

**Universidade Estadual de Campinas**  
**Instituto de Química**  
Departamento de Físico-Química

**Simulações de Dinâmica Molecular dos Receptores do  
Hormônio Tireoidiano**

**Leandro Martínez**  
Tese de Doutorado

**Orientador: Prof. Dr. Munir S. Skaf**  
Departamento de Físico-Química  
Universidade Estadual de Campinas

**Co-orientador: Prof. Dr. Igor Polikarpov**  
Instituto de Física de São Carlos  
Universidade de São Paulo em São Carlos

Campinas, SP  
2007

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO  
INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP**

M366s

Martínez, Leandro.

Simulações de Dinâmica Molecular dos Receptores do Hormônio Tireoidiano – Campinas, SP: [s.n], 2007.

Orientador: Munir S. Skaf

Co-orientador: Igor Polikarpov

Doutorado - Universidade Estadual de Campinas,  
Instituto de Química.

1. Hormônio tireoidiano. 2. Dinâmica molecular.  
3. Receptor nuclear. 4. Endocrinologia I. Skaf, Munir S. II. Polikarpov, Igor. III. Universidade Estadual de Campinas. IV. Título.

**Título em inglês:** Molecular dynamics simulations of thyroid hormone receptors

**Palavras-chave em inglês:** Thyroid hormone, Molecular dynamics, Nuclear receptor, Endocrinology

**Área de concentração:** Físico-Química

**Titulação:** Doutor em Ciências

**Banca examinadora:** Prof. Dr. Munir Salomão Skaf (orientador), Profa. Dra. Débora Foguel (UFRJ-ICB), Prof. Dr. Alfredo Mayall Simas (UFPE-CCEN), Prof. Dr. Rogério Custódio (IQ-Unicamp), Prof. Dr. Carlos Eduardo Roque Correia (IQ-Unicamp)

**Data da defesa:** 29/03/2007





*Costumávamos pensar que nosso futuro estava nas estrelas.  
Agora sabemos que ele está em nossos genes.  
(James Watson)*



# Agradecimentos

- Antes de nada tenho que agradecer ao Munir. O Munir foi uma pessoa fundamental para meu desenvolvimento acadêmico, tanto do ponto de vista profissional como pessoal. O Munir está sempre alegre, é muito gentil e compreensivo, sendo uma ótima companhia. Nós temos uma grande amizade.
- Um pouco mais distante geograficamente, o Igor foi também uma pessoa essencial em toda minha carreira nos últimos seis anos. Meu trabalho nesta área começou com ele ainda no LNLS, quando eu estava na graduação. Sempre muito motivado, estimulante e simpático, o Igor também se tornou um grande amigo e ótimo orientador.
- Agradeço também às pessoas do grupo. Agradeço aos novos (Paulo, Erica e Carol), e principalmente aos velhos, Milton, Frank e Mónica. Foi ótimo conviver com vocês.
- Das pessoas do IQ eu agradeço em especial à Bel, por ser tão competente, simpática, e sempre disposta a ajudar. Agradeço também à Regina Buffon como coordenadora de graduação, que sempre (tentou) me colocar nas disciplinas que eu queria.
- Agradeço ao IQ e à Unicamp pela bolsa de doutorado e pela oportunidade de aprender a dar aulas.
- Agradeço a um monte de gente que desenvolve programas e os distribui de graça. Tudo na tese foi feito com eles em Linux, desde as simulações (Tinker e NAMD), a edição do texto (Vim e Latex), até as figuras (InkScape, Gimp,

VMD e Pymol) e os gráficos (Xmgrace). Graças a essa gente tudo saiu bem melhor e mais barato.

- Agradeço ao meu pai, Mario, ao Nino e ao Juliano, pelas colaborações científicas divertidas e produtivas.
- Agradeço a todos os meus amigos da Comunitária e do IQ, ao Lúcio, ao Nino, à Diana e à Luiza, ao Ivan e à Hebe e sua família, todos gente que me faz ver outros lados da vida.
- Agradeço à Camila pela pessoa encantadora que ela é. Pelo amor, carinho e companhia, por tudo.
- Agradeço aos meus pais, Ana e Mario, e ao meu irmão, Julian, pela família maravilhosa que tenho.

# Curriculum Vitae

- **Informações Pessoais**

Nome: Leandro Martínez

Data de nascimento: 16/12/1979

- **Formação Universitária**

Bacharelado em Química, Universidade Estadual de Campinas, 1998-2002.

- **Doutorado**

*Simulações de Dinâmica Molecular dos Receptores do Hormônio Tireoidiano.*

Orientador: Prof. Dr. Munir S. Skaf (IQ-UNICAMP)

Co-orientador: Prof. Dr. Igor Polikarpov (IFSC - USP)

Instituição: Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas

Ingresso: 08/2003, Defesa: 29/03/2007.

