo caminho de dissociação (C) é delimitado pelas hélices H2 e H2' e pela fita  $\beta$  S1.

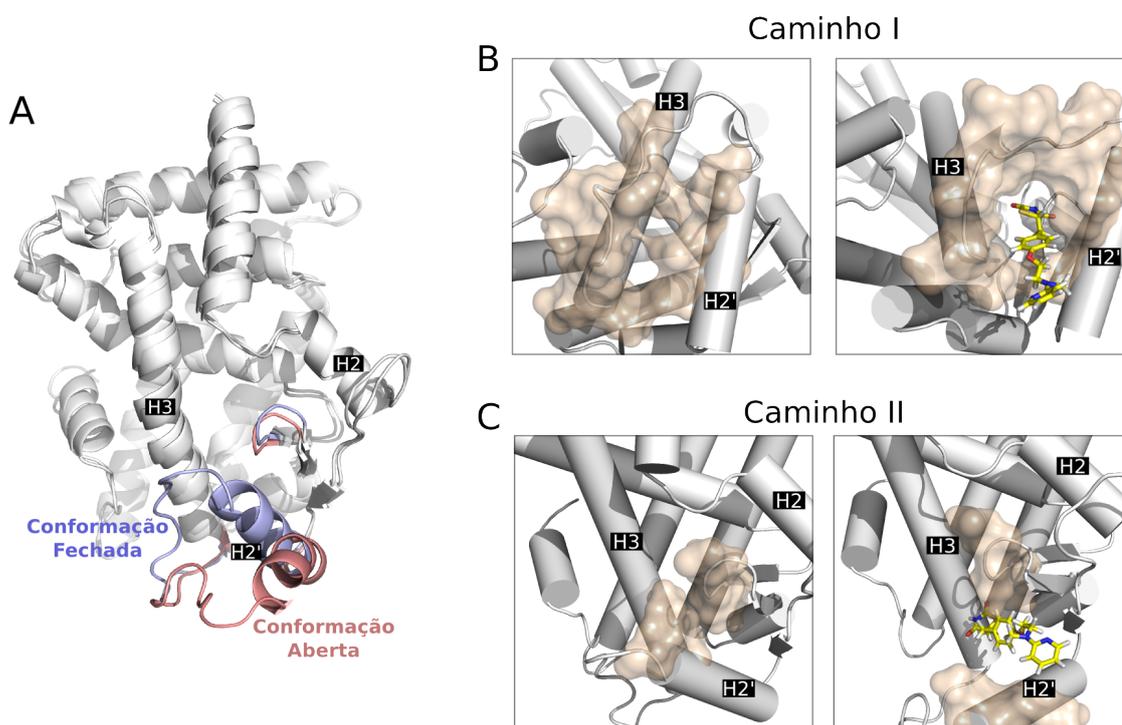


Figura 6.4: (A) Rearranjo conformacional sofrido pela hélice H2' e pelo  $\Omega$ -loop para permitir a saída do ligante. Formação das cavidades de escape do ligante: (B) Caminho I e (C) Caminho II.

adotando uma conformação aberta para permitir a saída do ligante. Entretanto, neste mecanismo, a hélice 2' parece funcionar como uma espécie de portão juntamente com o loop entre as fitas- $\beta$  S2 e S3. Na conformação fechada, a rota saída do ligante é bloqueada pela cadeia lateral dos resíduos Lys261 e Ile262 da H2'. Já na conformação aberta, a hélice H2' se afasta do loop S2-S3 permitindo que o ligante escape (Figura 6.4C).

Embora o rearranjo da H12 na conformação C2 crie uma abertura para o sítio de ligação, não são observados mecanismos de dissociação envolvendo perturbações nessa hélice. Mesmo com o rearranjo da hélice 12, os mesmos caminhos de saída da Rosiglitazona obtidos para a conformação ativa foram observados. Dessa forma, nossos resultados concordam com resultados anteriores e contribuem com a visão de que a dissociação de ligantes em receptores nucleares deve ocorrer em uma região oposta à H12. Em apenas uma simulação iniciada na conformação C2 foi obtido um caminho de dissociação ligeiramente diferente dos Caminhos I e II. Neste mecanismo de dissociação, o ligante segue em um sentido oposto ao do caminho I e escapa através de uma abertura delimitada pelas hélices H2', H3 e H6 e pela fita- $\beta$  S2 (Figura 6.5A). Esta abertura é formada a partir do afastamento das hélices H2' e H6, como mostrado nas figuras 6.5B e C. Este mecanismo de dissociação foi observado também por Genest et al. [47].

### 6.3.2 Energia de dissociação da Rosiglitazona

A partir das simulações ABF foram calculados também os perfis de energia livre da dissociação da Rosiglitazona, tanto para a conformação agonista como para a conformação C2. As curvas de energia livre foram calculadas em função da coordenada de reação utilizada nas simulações, ou seja, da distância entre o centro de massa do ligante e dos resíduos Phe282, Cys285, His353, Ile326 e Leu330, localizados na cavidade de ligação (Figura 6.1). Os perfis de energia livre obtidos estão mostrados na figura 6.6.

Para os dois sistemas, o mínimo global localiza-se em 3.8 Å, entretanto, as curvas

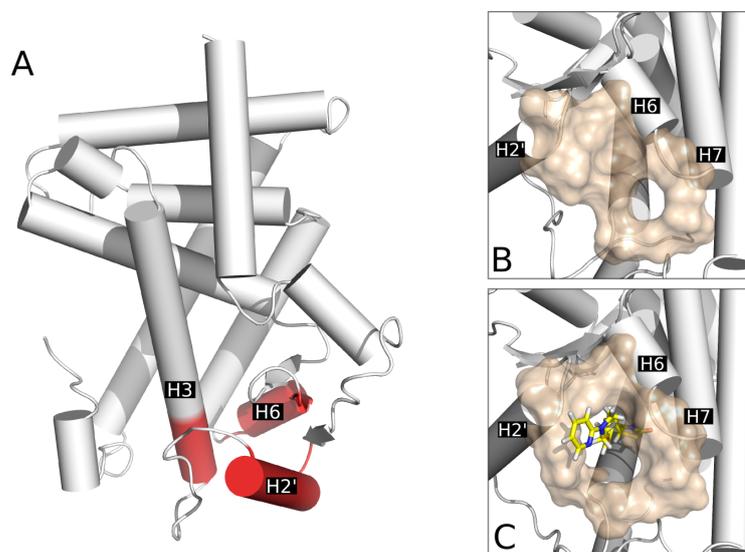


Figura 6.5: Caminho 3: (A) Estrutura do PPAR $\gamma$  na conformação C2 com destaque para as regiões que delimitam o caminho 3. (B) Na estrutura inicial, com a Rosiglitazona no interior da cavidade de ligação, as hélices H2' e H6 estão próximas, bloqueando a saída do ligante. (C) Para permitir que o ligante escape, estas hélices se afastam.

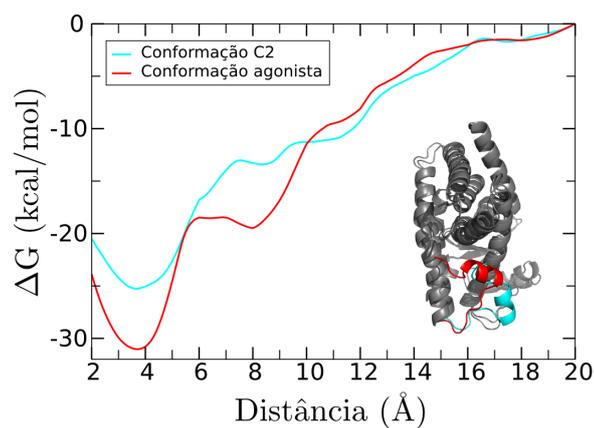


Figura 6.6: Perfil de energia livre da dissociação da Rosiglitazona do sítio de ligação do PPAR $\gamma$  para as conformações agonista (vermelho) e C2 (azul).

diferem em relação a profundidade dos poços de energia. Para compreender as diferenças entre as duas curvas, as conformações associadas ao primeiro mínimo foram selecionadas. Estruturas com coordenadas de reação entre 3.3 e 4.3 Å foram consideradas pertencentes a esta região. A figura 6.7 mostra as conformações adotadas pela Rosiglitazona em torno do mínimo global para as conformações agonista e C2. Para os dois sistemas, o ligante localiza-se na mesma região da cavidade de ligação observada no modelo experimental. Entretanto, ao sobrepor as conformações obtidas para cada sistema, nota-se que a mobilidade da Rosiglitazona em relação ao LBD é maior para a conformação C2. Esta maior mobilidade, em especial para a cabeça polar da Rosiglitazona, pode ser explicada pela perda do contato com a Tyr473 da H12. Porém, como será mostrado a seguir, outros contatos importantes, responsáveis pela estabilização do ligante também são perdidos.