- **Mestrado**

*Estudo Computacional dos Mecanismos de Dissociação do Hormônio Tireoidiano de seu Receptor Nuclear.*

Orientador: Prof. Dr. Munir S. Skaf (IQ-UNICAMP)

Co-orientador: Prof. Dr. Igor Polikarpov (IFSC - USP)

Instituição: Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas

Ingresso: 08/2002, Defesa: 01/08/2003.

### • Prêmios e Distinções

1. *Best Poster Award*, para o trabalho “Molecular Dynamics Simulations of Thyroid Hormone Receptors”, concedido pela Associação Brasileira de Bioinformática e Biologia Computacional no *X-meeting 1st International conference of the AB<sup>3</sup>C*, 2005.
2. Primeiro colocado na seleção para o ingresso ao doutorado, IQ-UNICAMP, 08/2003.
3. Primeiro colocado no exame de ingresso à pós-graduação do IQ-UNICAMP em 06/2002.
4. Recebeu o *Prêmio Lavoisier*, concedido pelo Conselho Regional de Química IV Região, por melhor desempenho acadêmico entre os formandos da turma de 06/2002.
5. O trabalho “Simulação por Dinâmica Molecular do Hormônio Tireoidiano em Soluções Aquosas de Uréia”, co-autorado por Munir S. Skaf e Igor Polikarpov, recebeu Menção Honrosa no XI Simpósio Brasileiro de Química Teórica realizado em Caxambu, MG, em Novembro de 2001.

### • Projetos de Iniciação Científica

1. 06/2002 a 07/2003: Simulações de Dinâmica Molecular do Hormônio Tireoidiano em Soluções Aquosas de Uréia. Orientador: Munir S. Skaf. Instituição: UNICAMP. Bolsa FAPESP.
2. 01/2002 a 06/2002: Estudo da Estrutura e Função de Receptores Nucleares. Orientador: Igor Polikarpov. Instituição: Laboratório Nacional de Luz Síncrotron. Bolsa: CNPq.
3. 01/2001 a 12/2001: Termodinâmica de Complexos de Metais com Aminoácidos. Orientador: Claudio Airoidi. Instituição: UNICAMP. Bolsa: CNPq.

4. 01/1999 a 12/1999: Estudo da Síntese e Reatividade de Sílica Lamelar. Orientador: Claudio Airoidi. Instituição: UNICAMP. Bolsa: CNPq.

• **Trabalhos publicados em periódicos de circulação internacional**

1. Leandro Martínez, Paul Webb, Igor Polikarpov, Munir S. Skaf, “Molecular Dynamics Simulations of Ligand Dissociation from Thyroid Hormone Receptors: Evidence for the Likeliest Escape Pathway and its Implications for the Design of Novel Ligands.” *Journal of Medicinal Chemistry* **49**, 23-26, 2006.
2. Juliano B. Francisco, José Mario Martínez, Leandro Martínez, “Density-Based Globally Convergent Trust-Region Methods for Self-Consistent Field Electronic Structure Calculations.” *Journal of Mathematical Chemistry* **40**, 349-377, 2006.
3. Leandro Martínez, Milton T. Sonoda, Paul Webb, John D. Baxter, Munir S. Skaf, Igor Polikarpov, “Molecular dynamics simulations reveal multiple pathways of ligand dissociation from thyroid hormone receptors.” *Biophysical Journal* **89**, 2011-2023, 2005.
4. Milton T. Sonoda, Ney H. Moreira, Leandro Martínez, Frank W. Favero, Sérgio M. Vechi, Lucimara R. Martins, Munir S. Skaf, “A Review on the Dynamics of Water.” *Brazilian Journal of Physics* **34**, 3-16, 2004.
5. Juliano B. Francisco, José Mario Martínez, Leandro Martínez, “Globally convergent trust-region methods for SCF electronic structure calculations.” *Journal of Chemical Physics* **121**, 10863-10878, 2004.
6. Robson F. de Farias, Ulrich Arnold, Leandro Martínez, Ulf Schuchardt, Marcelo J. D. M. Jannini, Claudio Airoidi, “Synthesis, characterization and catalytic properties of sol-gel derived mixed oxides.” *Journal of Physics and Chemistry of Solids* **64**, 2385-2389, 2003.
7. José Mario Martínez, Leandro Martínez, “Packing optimization for the automated generation of complex system’s initial configurations for molecular dynamics and docking.” *Journal of Computational Chemistry* **24**, 819-825 (2003).

8. Leandro Martínez, Robson F. de Farias, Claudio Airoidi, “Thermochemical data on adducts of copper chloride with the amino acids lysine and glycine.” *Thermochimica Acta* **395**, 21-26 (2002).
9. Robson F. de Farias, Leandro Martínez, Claudio Airoidi, “Synthesis, characterization and a thermogravimetric study of copper, cobalt and tin mono- and bis-adducts with ethyleneurea, ethylenethiourea and propyleneurea.” *Transition Metal Chemistry* **27**, 748-750 (2002).
10. Robson F. de Farias, Leandro Martínez, Claudio Airoidi, “A calorimetric investigation into copper-arginine and copper-alanine solid state interactions.” *Transition Metal Chemistry* **27**, 253-255 (2002).
11. Robson F. de Farias, Leandro Martínez, Claudio Airoidi, “Synthesis, characterization and thermal behaviour of 18 cadmium halides adducts involving ethyleneurea, ethylenethiourea and propyleneurea.” *Thermochimica Acta* **376**, 91-94 (2001).
12. Robson F. de Farias, Leandro Martínez, Claudio Airoidi, “The decrease of interlamellar space of silica samples induced by external pressure.” *Journal of Non-Crystalline Solids* **276**, 56-60 (2000).

### • Artigos aceitos para publicação

1. Roberto Andreani, José Mario Martínez, Leandro Martínez, Flavio Yano, “Continuous optimization methods for structural alignment.” *Mathematical Programming*, 2007.

### • Artigos submetidos

1. Leandro Martínez, Rodrigo V. Portugal, Alessandro S. Nascimento, Marcel Nakahira, Luis M. T. R. Lima, Igor Polikarpov, Munir S. Skaf, “Denaturation Mechanisms of the Ligand Binding Domain of Thyroid Hormone Receptors,” 2007.
2. Leandro Martínez, Roberto Andreani, José Mario Martínez, “Convergent Algorithms for Protein Structural Alignment”, 2007.

3. Jorge M. C. Mondego, Melina P. Duarte, Leandro Martínez, Sandra R. Camargo, Sandra M. C. Guerreiro, Munir S. Skaf, Oliveira Guerreiro-Filho, Marcelo Menossi, “Molecular characterization of a miraculin-like gene differentially expressed during coffee leaf miner infestation and coffee development”, 2007.

#### • Artigos em preparação

1. Alessandro S. Nascimento, Leandro Martínez, Fabio M. Nunes, Rodrigo V. Portugal, Ricardo Aparício, Sandra M. G. Dias, Marcel Nakahira, Ana C. M. Figueira, Luis M. T. R. Lima, Paul Webb, Munir S. Skaf, Igor Polikarpov, “Entropic contribution accounts for TRIAC selectivity toward Thyroid Hormone Receptor isoforms,” 2007.
2. Leandro Martinez, Milton T. Sonoda, Paul Webb, Munir S. Skaf, Igor Polikarpov, “Mechanisms of protein thermal diffusion and related signaling pathways: A study on Nuclear Hormone Receptors,” 2007.

#### • Trabalhos apresentados em congressos

1. Leandro Martínez, Igor Polikarpov, Munir S. Skaf, “Molecular Dynamics Simulations of Thyroid Hormone Receptors.” X-Meeting, 1st International conference of the Brazilian Association for Bioinformatics and Computational Biology, 2005, Caxambu-MG. Livro de Resumos, 2005.
2. Leandro Martínez, Paul Webb, Igor Polikarpov, Munir S. Skaf, “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.” XIII Simpósio Brasileiro de Química Teórica, 2005, Águas de São Pedro. Livro de Resumos, 2005.
3. Juliano B. Francisco, José Mario Martínez, Leandro Martínez, “Globally Convergent Trust Region Methods for Self Consistent Field Electronic Structure Calculations.” XIII Simpósio Brasileiro de Química Teórica, 2005, Águas de São Pedro. Livro de Resumos, 2005.

4. Luciano T. Costa, Leandro Martínez, Mauro C. C. Ribeiro, “Geração da configuração inicial de um sistema polimérico para simulação computacional usando o programa Packmol.” XIII Simpósio Brasileiro de Química Teórica, 2005, Águas de São Pedro. Livro de Resumos, 2005.
5. Juliano B. Francisco, José Mario Martínez, Leandro Martínez, “A globally convergent nonlinear programming algorithm and an application to electronic structure calculations.” V Brazilian Workshop on Continuous Optimization, 2004, Florianopolis, SC. Abstracts do V BR. W. CONT. OPT., 2004.
6. Leandro Martínez, Igor Polikarpov, Munir S. Skaf, “Protein rearrangements and molecular details involved in ligand dissociation from thyroid hormone receptors: molecular dynamics simulations.” 1st Latin American Protein Society Meeting, 2004, Angre dos Reis. Livro de Resumos do 1st LAPSM, 2004.
7. Leandro Martínez, Milton T. Sonoda, Paul Webb, John D. Baxter, Munir S. Skaf, Igor Polikarpov, “Mecanismos de Dissociação do Hormônio Tireoidiano de seu Receptor TR-alfa1 obtidos com Dinâmica Molecular com Amostragem Ampliada.” XII Simpósio Brasileiro de Química Teórica, 2003, Caxambú - MG. Livro de Resumos do XII SBQT, 2003.
8. Leandro Martínez, Igor Polikarpov, Munir S. Skaf, “Dinâmica Molecular com Caminho Induzido da Dissociação do Hormônio Tireoidiano de seu Receptor: Detalhes Moleculares.” XII Simpósio Brasileiro de Química Teórica, 2003, Caxambú - MG. Livro de Resumos do XII SBQT, 2003.
9. Leandro Martínez, José Mario Martínez, “Packmol: Geração Automática de Configurações Iniciais Complexas de Dinâmica Molecular usando Estratégias de Empacotamento.” XII Simpósio Brasileiro de Química Teórica, 2003, Caxambú - MG. Livro de Resumos do XII SBQT, 2003.
10. Leandro Martínez, Milton T. Sonoda, Munir S. Skaf, Igor Polikarpov, “Mecanismos de Dissociação do Hormônio Tireoidiano de seu Receptor Nuclear.” Apresentado no 1º Workshop de Modelagem Molecular de Ribeirão Preto na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP-RP, Ribeirão Preto, Setembro de 2002.