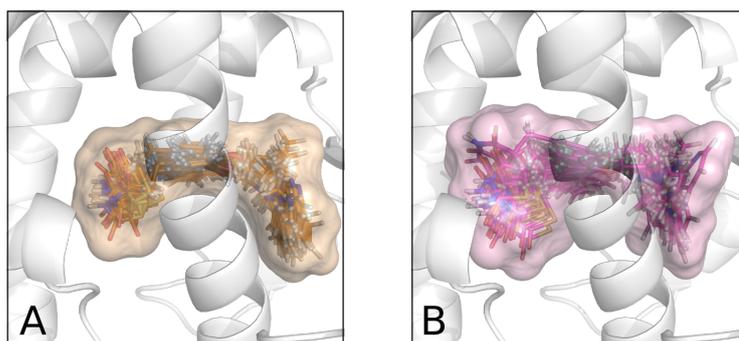


Figura 6.7: Sobreposição das conformações adotadas pela Rosiglitazona em torno do mínimo global para as simulações realizadas com a conformação ativa (A) e C2 (B). Ambos os sistemas estão sobrepostos com a estrutura cristalográfica do PPAR $\gamma$ .

Além da maior mobilidade da Rosiglitazona para a conformação C2, os resíduos da cavidade de ligação adotam diferentes conformações em cada sistema, o que interfere na estabilização do ligante. No modelo cristalográfico do holo-PPAR $\gamma$ , a Rosiglitazona adota uma conformação em forma de “U”, dobrando-se em torno da H3, e interage tanto com a região hidrofóbica, quanto com a região hidrofílica da cavidade de ligação do PPAR $\gamma$ . A estabilização do ligante no interior do sítio de ligação ocorre através de ligações de hidrogênio envolvendo os resíduos Ser289 (H3), His323 (H5), His449 (H11) e Try473 (H12)

e o grupo TZD da Rosiglitazona (cabeça polar) [22], mostradas na figura 6.8A . Além disso, outros aminoácidos carregados localizam-se próximos à cabeça polar da Rosiglitazona e participam indiretamente da estabilização do ligante (Figura 6.8B)

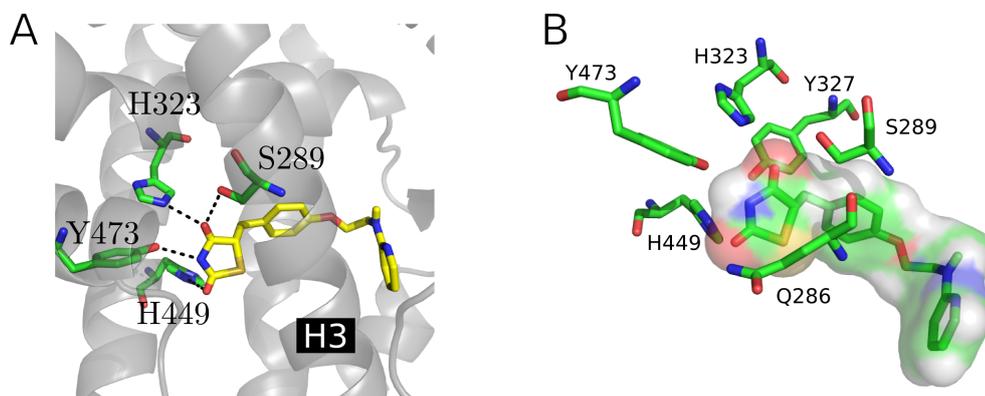


Figura 6.8: (A) Na estrutura cristalográfica PDB: 2PRG, a Rosiglitazona dobra-se em torno da H3 em forma de “U” e realiza ligações de hidrogênio com os resíduos polares Ser289, His323, His449 e Tyr473. (B) Resíduos polares localizados em torno do grupo TZD da Rosiglitazona.

Com o objetivo de analisar a dinâmica das ligações entre a cabeça polar da Rosiglitazona e a região hidrofílica da cavidade de ligação do PPAR $\gamma$  (braço I), as distâncias mínimas entre o ligante e os resíduos polares Gln286, Ser289, His323, Tyr327, His449 e Tyr473 foram calculadas e estão apresentadas na forma de densidade de probabilidade na figura 6.9. Considerando que a distância típica de uma ligação de hidrogênio é de 2 a 3 Å, fica claro que para a conformação ativa, os resíduos analisados encontram-se a distâncias adequadas para a formação de ligações de hidrogênio com o ligante. Entretanto, por serem direcionais, as ligações de hidrogênio dependem também da orientação relativa do ligante e do resíduo de aminoácido. O cálculo do número de ligações de hidrogênio entre o receptor e o ligante mostrou que somente os resíduos Ser289, His449 e Tyr473 formam, de fato, ligações de hidrogênio com a Rosiglitazona. Além disso, a energia eletrostática média entre a Rosiglitazona e cada aminoácido da cavidade de ligação do PPAR $\gamma$  (Figura 6.10) mostra que a interação com estes resíduos é importante para a estabilização da cabeça polar do ligante, especialmente para o PPAR $\gamma$  na conformação agonista.

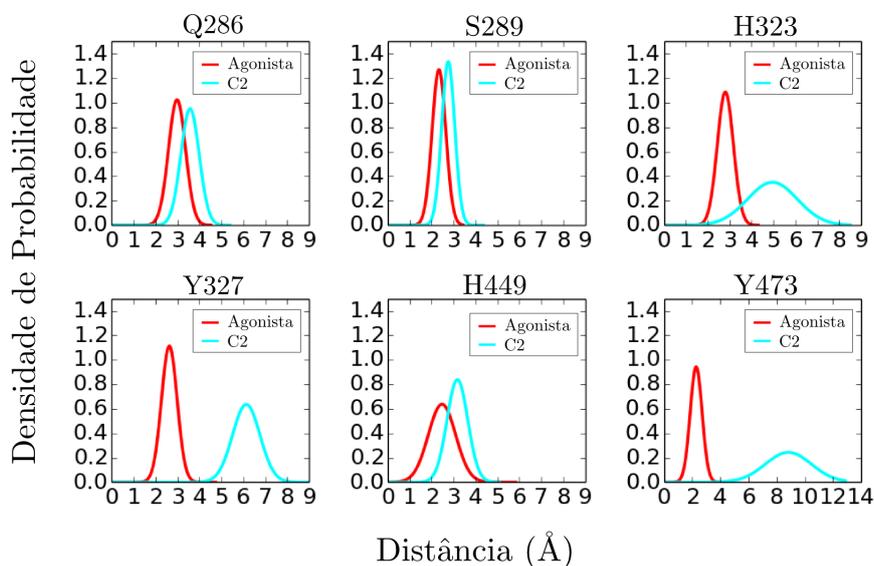


Figura 6.9: (A) Distribuição das distâncias entre a Rosiglitazona e os resíduos Gln286, Ser289, His323, Tyr327, His449 e Tyr473, para a conformação ativa (vermelho) e C2 (azul).

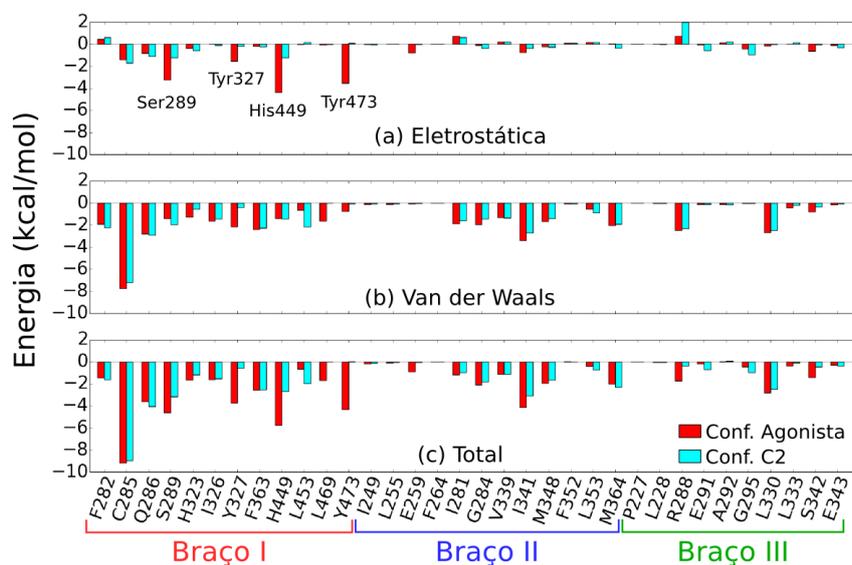


Figura 6.10: Energia média de interação entre a Rosiglitazona e cada resíduo da cavidade de ligação do PPAR $\gamma$ : (A) Eletrostática. (B) Van der Waals. (C) Total.

Por outro lado, na figura 6.9 é observado que, para a conformação C2, os resíduos polares se afastam da Rosiglitazona. Esse afastamento resulta na redução da interação eletrostática entre a proteína e o ligante, em especial para os resíduos Ser289, Tyr327, His449 e Tyr473 (Figura 6.10A). A perda do contato entre o resíduo Tyr473 e o ligante, como esperado, ocorre devido ao reposicionamento da H12 na conformação C2. Entretanto os resultados apresentados nas figuras 6.9 e 6.10 mostram que o rearranjo da H12 afeta também outras regiões da proteína, o que resulta na menor estabilização do ligante no interior da cavidade de ligação.

Embora a Tyr473 da H12 não forme ligações diretas com os resíduos Ser289, Tyr327 e His449, estes interagem indiretamente através da Rosiglitazona ou de moléculas de água. Por exemplo, as figuras 6.9 e 6.10 mostram que na conformação C2, a Tyr327 se afasta do ligante, o que reduz a energia de interação eletrostática média entre estes. A figura 6.11A mostra as posições adotadas pela Tyr327 nas simulações partindo da conformação ativa (verde) e C2 (azul). Na conformação ativa, a posição da Tyr327, próxima ao ligante, é estabilizada indiretamente pela Tyr473 através de uma ligação de hidrogênio intermediada por uma molécula de água, como mostrado na figura 6.11B.

De forma indireta, a Tyr473 da H12 também exerce influência sobre as ligações de hidrogênio formadas entre o ligante e os resíduos Ser289 e His449. Na conformação ativa, quando a Tyr473 forma ligações de hidrogênio com a Rosiglitazona atuando como o doador, o grupo TZD do ligante aproxima-se da His449 (Figura 6.11C). Por outro lado, quando a Tyr473 age como acceptor, para que ocorra a formação da ligação de hidrogênio é necessário que a cabeça polar da Rosiglitazona se reorienta, aproximando-se da Ser289 (Figura 6.11D). Embora na conformação C2 a Ser289 e a His449 não se afastem significativamente da Rosiglitazona, observa-se uma redução importante na energia de interação entre estes resíduos e o ligante. Como mostrado na figura 6.7, a Rosiglitazona é mais flexível e, embora sejam formadas, as ligações de hidrogênio são menos frequentes e menos estáveis. Dessa forma, a Tyr473 parece ser importante para a orientação e estabilização

do ligante no interior do sítio de ligação do PPAR $\gamma$ .

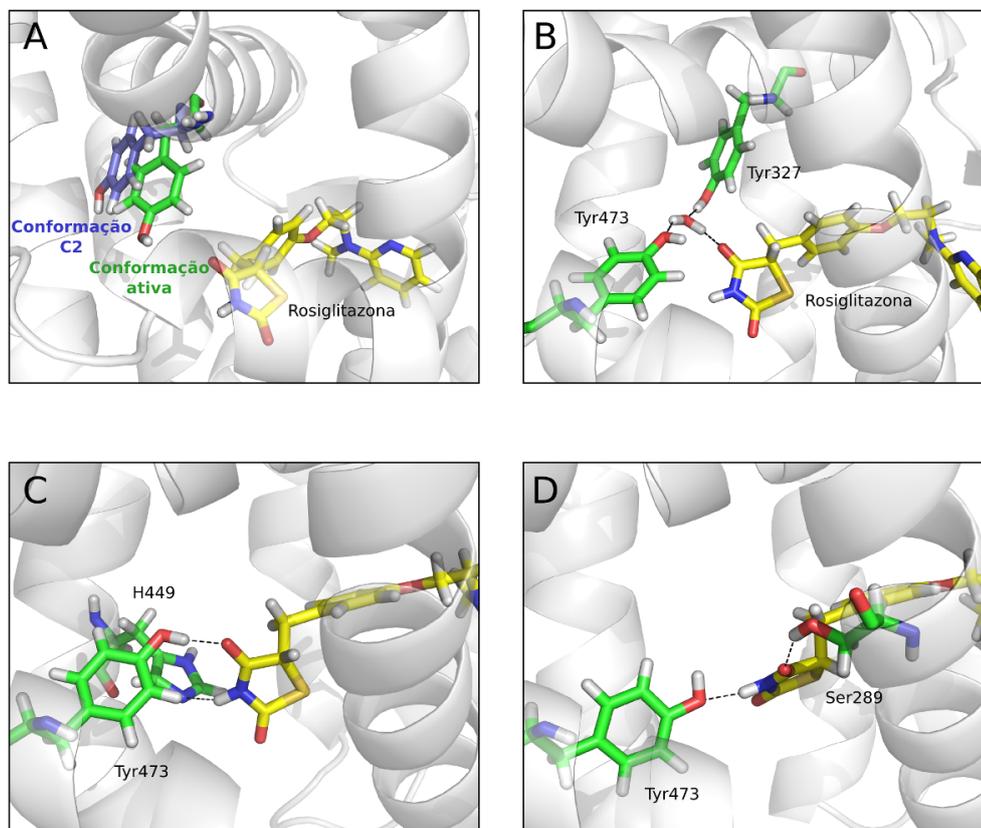


Figura 6.11: (A) Posição do resíduo Tyr327 nas simulações com a conformação ativa (verde) e C2 (azul). (B) Na conformação ativa, os resíduos Tyr327 e Tyr473 formam uma ligação de hidrogênio secundária através de uma molécula de água. Rede de ligações de hidrogênio envolvendo Tyr473, a Rosiglitazona e os resíduos His449 (C) e Ser289 (D).

Uma comparação quantitativa direta entre os valores de energia livre de ligação mostrados na figura 6.6 e valores experimentais não é trivial. A predição acurada de energias livres de ligação ainda é um grande desafio. A grande dificuldade neste cálculo está relacionada com mudanças consideráveis nas entropias conformacional, translacional e rotacional, especialmente do ligante, as quais não são capturadas facilmente através de simulações atômicas. Por outro lado, o cálculo de energias livres relativas é relativamente simples de ser realizado e concordam com resultados experimentais. Entretanto,

para os nossos resultados, mesmo a comparação de quantidades relativas não é trivial, uma vez que experimentalmente não existem resultados para a energia de ligação para a conformação C2. Porém, comparações qualitativas são possíveis. Experimentalmente, foi demonstrado que a mutação Y473A reduz significativamente a afinidade do PPAR $\gamma$  pela Rosiglitazona [114]. Através de ensaios de ligação competitiva, Einstein et al. demonstraram que, para o mutante PPAR $\gamma$ -Y473A, a constante de inibição,  $k_i$ , é cerca de 10 vezes maior do que para o receptor nativo. Essa situação pode ser comparada com o reposicionamento da H12 na conformação C2, onde o contato entre o ligante e a Tyr473 é perdido. Dessa forma, nossos resultados estão de acordo com observações experimentais no que diz respeito a importância da Tyr473 para a estabilização do ligante na cavidade de ligação.

### 6.3.3 Estabilização do complexo PPAR $\gamma$ +Rosiglitazona pelo coativador

No capítulo 4 descrevemos o equilíbrio conformacional da H12 na presença do peptídeo coativador SRC-1. As superfícies de energia livre obtidas sugeriram que associação do PPAR $\gamma$  com ligantes e proteínas coativadoras ocorrem em escalas de tempo distintas. Após a ligação do ligante, conformações agonistas da H12 são selecionadas, favorecendo o recrutamento do coativador. Na presença do coativador, o LBD é ainda mais estabilizado. Dessa forma, para que o ligante se desligue do receptor, é necessário primeiramente, que a associação entre o PPAR $\gamma$  e o coativador seja desfeita. Para verificar essa hipótese e o efeito da presença de coativadores no mecanismo de dissociação da Rosiglitazona, foram realizadas simulações ABF para o complexo PPAR $\gamma$ +CoA+Rosiglitazona.

A curva de energia livre obtida para a dissociação da Rosiglitazona na presença do CoA está mostrada na figura 6.12. Estas simulações mostraram mecanismos de dissociação idênticos aos descritos para os outros sistemas. Entretanto, observa-se uma redução

significativa da energia da energia livre das conformações de menor energia. Essa redução na energia livre mostra que a presença do peptídeo coativador dificulta a saída do ligante, devido a sua capacidade de estabilizar a conformação agonista da H12. Dessa forma, estes resultados concordam com o sugerido pelas superfícies de energia livre e indicam que, de fato, a dissociação de ligantes no PPAR $\gamma$  deve ocorrer para o receptor livre de coativadores.

Para os três sistemas estudados neste capítulo não foram observados mecanismos de saída envolvendo a região da H12. Entretanto, as curvas de energia livre da dissociação da Rosiglitazona indicam que a estabilização da hélice 12 na conformação ativa dificulta a saída do ligante. O reposicionamento desta hélice parece ser importante para permitir que o ligante escape da cavidade de ligação. Assim, nossos resultados indicam a sequência de eventos necessários para a transição do estado ativo (PPAR $\gamma$ +CoA+Rosiglitazona) para o estado inativo (PPAR $\gamma$ +CoR) do receptor: 1) a dissociação do coativador desestabiliza parcialmente a conformação ativa da H12; 2) perturbações locais nesta hélice e enfraquecimento da interação entre o Tyr473 e a Rosiglitazona facilitam a saída do ligante; 3) a completa dissociação do ligante torna a H12 flexível, o que permite a interação com proteínas correpressoras.