11. Leandro Martínez, Munir S. Skaf, Igor Polikarpov, “Simulação por Dinâmica Molecular do Hormônio Tireoidiano em Soluções Aquosas de Uréia.” Apresentado no XI Simpósio Brasileiro de Química Teórica, em Caxambu, MG, em Novembro de 2001. O painel recebeu menção honrosa do comitê avaliador do simpósio.
12. Leandro Martínez, Robson F. de Farias, Ulrich Arnold, Ulf Schuchardt, Claudio Airoidi, “Epoxidação de cicloocteno catalisada por óxidos mistos de Ti, Zr, Al e Si.” Apresentado na 23<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas, 26 de Maio de 2000.
13. Leandro Martínez, Robson F. de Farias, Claudio Airoidi, “Redução da distância interlamelar de sílica induzida por aplicação de pressão.” Apresentado na 23<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas, 26 de Maio de 2000.
14. Leandro Martínez, Robson F. de Farias, Claudio Airoidi, “Efeito da adição de cátions sobre a estrutura e capacidade de adsorção de sílica lamelar.” Apresentado no XXXIX Congresso Brasileiro de Química em Goiânia, 30 de setembro de 1999.
15. Leandro Martínez, Liliane M. Nunes, Robson F. de Farias, Claudio Airoidi, “Interação cátion-aminoácido em adutos de cloretos de cobre e cádmio com lisina.” Apresentado no XXXIX Congresso Brasileiro de Química em Goiânia, 30 de setembro de 1999.

### • Software desenvolvido

1. J. M. Martínez, L. Martínez, *Packmol*: Pacote computacional para gerar configurações iniciais para simulações de dinâmica molecular. Pode ser obtido em:  
<http://www.ime.unicamp.br/~martinez/packmol>
2. R. Andreani, J. M. Martínez, L. Martínez, *LovoAlign*: Alinhamento de estrutural de proteínas usando otimização do menor valor ordenado. Disponível em:  
<http://www.ime.unicamp.br/~martinez/lovoalign>

- **Disciplinas de graduação ministradas - docência plena**

Disciplinas ministradas por ter sido bolsista de doutorado do programa piloto de bolsas para instrutores graduados da UNICAMP.

1. 2003/2S - QG100 - Química Geral (Eng. Elétrica e Mecatrônica)
2. 2003/2S - QG109 - Química Geral Experimental (Química Tecnológica)
3. 2004/1S - QG100 - Química Geral (Eng. Mecatrônica)
4. 2004/2S - QG102 - Química Geral Experimental (Eng. Química)
5. 2004/2S - QG102 - Química Geral Experimental (Física)
6. 2005/1S - QG101 - Química Geral Teórica (Física)
7. 2005/2S - QO622 - Química Orgânica Experimental II (Química)
8. 2006/1S - QG101 - Química Geral Teórica (Eng. Química e Eng. Alimentos)
9. 2006/2S - QF632 - Laboratório de Físico-Química I (Química)

- **Curso de curta duração ministrado**

1. Rogério Custódio, Leandro Martínez, Nelson H. Morgon, “Desafios e fronteiras da química computacional.” Semana da All-Química, 2004.