## 6.4 Discussões

Neste capítulo foram mostrados os resultados de simulações ABF para o estudo de dissociação da Rosiglitazona do interior da cavidade do PPAR $\gamma$ . Foram apresentados os resultados para dois sistemas: o PPAR $\gamma$  na conformação ativa e na conformação C2. O objetivo de utilizar estas duas conformações foi verificar qual o efeito da posição da H12 na estabilização do ligante, e se o rearranjo desta hélice favoreceria algum mecanismo de dissociação dependente da H12. Nossas simulações mostraram três mecanismos de dissociação da Rosiglitazona independentes da H12, sendo que um destes foi observado

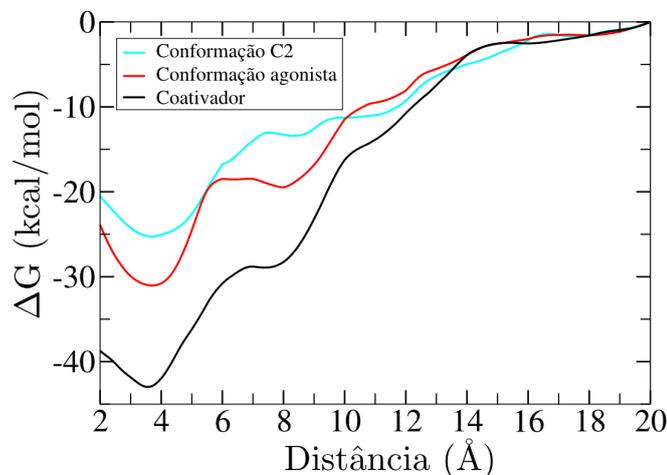


Figura 6.12: Perfil de energia livre da dissociação da Rosiglitazona para as conformações agonista (vermelho) e C2 (azul) e na presença do peptídeo coativador (preto).

somente para a conformação C2. As três rotas de saída ocorrem em uma região oposta à H12 e delimitada pelas hélices H2, H2', H3 e H6 (para o caminho III) e pelo  $\Omega$ -loop. Tanto para o caminho I quanto II, foi observado que a movimentação da hélice H2' é fundamental para permitir a saída do ligante. Para estes dois mecanismos, a hélice H2' e o  $\Omega$ -loop se afastam da superfície do LBD, adotando uma conformação aberta, sendo a diferença fundamental entre os caminhos I e II posição do ligante em relação a H2'. Em apenas uma simulação foi observada a saída do ligante através do caminho III. Na verdade, pode-se dizer que este mecanismo é uma variação do mecanismo I. Em ambos, a Rosiglitazona escapa pela região inferior do receptor, entretanto, para o caminho III são observados o afastamento da hélice H6 e menores perturbações na hélice H2'. Estes resultados estão de acordo com trabalhos anteriores realizados para diferentes receptores nucleares e reforçam a ideia de que o ligante utiliza regiões intrinsecamente flexíveis do receptor para escapar da cavidade de ligação.

Neste capítulo, foi mostrado também o efeito da conformação da hélice 12 na estabilização do complexo Receptor-Ligante. Nossos resultados mostram que, embora o reposicionamento da H12 não afete os aspectos gerais dos mecanismos de dissociação da

Rosiglitazona, a conformação ativa da H12 parece ser fundamental para a estabilização do ligante na cavidade de ligação. As diferenças nas curvas de energia livre para os dois sistemas resultam da perda de interações importantes entre resíduos polares do PPAR $\gamma$  e o grupo TZD da Rosiglitazona. A reorientação da H12 tem como consequência perturbações em outras regiões da proteína. Nossas simulações mostraram que, na conformação ativa, a Tyr473 (H12) interage indiretamente com outros resíduos polares da cavidade de ligação, através de moléculas de água ou do próprio ligante. A importância da ligação de hidrogênio entre a Tyr473 e o ligante para a atividade transcricional do PPAR $\gamma$  é bem conhecida. Esta interação promove a estabilização da conformação ativa e, consequentemente, o recrutamento de proteínas coativadoras. Entretanto, nossos resultados sugerem que, além da estabilização da H12, esta interação está relacionada também com a afinidade de ligação para agonistas totais (que interagem com a H12). Dessa forma, a redução da atividade transcricional observada para PPARs com mutações na Tyr473 é resultado não só da diminuição da capacidade do ligantes de estabilizar a conformação ativa após a ligação no LBD, como também da menor afinidade de ligação com o ligante.

A entrada e saída de ligantes em receptores nucleares não ocorrem necessariamente pelos mesmos mecanismos. Nossos estudos não abordam esta questão, entretanto, poderiam os caminhos de dissociação descritos aqui funcionar em sentido inverso, ou seja, como caminhos de associação? Ao observar as curvas de energia livre da figura 6.6 no sentido inverso (de altos valores da coordenada de reação para baixos valores) nota-se que para a conformação C2, a curva é monotonamente decrescente, não apresentando barreiras energéticas. Para a conformação ativa, somente uma pequena barreira é observada em aproximadamente 7 Å. Supondo que o ligante acessa a cavidade de ligação do receptor pelos mecanismos descritos aqui, o início deste processo seria guiado predominantemente por interações hidrofóbicas e ocorreria de forma similar para os dois sistemas. Entretanto, a abertura da hélice 12 na conformação C2 parece facilitar o acesso do ligante à região polar da cavidade de ligação. As interações polares observadas na conformação ativa seriam

---

responsáveis pela estabilização do complexo Receptor+Ligante. A associação do receptor com proteínas coativadoras completariam a estabilização do complexo PPAR $\gamma$ +Ligante.

## Capítulo 7

# Conclusões

Receptores nucleares constituem uma superfamília de proteínas que tem como função regular a transcrição de genes. São proteínas formadas por três domínios distintos. O LBD é o maior e mais complexo domínio dos receptores nucleares e tem como principal função a associação seletiva com moléculas hidrofóbicas, as quais regulam a atividade do receptor. Devido à sua grande diversidade e ao seu relevante papel biológico, RNs tornam-se alvos interessantes para o desenvolvimento de fármacos.

As primeiras estruturas cristalográficas de LBDs foram obtidas na década de 90. A partir da determinação destas estruturas, o efeito dos ligantes na estrutura do receptor, e em especial na hélice C-terminal do LBD (H12), passou a ser amplamente estudado. Entretanto, estudos experimentais são insuficientes para a completa elucidação das relações entre a estrutura e a atividade dos receptores nucleares. O entendimento da função destas proteínas em solução requer uma visão dinâmica de suas estruturas.

Embora diversos estudos experimentais e teóricos mostrem a estabilização da conformação ativa da H12 na presença de agonistas, pouco se sabe sobre as conformações desta hélice na ausência de ligantes. Nossa tentativa de descrever o equilíbrio conformacional da H12 do PPAR $\gamma$  teve início com o trabalho “Dynamics of nuclear receptor helix-12 switch of transcription activation by modeling time-resolved fluorescence anisotropy decays”. Neste trabalho demonstramos que, na ausência de ligantes, estruturas com a H12 em conformações estendidas (similares a estrutura cristalográfica do apo-RXR)

---

não são consistentes com a anisotropia de fluorescência resolvida na tempo observada experimentalmente. Dessa forma, limitamos o espaço conformacional da H12 do PPAR $\gamma$  para estruturas exibindo esta hélice dobrada sobre a superfície do LBD. Entretanto, uma descrição mais detalhada para a dinâmica da H12 ainda era necessária.

Com o objetivo de descrever o equilíbrio conformacional da H12, realizamos simulações ABF para o LBD do PPAR $\gamma$  na presença e na ausência de Rosiglitazona, coativadores e correpressores. Através das superfícies de energia livre pudemos descrever as conformações acessíveis em cada condição e entender a influência de ligantes e correguladores no espaço conformacional da H12. Nossos resultados mostraram que para o receptor livre de ligantes, a H12 é flexível e múltiplas conformações são acessíveis. Além disso, demonstramos que conformações similares à conformação agonista correspondem à estrutura de menor energia para esse sistema, o que justifica a atividade basal do PPAR $\gamma$ . Por outro lado, na presença de Rosiglitazona, somente estruturas exibindo a H12 na conformação ativa são acessíveis. Pequenas perturbações da posição da H12 levam a um grande aumento na diferença de energia livre em relação ao mínimo global. Portanto, o ligante estabiliza fortemente a conformação ativa em relação às demais conformações acessíveis para o apo-PPAR $\gamma$ .

Um efeito similar sobre a superfície de energia livre foi observado para o PPAR $\gamma$  na presença do peptídeo coativador. Assim como na presença de Rosiglitazona, na presença do CoA somente conformações similares à observada no modelo cristalográfico são acessíveis a temperatura ambiente. A estabilização da conformação ativa pelo ligante expõe a superfície de ligação com o coativador. A interação com o CoA estabiliza a mesma conformação, entretanto, por mecanismos distintos. Assim, agonistas e coativadores possuem papel aditivo na estabilização da conformação ativa. A comparação entre as superfícies de energia livre na presença de Rosiglitazona e do peptídeo coativador sugerem que a associação entre estes e o receptor ocorrem em escalas de tempo distintas. A curva de energia livre de dissociação da Rosiglitazona na presença do CoA reforça esse resultado.

---

Embora a dissociação ocorra por regiões da proteína que não envolvem a H12, a presença do coativador parece dificultar a saída do ligante.

Nossos resultados mostraram que a associação com o correpressor altera significativamente a superfície de energia livre. Conformações acessíveis na ausência de ligantes, na presença de Rosiglitazona ou na presença do peptídeo coativador tornam-se desfavoráveis. Por outro lado, na presença do correpressor, estruturas com um grande deslocamento da H12 tornam-se acessíveis. Portanto, o correpressor induz uma transição conformacional no LBD. Nossos resultados também mostraram a preferência do receptor pelo correpressor em relação ao coativador, quando a H12 encontra-se deslocada da conformação ativa.

Para o PPAR $\gamma$  livre de ligantes e proteínas correguladoras foi observado um conjunto de conformações com a H12 parcialmente deslocada da conformação ativa. Estas conformações, bastante frequentes e separadas do mínimo global por poucas kcal mol $^{-1}$  chamaram a atenção especialmente por apresentar uma maior acessibilidade a cavidade de ligação, devido ao reposicionamento da H12. As simulações ABF para o estudo da dissociação da Rosiglitazona do interior do LBD do PPAR $\gamma$  mostraram a existência de dois caminhos de saída, ambos envolvendo a movimentação das hélices H2, H2' e H3. Os caminhos obtidos foram independentes da conformação inicial da H12 (agonista ou C2). Entretanto, as diferenças nas curvas de energia livre para as duas conformações mostraram que embora o reposicionamento da H12 não altere os aspectos gerais do mecanismo de dissociação, ainda assim pode ser uma etapa no processo de saída do ligante.

Em conjunto com resultados experimentais e de simulações, este trabalho contribui para a construção de um modelo para o equilíbrio conformacional da H12 de receptores nucleares. Os resultados obtidos nesta tese permitem a formulação de novas questões. Sabe-se que agonistas parciais estabilizam o LBD do PPAR $\gamma$  de maneiras distintas. A metodologia apresentada nesse trabalho pode ser utilizada para o estudo da variabilidade conformacional deste receptor na presença de diferentes ligantes. Outro tópico interessante de estudo é o efeito de ligantes antagonistas sobre o equilíbrio conformacional da

H12. Em geral, antagonistas inibem a atividade do receptor impedindo que a H12 adote a conformação ativa e estabilizando conformações que suportam a interação com proteínas corressoras. Assim como agonistas e coativadores possuem papel aditivo na estabilização da conformação ativa, antagonistas e corressores também devem possuir papéis complementares, porém na estabilização de estruturas com a H12 deslocada.

## Apêndice A

# Demonstração da equação 3.18

Este apêndice é baseado no capítulo 4 do livro “*Free Energy Calculations: Theory and Applications in Chemistry and Biology*” [95] e no artigo “*Adaptive biasing force method for scalar and vector free energy calculations*” [96].

Dada uma coordenada de reação  $\xi$ , a energia livre é definida como:

$$G(\xi) = -k_B T \ln \int e^{-\beta H(\mathbf{x}, \mathbf{p})} \delta(\xi - \xi(\mathbf{x})) d\mathbf{x} d\mathbf{p} \quad (\text{A.1})$$

onde  $\mathbf{x}$  e  $\mathbf{p}$  representam, respectivamente, as coordenadas cartesianas e o momento de todas as partículas,  $H$  a hamiltoniana do sistema,  $k_B$  a constante de Boltzmann e  $T$  a temperatura. A função Delta de Dirac  $\delta(\xi - \xi(\mathbf{x}))$  significa que a integral é realizada sobre todas as coordenadas  $\mathbf{x}$  tais que  $\xi(\mathbf{x}) = \xi$ . A integração sobre  $\mathbf{p}$  pode ser removida, uma vez que só desloca  $G$  por uma constante:

$$G(\xi) = -k_B T \ln \int e^{-\beta U(\mathbf{x})} \delta(\xi - \xi(\mathbf{x})) d\mathbf{x} + \text{const.} \quad (\text{A.2})$$

Entretanto, a função delta não é conveniente para se tratar matematicamente. A equação A.2 pode ser simplificada através da definição de coordenadas generalizadas com a forma  $(\xi, q_1, \dots, q_{N-1})$ . Exemplos clássicos são coordenadas esféricas  $(r, \theta, \varphi)$ , cilíndricas  $(r, \theta, z)$ , etc. Para sistemas proteicos, coordenadas são normalmente definidas em

termos de funções que envolvem um conjunto de átomos. Introduzindo as coordenadas generalizadas na equação A.2 é obtido:

$$G(\xi) = -k_B T \ln \int e^{-\beta U(\xi)} |J| dq_1 \cdots dq_{N-1} \quad (\text{A.3})$$

O termo  $|J|$  é o determinante da matriz Jacobiana da mudança de coordenadas cartesianas para coordenadas generalizadas  $(\xi, q_1, \dots, q_{N-1})$ . Esse termo mede a mudança no elemento de volume entre  $d\mathbf{x}$  e  $d\xi dq_1 \cdots dq_{N-1}$ . Por exemplo, para coordenadas polares,  $|J| = r$  e, portanto,  $dx dy = r dr d\theta$ .

Derivando a equação A.3 em relação a  $\xi$ :

$$\frac{dG(\xi)}{d\xi} = \frac{\int \frac{\partial}{\partial \xi} (-k_B T e^{-\beta U(\xi)} |J|) dq_1 \cdots dq_{N-1}}{\int e^{-\beta U(\xi)} |J| dq_1 \cdots dq_{N-1}} \quad (\text{A.4})$$

$$= \frac{\int \left( \frac{\partial U(\xi)}{\partial \xi} |J| - k_B T \frac{\partial |J|}{\partial \xi} \right) e^{-\beta U(\xi)} dq_1 \cdots dq_{N-1}}{\int e^{-\beta U(\xi)} |J| dq_1 \cdots dq_{N-1}} \quad (\text{A.5})$$

Retornando para a coordenada cartesiana:

$$\frac{dG(\xi)}{d\xi} = \frac{\int \left( \frac{\partial U}{\partial \xi} - k_B T \frac{1}{|J|} \frac{\partial |J|}{\partial \xi} \right) e^{-\beta U} \delta(\xi - \xi(\mathbf{x})) d\mathbf{x}}{\int e^{-\beta U} \delta(\xi - \xi(\mathbf{x})) d\mathbf{x}} \quad (\text{A.6})$$

$$= \frac{\int \left( \frac{\partial U}{\partial \xi} - k_B T \frac{\partial \ln |J|}{\partial \xi} \right) e^{-\beta U} \delta(\xi - \xi(\mathbf{x})) d\mathbf{x}}{\int e^{-\beta U} \delta(\xi - \xi(\mathbf{x})) d\mathbf{x}} \quad (\text{A.7})$$

$$= \left\langle \frac{\partial U}{\partial \xi} - k_B T \frac{\partial \ln |J|}{\partial \xi} \right\rangle_{\xi} \quad (\text{A.8})$$

A derivada da energia livre é composta por dois termos: o primeiro,  $(\partial U / \partial \xi)$ , é a

força mecânica atuando ao longo de  $\xi$ . Já o termo  $-k_B T \partial \ln |J| / \partial \xi$  representa mudança no elemento de volume e fornece uma contribuição entrópica.

## Referências Bibliográficas

- [1] Gronemeyer, H.; Gustafsson, J. A.; Laudet, V. Principles for the modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3*, 950-964.
- [2] Bain, L.; Henenghan, A. F.; Connaghan-Jones, K. D.; Miura, M. T. Nuclear receptor structure: implications for function. *Annu. Rev. Physiol.* **2007**, *69*, 201-220.
- [3] Escriva, H.; Bertrand, S.; Laudet, V. The evolution of the nuclear receptor superfamily. *Essays Biochem.* **2004**, *40*, 11-26.
- [4] Glass, C. K.; Ogawa, S. Combinatorial roles of nuclear receptors in inflammation and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **2006**, *6*, 44-55.
- [5] Huang, P.; Chandra, V.; Rastinejad, F. Structural overview of the nuclear receptor superfamily: insights into physiology and therapeutics. *Annu. Rev. Physiol.* **2010**, *72*, 247-272.
- [6] Kojetin, D. J.; Burris, T. P. Small molecule modulation of nuclear receptor conformational dynamics: implications for function and drug discovery. *Mol. Pharmacol.* **2013**, *83*, 1-8.
- [7] Garcia-Becerra, R.; Santos, N.; Díaz, L.; Camacho, J. Mechanisms of Resistance to Endocrine Therapy in Breast Cancer: Focus on Signaling Pathways, mRNAs and Genetically Based Resistance. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 108-145.