# Resumo

Receptores nucleares (NRs) formam uma superfamília de fatores de transcrição. Os receptores de hormônios mais conhecidos são os receptores do ácido retinóico, do estrógeno, da progesterona, os dos glucocorticóides e os receptores do hormônio tireoideano (TRs). Os NRs são formados por três domínios: um domínio N-terminal que contém um fator de transcrição, um domínio de ligação com o DNA e um domínio ao qual os hormônios se ligam (LBD). O domínio de ligação com os hormônios é o maior dos três, sendo formado por cerca de 260 resíduos, 12  $\alpha$ -hélices e poucas e pequenas folhas- $\beta$ . Aqui apresentamos estudos da dinâmica dos LBDs dos TRs. Os TRs são responsáveis pelo controle do metabolismo basal, pelo consumo de gorduras e ácidos graxos, e pelo controle da atividade cardíaca. Há fundamentalmente duas isoformas de TRs: TR $\alpha$  e TR $\beta$ . Ligantes seletivos para uma das isoformas têm um grande valor farmacológico. As estruturas cristalográficas dos LBDs, no entanto, têm permitido apenas uma apreciação parcial das relações entre a estrutura e a função dos TRs. Aspectos dinâmicos dos LBDs parecem ter uma importância fundamental em vários mecanismos fisiológicos. Neste trabalho, apresentamos estudos de vários aspectos da dinâmica molecular dos LBDs dos receptores do hormônio tireoideano. Técnicas não-convencionais de simulações de dinâmica molecular são usadas, e novas metodologias e técnicas de análise de dados são propostas. Os estudos se iniciam pela definição dos mecanismos preferenciais de dissociação dos ligantes. O caminho preferencial de dissociação e seu fundamento estrutural são determinados. Em seguida, são feitos estudos das razões estruturais e dinâmicas da seletividade dos ligantes Triac e GC-1. No caso do Triac, as estruturas cristalográficas são aparentemente contraditórias com a seletividade observada. As simulações resolvem essa aparente contradição, e sugerem que são fatores entrópicos que fazem do Triac um ligante  $\beta$ -seletivo. No caso do GC-1,

---

as simulações e as estruturas cristalográficas mostraram que são interações entre resíduos do LBD que conferem a  $\beta$ -seletividade. Estudos da desnaturação dos TRs por temperatura também são apresentados. As simulações mostram que a desnaturação dos LBDs ocorre primeiro pelo desenovelamento das hélices. A expansão da estrutura com a exposição do seu núcleo hidrofóbico ocorre apenas em uma segunda etapa. O resultado é coerente com estudos de dicroísmo circular nos quais uma grande estabilização do LBD pela associação do Triac é observada. Por fim, estudos dos mecanismos de difusão térmica (redistribuição de energia vibracional) dos LBDs são apresentados. Estes estudos mostram que existem três mecanismos básicos de transferência de energia cinética em proteínas. Diferentes resíduos têm diferentes contribuições para a transferência de energia. No caso dos LBDs dos receptores do hormônio tireoidiano, as Argininas possuem um papel particularmente importante. Os resíduos que se destacam para a difusão térmica possuem relevância funcional, mostrando que os mecanismos observados podem ser importantes para a estabilidade dos LBDs pela dissipação de perturbações cinéticas.

# Abstract

Nuclear receptors (NRs) comprise a superfamily of transcription factors. The receptors of the most well known hormones are the retinoic acid, estrogen, progesterone, glucocorticoids and the thyroid hormone receptors (TRs). NRs are composed by three domains: An N-terminal domain, that contains a transcription factor, a DNA binding domain, and a ligand binding domain (LBD). The LBD is the largest of the three domains, and it is composed by roughly 260 residues, 12  $\alpha$ -helices and a few small  $\beta$ -sheets. Here we study the dynamics of the LBDs of TRs. TRs are responsible for the control of the basal metabolism, the consumption of fat, and for the control of cardiac activity. There are two TR isoforms: TR $\alpha$  and TR $\beta$ . Ligands that are selective to one or other isoform have important pharmaceutical value. Crystallographic structures of the LBDs, however, have provided only limited information on the relationships between structure and function of TRs. Dynamic mechanisms of the LBDs seem to be involved in several physiological processes. In this work, we describe various aspects of the molecular dynamics of the LBDs of TRs. Non-conventional molecular dynamics simulation techniques are used, and new methodologies of simulation and data analysis are proposed in each study. First, we describe the mechanisms of ligand dissociation from the LBDs. The most important ligand dissociation pathway is obtained, and the structural interpretation for its relevance is elucidated. Next, studies on the selectivity of the TR $\beta$ -selective ligands Triac and GC-1 are shown. For Triac, the crystallographic structures seem to be contradictory with the observed selectivity. The simulations provide an explanation for this apparent contradiction, and reveal that entropic factors are responsible for the observed selectivity. For GC-1, simulations and crystallographic structures jointly show that interaction between residues of the LBD are mostly responsible for the  $\beta$ -selectivity. Studies on the temperature-induced

denaturation of TRs are then presented. These simulations have shown that the LBDs denature first by the unwinding of the helices. Expansion of the hydrophobic core occurs only as a second step. These results explain the strong stabilizing effect of Triac on the LBDs. Finally, the mechanisms of thermal diffusion (vibrational energy transfer) on the LBDs are presented. This study shows that there are three basic mechanisms of kinetic energy diffusion in proteins. Different residues have different contributions to kinetic energy dissipation. In the case of the LBDs of TRs, Arginines have particularly important roles. Residues that are important for heat diffusion are also functionally relevant. Therefore, the thermal diffusion mechanisms may be important for the stability of the LBDs by means of the dissipation of kinetic energy perturbations.