- [8] Perissi, V.; Rosenfeld, M. G. Controlling nuclear receptors: the circular logic of cofactor cycles. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2005**, *6*, 542-554.
- [9] McEwan, I. J. Sex, drugs and gene expression: signalling by members of the nuclear receptor superfamily. *Essays Biochem.* **2004**, *40*, 1-10.
- [10] Aranda, A.; Pascual, A. Nuclear hormone Receptor and gene expression. *Physiol. Rev.* **2001**, *81*, 1269-1304.
- [11] Williams, S. P.; Sigler, P. B. Atomic structure of progesterone complexed with its receptor. *Nature* **1998**, *393*, 392-396.
- [12] Tata, J. R. Signalling through nuclear receptors. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2002**, *3*, 702-710.
- [13] Chandra, V.; Huang, P.; Hamuro, Y.; Raghuram, S.; Wang, Y.; Burris, T. P.; Rastinejad, F. Structure of the intact PPAR $\gamma$ -RXR nuclear receptor complex on DNA. *Nature* **2008**, *456*, 350-356.
- [14] Pawlak, M.; Lefebvre, P.; Staels, B. General molecular biology and architecture of nuclear receptors. *Curr. Top. Med. Chem.* **2012**, *12*, 486-504.
- [15] Ribeiro, R. C.; Kushner, P.J.; Baxter, J. D. The nuclear hormone receptor gene superfamily. *Annu. Rev. Med.* **1995**, *46*, 443-453.
- [16] Schwabe, J. W.; Chapman, L.; Finch, J. T.; Rhodes, D. The crystal structure of the estrogen receptor DNA-binding domain bound to DNA: how receptors discriminate between their response elements. *Cell.* **1993**, *75*, 567-578.
- [17] Khorasanizadeh, S.; Rastinejad, F. Nuclear-receptor interactions on DNA-response elements. *Trends Biochem. Sci.* **2001**, *26*, 384-390.

- [18] Bourguet, W.; Ruff, M.; Chambom, P.; Gronemeyer, H.; Moras, D. Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR $\alpha$ . *Nature* **1995**, *375*, 377-382.
- [19] Renaud, J. P.; Rochel, N.; Ruff, M.; Vivat, V.; Chambon, P.; Gronemeyer, H.; Moras, D. Crystal structure of the RAR $\gamma$  ligand-binding domain bound to all trans retinoic. *Nature* **1995**, *378*, 681-689.
- [20] Wagner, R. L.; Apriletti, J. W.; McGrath, M. E.; West, B. L.; Baxter, J. D.; Fletterick, R. J. A structural role for hormone in the thyroid hormone receptor. *Nature* **1995**, *378*, 690-697.
- [21] Protein Data Bank. Search for "nuclear receptor ligand-binding domain". <http://www.rcsb.org/pdb/>, Janeiro, 2016.
- [22] Nolte, R. T.; Wisely, G. B.; Westin, S.; Cobb, J. E.; Lambert, M. H.; Kurokawa, R.; Rosenfeld, M. G.; Willson, T. M.; Glass, C. K.; Milburn, M. V. Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ . *Nature* **1998**, *395*, 137-143.
- [23] Mackinnon, J. A. G.; Gallastegui, N.; Osguthorpe, D. J.; Hagler, A. T.; Perpina, E. E. Allosteric mechanisms of nuclear receptors: insights from computational simulations. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2014**, *393*, 75-82.
- [24] Nagy, L.; Schwabe, J. Mechanism of the nuclear receptor molecular switch. *Trends Biochem. Sci.* **2004**, *29*, 317-324.
- [25] Moras, D.; Gronemeyer, H. The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **1998**, *10*, 348-391.
- [26] Tanenbaum, D. M., Wang, Y.; Williams, S. P.; Sigler, P. B. Crystallographic comparison of the estrogen and progesterone receptor's ligand binding domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95*, 5998-6003.

- [27] Renaud, J. P.; Moras, D. Structural studies on nuclear receptors. *Cell. Mol. Life Sci.* **2000**, *57*, 1748-1769.
- [28] Steinmetz, A. C.; Renaud J. P.; Moras, D. Structural studies on nuclear rStructural studies on nuclear receptors. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2001**, *30*, 329-359.
- [29] Rastinejad, F.; Ollendorff, V.; Polikarpov, I. Nuclear receptor full-length architectures: confronting myth and illusion with high resolution. *Trends Biochem. Sci.* **2015**, *40*, 16-24.
- [30] Kallenberger, B. C.; Love, J. D.; Chatterjee, V. K. K.; Schwabe, J. W. R. A Dynamic Mechanism of Nuclear Receptor Activation and Its Perturbation in Human Disease. *Nat. Struct. Biol.* **2003**, *10*, 136-140.
- [31] Johnson, B. A.; Wilson, E. M.; Li, Y.; Moller, D. E.; Smith, R. G.; Zhou, G. Ligand-Induced Stabilization of PPAR $\gamma$  Monitored by NMR Spescroscopic: Implications for Nuclear Receptor Activation. *J. Mol. Biol.* **2000**, *298*, 187-194.
- [32] Hughes, T. S.; Chalmers, M. J.; Novick, S.; Kuruvilla, D. S.; Chang, M. R.; Kame-necka, T. M.; Rance, M.; Johnson, B. A.; Burris, T. P.; Griffin, P. R.; et al. Ligand and Receptor Dynamics Contribute To the Mechanism of Graded PPAR $\gamma$  Agonism. *Structure.* **2012**, *20*, 139-150.
- [33] Lu, J.; Cistola, D. P.; Li, E. Analysis of ligand binding and protein dynamics of human retinoid X receptor alpha ligand-binding domain by nuclear magnetic resonance. *Biochemistry.* **2006**, *45*, 1629-1639.
- [34] Batista, M. R. B.; Martínez, L. Dynamics of Nuclear Receptor Helix-12 Switch of Transcription Activation by Modeling Time-Resolved Fluorescence Anisotropy Decays. *Biophys. J.* **2013**, *105*, 1670-1680.
- [35] Wang, J.; Shao, Q.; Xu, Z.; Liu, Y.; Yang, Z.; Cossins, B. P.; Jiang, H.; Chen, K.; Shi, J.; Zhu, W. Exploring Transition Pathway and Free-Energy Profile of Large-Scale

- Protein Conformational Change by Combining Normal Mode Analysis and Umbrella Sampling Molecular Dynamics. *J. Phys. Chem. B.* **2014**, *118*, 132-143.
- [36] Koshland, D. E. Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1958**, *44*, 98-104.
- [37] Bucher D.; Grant, B. J.; Mccammon, J. A. Induced Fit or Conformational Selection? The Role of the Semi-Closed State in the Maltose Binding Protein. *Biochemistry.* **2011**, *50*, 10530-10539.
- [38] Nikolenko, J.; Krasnov, A. Nuclear receptors: Structure and mechanisms of action. *Genetika.* **2007**, *43*, 308-316.
- [39] Li, Y.; Lambert, M. H.; Xu, H. E. Activation of Nuclear Receptors: A Perspective from Structural Genomics. *Structure.* **2003**, *11*, 741-746.
- [40] Nettles, K. W.; Greene, G. L. Ligand Control of Coregulator Recruitment To Nuclear Receptors. *Annu. Rev. Physiol.* **2005**, *67*, 309-333.
- [41] Martínez, L., Webb, P.; Polikarpov, I.; Skaf, M. S. Molecular Dynamics Simulations of Ligand Dissociation From Thyroid Hormone Receptors: Evidence of the Likeliest Escape Pathway and Its Implications for the Design of Novel Ligands. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 23-26.
- [42] Blondel, A.; Renaud, J. P.; Fischer, S.; Moras, D.; Karplus, M. Retinoic Acid Receptor: A Simulation Analysis of Retinoic Acid Binding and the Resulting Conformational Changes. *J. Mol. Biol.* **1999**, *291*, 101-115.
- [43] Kosztin, D.; Izrailev, S.; Schulten, K. Unbinding of Retinoic Acid From Its Receptor Studied by Steered Molecular Dynamics. *Biophys. J.* **1999**, *76*, 188-197.
- [44] Carlsson, P.; Burendahi, S.; Nilsson, L. Unbinding of retinoic acid from the retinoic

- acid receptor by random expulsion molecular dynamics. *Biophys. J.* **2006**, *91*, 3151-3161.
- [45] Martínez, L.; Sonoda, M. T.; Webb, P.; Baxter, J. D.; Skaf, M. S.; Polikarpov, I. Molecular Dynamics Simulations Reveal Multiple Pathways of Ligand Dissociation from Thyroid Hormone Receptors. *Biophys. J.* **2005**, *89*, 2011-2023.
- [46] Martínez, L.; Polikarpov, I.; Skaf, M. S. Only Subtle Protein Conformational Adaptations Are Required for Ligand Binding to Thyroid Hormone Receptors: Simulations Using a Novel Multipoint Steered Molecular Dynamics Approach. *J. Phys. Chem. B.* **2008**, *112*, 10741-10751.
- [47] Genest, D.; Garnier, N.; Arrault, A.; Marot, C.; Morin-Allory, L.; Genest, M. Ligand-escape pathways from the ligand-binding domain of PPARgamma receptor as probed by molecular dynamics simulations. *Eur. Biophys.* **2008**, *37*, 369-379.
- [48] Perakyla, M. Ligand unbinding pathways from the vitamin D receptor studied by molecular dynamics simulations. *Eur. Biophys.* **2009**, *38*, 185-198.
- [49] Li, W.; Fu, J.; Cheng, F.; Zheng, M.; Zhang, J.; Liu, G.; Tang, Y. Unbinding pathways of GW4064 from human farnesoid X receptor as revealed by molecular dynamics simulations. *J. Chem. Inf. Model.* **2012**, *52*, 3043-3052.
- [50] Michalik, L.; Auwerx, J.; Berger, J. P.; Chatterjee, V. K.; Glass, C. K.; Gonzalez, F.J.; Grimaldi, P. A.; Kadowaki, T.; Lazar, M. A.; O'Rahilly, S. et al. International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. *Pharmacol. Rev.* **2006**, *58*, 726-741.
- [51] Desvergne, B.; Wahli, W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr. Rev.* **1999**, *20*, 649-688.
- [52] Christodoulides, C.; Vidal-Puig, A. PPARs and adipocyte function. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2010**, *318*, 61-68.

- [53] Tontonoz, P.; Spiegelman, B. M. Fat and beyond: the diverse biology of PPAR $\gamma$ . *Annu. Rev. Biochem.* **2008**, *77*, 289-312.
- [54] Wang, Y. X. PPARs: diverse regulators in energy metabolism and metabolic diseases. *Cell. Res.* **2010**, *20*, 124-137.
- [55] Zoete, V.; Grosdidier, A.; Michielin, O. Peroxisome proliferator-activated receptor structures: ligand specificity, molecular switch and interactions with regulators. *Cell. Res.* **2007**, *1771*, 915-925.
- [56] Kersten, S.; Desvergne, B.; Wahli, W. Roles of PPARs in health and disease. *Cell. Res.* **2000**, *405*, 421-424.
- [57] Lehrke, M.; Lazar, M. A. The many faces of PPAR $\gamma$ . *Cell. Res.* **2005**, *123*, 993-999.
- [58] Brunning, J. B.; Chalmers, M. J.; Prasad, S.; Busby, S. A.; Kamenecka, T. M.; Nettles, K. W.; Griffin, P. R. Partial Agonists Activate PPAR $\gamma$  Using Helix 12 Independent Mechanism. *Structure* **2007**, *15*, 1258-1271.
- [59] Amato, A. A.; Rajagopalan, S.; Lin, J. Z.; Carvalho, B. M.; Figueira, A. C.; Lu, J.; Ayers, S. D.; Mottin, M.; Silveira, R. L.; Souza, P. C. et al. GQ-16, a novel peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  ligand, promotes insulin sensitization without weight gain. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 28169-28179.
- [60] Liberato, M. V.; Nascimento, A. S.; Ayers, S. D.; Lin, J. Z.; Cvorovic, A.; Silveira, R. L.; Martínez, L.; Souza, P. C.; Saidenberg, D.; Deng, T. et al. Medium chain fatty acids are selective peroxisome proliferator activated receptor PPAR $\gamma$  activators and pan-PPAR partial agonists. *J. PLoS One* **2012**, *7*, e36297.
- [61] Choi, J. H.; Banks, A. S.; Estall, J. L.; Kajimura, S.; Boström, P.; Laznik, D.; Ruas, J. L.; Chalmers, M. J.; Kamenecka, T. M.; Blüher, M. et al. Anti-diabetic drugs inhibit obesity-linked phosphorylation of PPAR $\gamma$  by Cdk5. *Nature*. **2010**, *466*, 451-456.

- [62] Willson, T. M.; Lambert, M. H.; Kliewer, S. A. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and metabolic disease. *Annu. Rev. Biochem.* **2001**, *70*, 341-370.
- [63] Gampe, R. T.; Montana, V. G.; Lambert, M. H.; Miller, A. B.; Bledsoe, R. K.; Milburn, M. V.; Kliewer, S. A.; Wilson, T. M.; Xu, H. E. Asymmetry in the PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$  crystal structure reveals the molecular basis of heterodimerization among nuclear receptors. *Mol. Cell.* **2000**, *5*, 545-555
- [64] Itoh, T.; Fairall, L.; Amin, K.; Inaba, Y.; Szanto, A.; Balint, B. L.; Nagy, L.; Yamamoto, K.; Schwabe, J. W. Structural basis for the activation of PPAR $\gamma$  by oxidized fatty acids. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2008**, *15*, 924-931
- [65] Waku, T.; Shiraki, T.; Oyama, T.; Fujimoto, Y.; Maebara, K.; Kamiya, N.; Jingami, H.; Morikawa, K. Structural insight into PPAR $\gamma$  activation through covalent modification with endogenous fatty acids. *J. Mol. Biol.* **2009**, *385*, 188-199.
- [66] Waku, T.; Shiraki, T.; Oyama, T.; Maebara, K.; Nakamori, R.; Morikawa, K. The nuclear receptor PPAR $\gamma$  individually responds to serotonin- and fatty acid-metabolites. *EMBO J.* **2010**, *29*, 3395-407.
- [67] Lu, I. L.; Huang, C. F.; Peng, Y. H.; Lin, Y. T.; Hsieh, H. P.; Chen, C. T.; Lien, T. W.; Lee, H. J.; Mahindroo, N.; Prakash, E. et al. Structure-based drug design of a novel family of PPAR $\gamma$  partial agonists: virtual screening, X-ray crystallography, and in vitro/in vivo biological activities. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 2703-2712.
- [68] Berger, J. P.; Petro, A. E.; Macnaul, K. L.; Kelly, L. J.; Zhang, B. B.; Richards, K.; Elbrecht, A.; Johnson, B. A.; Zhou, G.; Doebber, T. W. et al. Distinct Properties and Advantages of a Novel Peroxisome Proliferator-Activated Protein  $\gamma$  Selective Modulator. *Mol. Endocrinol.* **2003**, *17*, 662-676.
- [69] Montanari, R.; Saccoccia, F.; Scotti, E.; Crestani, M.; Godio, C.; Gilardi, F.; Loiodice, F.; Fracchiolla, G.; Laghezza, A.; Tortorella, P.; et al. Crystal Structure of

- the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) Ligand Binding Domain Complexed With a Novel Partial Agonist: A New Region of the Hydrophobic Pocket Could Be Exploited For Drug Design. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 7768-7776.
- [70] Oberfield, J. L.; Collins, J. L.; Holmes, C. P.; Goreham, D. M.; Cooper, J. P.; Cobb, J. E.; Lenhard, J. M.; Hull-Ryde, E. A.; Mohr, C. P.; Blanchard, S. G. et al. A peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand inhibits adipocyte differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1999**, *25*, 6102-6106.
- [71] Pang, X.; Shu, Y.; Niu, Z.; Zheng, W.; Wu, H.; Lu, Y.; Shen, P. PPAR $\gamma$ 1 phosphorylation enhances proliferation and drug resistance in human fibrosarcoma cells. *Exp. Cell. Res.* **2014**, *322*, 30-38.
- [72] Ahmadian, M.; Suh, J. M.; Hah, N.; Liddle, C.; Atkins, A. R.; Downes, M.; Evans, R. M. PPAR $\gamma$  signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nat. Med.* **2013**, *19*, 557-566.
- [73] Mottin, M.; Souza, P. C.; Skaf, M. S. Molecular Recognition of PPAR $\gamma$  by Kinase Cdk5/p25: Insights from a Combination of Protein-Protein Docking and Adaptive Biasing Force Simulations. *J. Phys. Chem. B.* **2015**, *119*, 8330-8339.
- [74] Tamrazi, A.; Carlson, K. E.; Rodriguez, A. L.; Katzenellenbogen, J. A. Coactivator proteins as determinants of estrogen receptor structure and function: spectroscopic evidence for a novel coactivator-stabilized receptor conformation. *Mol. Endocrinol.* **2005**, *19*, 1516-1528.
- [75] Xu, H. E.; Stanley, T. B.; Montana, V. G.; Lambert, M. H.; Shearer, B. G.; Cobb, J. E.; McKee, D. D.; Galardi, C. M.; Plunket, K. D.; Nolte, R. T. et al. Structural basis for antagonist-mediated recruitment of nuclear co-repressors by PPAR $\alpha$ . *Nature* **2002**, *14*, 813-817.