# Sumário

Lista de Abreviaturas	xxv	
Lista de Figuras	xxix	
Lista de Tabelas	xxxvii	
<b>1</b>	<b>Receptores Nucleares: Função e Estrutura</b>	<b>1</b>
1.1	A síntese de proteínas na célula . . . . .	1
1.1.1	O controle da transcrição . . . . .	2
1.1.2	O controle da transcrição pelos receptores nucleares	3
1.1.3	O papel dos hormônios . . . . .	5
1.2	Estrutura . . . . .	6
1.2.1	O domínio de ligação com os hormônios . . . . .	8
1.3	Aspectos dinâmicos do LBD . . . . .	11
1.3.1	A dinâmica da hélice 12 . . . . .	13
1.3.2	Mecanismos de associação e dissociação dos hormônios	15
<b>2</b>	<b>Os receptores do Hormônio Tireoidiano</b>	<b>17</b>
2.1	Membros da família dos receptores do hormônio tireoidiano . .	17
2.1.1	Hormônios tireoidianos naturais . . . . .	18
2.1.2	Distribuição no organismo e ação . . . . .	19
2.2	Os domínios de ligação com os hormônios . . . . .	20
2.2.1	Características estruturais . . . . .	21
2.2.2	O desenvolvimento de ligantes seletivos . . . . .	24
2.2.3	Outros ligantes e suas características gerais . . . . .	28

---

<b>3</b>	<b>Simulações de dinâmica molecular</b>	<b>33</b>
3.1	A dinâmica molecular clássica . . . . .	34
3.1.1	Do quântico ao clássico . . . . .	34
3.1.2	Potenciais de interação para moléculas comuns . . .	39
3.1.3	A parametrização do campo de força . . . . .	43
3.1.4	Integrando as equações de movimento . . . . .	45
<b>4</b>	<b>Mecanismos de dissociação de ligantes</b>	<b>49</b>
4.1	Mecanismos de dissociação em receptores nucleares . . . . .	49
4.2	Metodologia . . . . .	51
4.2.1	Dinâmica Molecular com Amostragem Ampliada .	51
4.2.2	Dinâmica Molecular com Caminho Induzido . . . .	53
4.2.3	Condições de simulação . . . . .	54
4.3	Caminhos obtidos usando DMAA . . . . .	56
4.4	Estudo dos mecanismos de dissociação com DMCI . . . . .	62
4.5	Implicações para o desenvolvimento de novos ligantes . . . . .	66
4.6	Mecanismos de associação dos ligantes . . . . .	67
4.6.1	Metodologia . . . . .	68
4.6.2	Resultados . . . . .	71
<b>5</b>	<b>Estudo da seletividade de ligantes <math>\beta</math>-seletivos</b>	<b>77</b>
5.1	A seletividade do ligante Triac . . . . .	77
5.1.1	Estruturas cristalográficas . . . . .	78
5.1.2	Energias de interação . . . . .	80
5.1.3	A mobilidade do ligante . . . . .	83
5.1.4	Os sítios de ligação . . . . .	85
5.1.5	Discussão . . . . .	88
5.2	A seletividade do ligante GC-1 . . . . .	89
5.2.1	Modos de ligação do GC-1 . . . . .	90
5.2.2	Energias de interação . . . . .	91
5.2.3	Serina 277 vs. Asparagina 331 . . . . .	94
<b>6</b>	<b>Mecanismos de desnaturação</b>	<b>99</b>
6.1	Simulações de desnaturação . . . . .	99

---

6.2	Metodologia . . . . .	102
6.2.1	Dicroísmo Circular . . . . .	102
6.2.2	Simulações de Dinâmica Molecular . . . . .	102
6.3	Resultados Experimentais . . . . .	105
6.4	Simulações de dinâmica molecular . . . . .	107
6.4.1	Visão global da desnaturação . . . . .	107
6.4.2	O papel do ligante na desnaturação . . . . .	110
6.4.3	Detalhes dos mecanismos de desnaturação . . . . .	116
6.5	Idéias sobre o mecanismo de enovelamento dos LBDs . . . . .	120
6.6	Conclusões . . . . .	121
<b>7</b>	<b>Mecanismos de difusão térmica</b>	<b>123</b>
7.1	Dissipação da energia cinética em proteínas . . . . .	124
7.1.1	Difusão térmica anisotrópica . . . . .	124
7.2	Metodologia . . . . .	125
7.3	Resultados . . . . .	128
7.3.1	Visão geral da difusão térmica nos LBDs . . . . .	128
7.3.2	A importância de cada resíduo . . . . .	132
7.3.3	Contribuições das cadeias laterais . . . . .	133
7.3.4	A importância funcional dos resíduos difusores . . . . .	137
7.3.5	O aquecimento dos ligantes . . . . .	138
7.3.6	Variação temporal da propagação do calor . . . . .	142
7.4	Conclusões . . . . .	143
<b>8</b>	<b>Conclusões</b>	<b>145</b>
8.1	Perspectivas . . . . .	148



# Lista de Abreviaturas

DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
RNA <sub>m</sub>	RNA mensageiro
RNA <sub>t</sub>	RNA transportador
ATP	Adenosina tri-fosfato
RNAP	RNA polimerase
HSP	Proteína de choque térmico
T3, T4	Hormônios tireoidianos naturais
CoA	Coativador
CoR	Correpressor
NR	Receptor Nuclear
LBD	Domínio de ligação com o ligante
DBD	Domínio de ligação com o DNA
HRE	Elemento de resposta do DNA
SAXS	Espalhamento de raios-X a baixo ângulo
Triac	Metabólito do T3

---

TR	Receptor do Hormônio Tireoidiano
H	Hélice
RAR	Receptor do Ácido Retinóico
PPAR	Receptor ativado por proliferador de peroxissomo
GC-1	Ligante sintético TR $\beta$ -seletivo.
NH-3	Antagonista dos TRs com extensão na posição 5´
DIMIT	Ligante $\beta$ -seletivo dos TRs
MIBRT	Ligante sintético dos TRs
GC-24	Agonista TR $\beta$ -seletivo com extensão na posição 5´
KB-141	Agonista TR $\beta$ -seletivo
CHARMM	<i>Chemistry at Harvard Molecular Mechanics</i>
DMAA	Dinâmica Molecular com Amostragem Ampliada
DMCI	Dinâmica Molecular com Caminho Induzido
NAMD	Not Another Molecular Dynamics (package)
RXR	Receptor X-retinóide
GR	Receptor de glucocorticóides
AR	Receptor andrógeno
ER	Receptor estrógeno
ERR	Receptor relacionado ao estrógeno
HMR	Receptor órfão
DHR38	Outro receptor órfão
FXR	Receptor X-farnesóide

---

PXR	Receptor da progesterona
vdW	Van der Waals
RMSD	Desvio quadrático médio
ATD	Difusão térmica anisotrópica
C	Covalente (difusão térmica)
NC	Não-Covalente (difusão térmica)
CCL	Contribuição da cadeia lateral
THR	Síndrome da resistência ao hormônio tireoideano



# Lista de Figuras

1.1	Dogma central da biologia: A síntese de proteínas tem basicamente duas etapas: a transcrição e a tradução. Na transcrição uma fita de RNA <sub>m</sub> é produzida a partir do DNA. Na tradução a seqüência de nucleotídeos do RNA <sub>m</sub> codifica a seqüência de aminoácidos da proteína. . . . .	2
1.2	Mecanismo geral da ação dos receptores nucleares: Os receptores podem ser encontrados dentro ou fora do núcleo. Os receptores atuam geralmente na forma de dímeros, e a ligação dos hormônios induz a transcrição. Quando estão fora do núcleo, os receptores permanecem associados a proteínas de choque térmico (HSPs). . . . .	4
1.3	Alguns receptores permanecem ligados ao DNA na ausência do hormônio, inibindo a transcrição. A associação do hormônio induz a dissociação do correpressor e a associação do coativador. . . . .	5
1.4	Representação esquemática dos domínios estruturais dos receptores nucleares e suas funções. . . . .	6
1.5	Estrutura do domínio de ligação com o DNA do receptor do estrógeno. A ligação com o DNA se dá através de dois <i>dedos</i> de Zinco. Os átomos de Zinco ligados a cisteínas estão representados por esferas prateadas. . . . .	7
1.6	Estruturas dos LBDs dos receptores dos hormônios (a) tireoidiano (b) ácido retinóico e (c) estrógeno. Os LBDs de diferentes receptores têm estruturas semelhantes, formadas por aproximadamente 12 hélices e duas pequenas folhas- $\beta$ . . . . .	9