- [76] Karplus, M.; Kuriyan, J. Molecular dynamics and protein function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2005**, *10*, 6679-6685.
- [77] Karplus, M.; Mccammon, J. A. Molecular dynamics simulations of biomolecules. *Nat. Struct. Biol.* **2002**, *9*, 646-652.
- [78] Alder, B. J.; Wainwright, T. E. Phase Transition for a Hard Sphere System. *J. Chem. Phys.* **1957**, *27*, 1208-1211.
- [79] Allen, M. P.; Tildesley, D. *Computer Simulations of Liquids*. Clarendon Press, Oxford, 1987.
- [80] McCammon, J. A.; Gelin, B. R.; Karplus, M. Dynamics of folded proteins. *Nature.* **1977**, *267*, 585-590.
- [81] [http://en.wikipedia.org/wiki/Molecular\\_dynamics](http://en.wikipedia.org/wiki/Molecular_dynamics). Acessado em: 14-03-2016.
- [82] Leach, A. R. *Molecular Modeling: Principles and Applications*. Paerson Education, Great Britain, 2001.
- [83] MacKerell, A. D.; Bashford, D.; Bellott, M.; Dunbrack, R. L.; Evanseck, J. D.; Field, M. J.; Fischer, S.; Gao, J.; Guo, H.; Ha, S. et al. All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *J. Phys. Chem. B.* **1998**, *102*, 3586-3616.
- [84] Brooks, B. R.; Bruccoleri, R.; Olafson, B. D.; States, D.; Swaminathan, S.; Karplus, M. CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *J. Comput. Chem.* **1983**, *4*, 187-217.
- [85] Jorgensen, W. L.; Maxwell, D. S.; Tirado-Rives, J. Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids *J. Am.Chem. Soc.* **1996**, *117*, 11225-11236.

- [86] Weiner, S. J.; Kollman, P. A.; Case, D. A.; Singh, C.; Ghio, C.; Alagona, G.; Profeta, S.; Weiner, P. A new force field for molecular mechanical simulation of nucleic acids and protein. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 765-784.
- [87] Hermans, J.; Berendsen, H. J. C.; Van Gunsteren, W. F.; Postma, J. P. M. A consistent empirical potential for water-protein interactions. *Biopolymers* **1984**, *23*, 1513-1518.
- [88] Adcock, S. A.; McCammon, J. A. Molecular Dynamics: Survey of Methods for Simulating the Activity of Proteins. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 1589-1615.
- [89] Phillips, J. C.; Braun, R.; Wang, W.; Gumbart, J.; Tajkhorshid, E.; Villa, E.; Chipot, C.; Skeel, R. D.; Kalé, L.; Schulten, K. Scalable Molecular Dynamics with NAMD. *J. Comput. Chem.* **2005**, *26*, 1781-1802.
- [90] Feller, S. E.; Zhang, Y.; Pastor, R. W.; Brooks, B. R. Constant pressure molecular dynamics simulation: The Langevin piston method. *J. Chem. Phys.* **1995**, *103*, 4613-4621.
- [91] Frenkel, D.; Smit, B. *Understanding Molecular Simulations*. Academic Press, San Diego, 2001.
- [92] Onuchic, J. N.; Luthey-Schulten, Z.; Wolynes, P. G. Theory of protein folding: The energy landscape perspective. *Ann. Rev. Phys. Chem.* **1997**, *48*, 545-600.
- [93] Liu, S. Q.; Ji, X. L.; Tao, Y.; Tan, D. Y.; Zhang, K. Q.; Fu, Y. X. *Protein Engineering*. Intech, San Diego, 2012.
- [94] Henzler-Wildman, K.; Kern, D. Dynamic personalities of proteins. *Nature* **2007**, *450*, 964-972.
- [95] Chipot, C.; Pohorille, A. *Free Energy Calculations - Theory and Applications in Chemistry and Biology*. Springer, 2007.

- [96] Darve, E.; Rodriguez-Gomez, D.; Pohorille, A. Adaptive Biasing Force Method for Scalar and Vector Free Energy. *J. Chem. Phys.* **2008**, *128*, 144120-144134.
- [97] Comer, J.; Gumbart, J. C.; Hénin, J.; Lelievre, T.; Pohorille, A.; Chipot, C. The Adaptive Biasing Force Method: Everything You Always Wanted To Know but Were Afraid To Ask. *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119*, 1129-1151.
- [98] Batista, M. R. B.; Martínez, L. Conformational Diversity of the Helix 12 of the Ligand Binding Domain of PPAR $\gamma$  and Functional Implications. *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119*, 15418-15429.
- [99] Martínez, J. M.; Martínez, L. Packing Optimization for Automated Generation of Complex System's Initial Configurations for Molecular Dynamics and Docking. *J. Comput. Chem.* **2003**, *24*, 819-825.
- [100] Martínez, L.; Andrade, R.; Birgin, E. G.; Martínez, J. M. Packmol: A Package for Building Initial Configurations for Molecular Dynamics Simulations. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30*, 2157-2164.
- [101] Hansson, A.; Souza, P. C. T.; Silveira, R. L.; Martínez, L.; Skaf, M. S. Charmm Force Field Parametrization of Rosiglitazone. *Int. J. Quant. Chem.* **2010**, *111*, 1346-1354.
- [102] Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. D. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water *J. Chem. Phys.* **1983**, *79*, 926-936.
- [103] Bottegoni, G.; Rocchia, W.; Recanatini, M.; Cavalli, A. AClAP, Autonomous hierarchical agglomerative Cluster Analysis based protocol to partition conformational datasets. *Bioinformatics* **2006**, *15*, 58-65.
- [104] Case, D. A.; Barbin, V.; Berryman, J. T.; Betz, R. M.; Cai, Q.; Cerutti, D. S.; Cheatham, T. E.; Darden, T. A.; Duke, R. E.; Gohlke, H. et al. AMBER14, University of California, San Francisco, 2014.

- [105] Gurnell, M.; Wentworth, J. M.; Agostini, M.; Adams, M.; Collingwood, T. N.; Provenzano, C.; Browne, P. O.; Rajanayagam, O.; Burris, T. P.; Schwabe, J. W.; et al. A Dominant Negative Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Mutant Is a Constitutive Repressor and Inhibits PPAR $\gamma$ -Mediated Adipogenesis. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 5754-5759.
- [106] Molnar, F.; Matilainen, M.; Carlberg, C. Structural Determinants of the Agonist-Independent Association of Human Peroxisome Proliferator Activated Receptors with Coactivators. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 26543-26556.
- [107] Shao, J.; Tanner, S. W.; Thompson, N.; Cheatham, T. E. Clustering Molecular Dynamics Trajectories: 1. Characterizing the Performance of Different Clustering Algorithms. *J. Chem. Theory Comput.* **2007**, *3*, 2312-2334.
- [108] Fratev, F. Helix 12 Orientation in Estrogen Receptors is Mediated by Receptor Dimerization: Evidence from Molecular Dynamics Simulations. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17*, 13403-13420.
- [109] Gee, A. C.; Carlson, K. E.; Martini, P. G.; Katzenellenbogen, B. S.; Katzenellenbogen, J. A. Coactivator Peptides Have a Differential Stabilizing Effect on the Binding of Estrogens and Antiestrogens with the Estrogen Receptor. *Mol. Endocrinol.* **1999**, *13*, 1912-1923.
- [110] Duda, K.; Chi, Y. I.; Shoelson, S. E. Structural basis for HNF-4 $\alpha$  activation by ligand and coactivator binding. *J. Biol. Chem.* **2004**, *28*, 23311-23316.
- [111] Pissios, P.; Tzamelis, I.; Kushner, P.; Moore, D. D. Dynamic stabilization of nuclear receptor ligand binding domains by hormone or corepressor binding. *Mol. Cell.* **2000**, *6*, 245-253.
- [112] Aci-Seche, S.; Genest, M.; Garnier, N. Ligand entry pathways in the ligand binding domain of PPAR $\gamma$  receptor. *FEBS Lett.* **2011**, *585*, 2599-2603.

- 
- [113] Uppenberg, J.; Svensson, C.; Jaki, M.; Bertilsson, G.; Jendeberg, L.; Berkenstam, A. Crystal Structure of the Ligand Binding Domain of the Human Nuclear Receptor PPAR $\gamma$  *J. Biol. Chem.* **1998**, *20*, 31108-31112.
- [114] Einstein, M.; Akiyama, T. E.; Castriota, G. A.; Wang, C. F.; McKeever, B.; Mosley, R. T.; Becker, J. W.; Moller, D. E.; Meinke, P. T.; Wood, H. B. et al. The differential interactions of peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands with Tyr473 is a physical basis for their unique biological activities. *Mol Pharmacol.* **2008**, *73*, 62-74.