---

1.7	Estruturas do RAR (a) sem ligante e (b) ligada ao ácido retinóico, sugerindo o fechamento da H12 de acordo com o mecanismo ratorreira de associação dos hormônios. . . . .	12
1.8	Estruturas de LBDs sem ligante nas quais a H12 aparece fechada: (a) PPAR $\gamma$ [1]. (b) ERR $\gamma$ 2 [2]. (c) ERR $\gamma$ 2 associado a um peptídeo do coativador [3]. (d) PPAR $\gamma$ associado a um peptídeo do coativador [4]. (e) Receptor órfão HMR [5]. (f) Receptor órfão DHR38 [6]. A hélice 12 está representada em vermelho, e os peptídeos coativadores estão representados por palitos em (c) e (d). . . . .	14
2.1	Ligantes naturais mais importantes: (a) T4 (ou tiroxina) e (b) T3, ou triiodotironina. O T4 é produzido na glândula tireóide e a perda de um Iodo leva à formação do T3, que é o principal ligante fisiológico. . . . .	18
2.2	O ligante natural Triac. Este ligante é $\beta$ -seletivo, sendo de grande importância farmacêutica. . . . .	19
2.3	Seqüência de aminoácidos e estrutura secundária dos LBDs dos receptores $\alpha$ e $\beta$ . Os resíduos diferentes estão sombreados e resíduos do sítio de ligação estão em vermelho [7]. . . . .	21
2.4	Estrutura do LBD dos receptores do hormônio tireoidiano. A estrutura mostrada aqui corresponde à estrutura do LBD do receptor TR $\alpha$ 1 humano ligado ao ligante Triac e está apresentada em três ângulos diferentes. . . . .	22
2.5	Representação esquemática da cavidade de ligação dos receptores do hormônio tireoidiano. A cavidade é fundamentalmente hidrofóbica, mas há interações hidrofílicas importantes nas duas extremidades (à direita e à esquerda). . . . .	23
2.6	O ligante GC-1. Este ligante sintético é $\beta$ -seletivo e é considerado um modelo para o desenvolvimento de ligantes farmacologicamente interessantes. . . . .	25

2.7	Antagonistas 5'-substituídos: (a) MIBRT, (b) NH-3 e (c) Suposto deslocamento da hélice 12 que impede a formação da superfície de associação com coativadores. . . . .	26
2.8	Agonistas 5'-substituídos: (a) NH-2, (b) GC-17 e (c) GC-24. . . .	27
2.9	Ligantes desenvolvidos na <i>KaroBio</i> : (a) Agonista seletivo à isoforma TR $\beta$ , conhecido como KB-141. (b) Agonista com maior seletividade que o KB-141. (c) Antagonista “indireto”. (d) Agonista seletivo modificado na posição 4'. (e) Agonista desenhado para contrapor o efeito de uma mutação deletéria. (f) Agonista bicíclico na região hidrofílica. . . . .	28
3.1	(a) O potencial de Morse é uma boa aproximação para a interação entre dois átomos. Próximo do mínimo, pode ser aproximado por um potencial harmônico. (b) Diferença de escala (mas não de aparência) nos potenciais de interação de dois átomos de hidrogênio e de dois átomos de neônio. . . . .	37
3.2	Os potenciais de interação entre pares de átomos não-ligados covalentemente em uma simulação. O potencial de Lennard-Jones representa as interações dispersivas: possui um mínimo e é fortemente repulsivo em distâncias curtas, definindo o raio atômico. O potencial eletrostático depende das cargas dos átomos e consiste em um potencial coulômbico clássico. . . . .	41
4.1	Caminhos de dissociação encontrados usando a técnica DMAA. Três caminhos foram encontrados. O Caminho I se assemelha ao mecanismo raoteira. Os caminhos II e III são novos e não contradizem a associação de cofatores. . . . .	56
4.2	Estruturas de outros receptores com seus ligantes, indicando que os mecanismos I (a-c), II (d-f) e III (g-i) podem ser importantes em diferentes contextos para toda a superfamília. . . . .	61
4.3	Perfis de força em função do tempo para as simulações de dissociação induzida. (a) Caminho I, (b) Caminho II e (c) Caminho III. As forças ao longo do Caminho III são sistematicamente menores. . . . .	63

- 
- 4.4 Energias de interação do ligante com o ambiente ao longo dos Caminhos I e III para as simulações em que ambos os caminhos foram observados. A dissociação ao longo do Caminho I envolve uma perda de interações eletrostáticas, enquanto que no Caminho III as interações eletrostáticas ficam mais favoráveis à medida que o ligante se dissocia. . . . . 65
- 4.5 Uma trajetória simples de entrada requer um caminho curvo. . . 68
- 4.6 Definição de um novo ponto de referência: (a) A componente da força paralela à nova direção,  $\vec{F}_{1,p}$ , deve ser preservada. (b) Um novo ponto de referência é definido de forma que  $\vec{F}_2$  cumpra a condição desejada. . . . . 69
- 4.7 Perfís de força em função do tempo de simulação para as simulações bem sucedidas da associação do T3. Os gráficos com duas curvas indicam a obtenção de duas trajetórias de associação satisfatórias em simulações independentes. . . . . 72
- 4.8 Perfís de força em função do tempo de simulação para as simulações bem sucedidas da associação dos ligantes  $\beta$ -seletivos. . . 74
- 5.1 Estruturas cristalográficas do Triac ligado às isoformas (a)  $\alpha$  e (b)  $\beta$  dos receptores do hormônio tireoidiano. Na isoforma  $\alpha$  o Triac interage fortemente com a Arg266, enquanto que a Arg320 no TR $\beta$  é encontrada em duas conformações, indicando uma interação mais fraca com o ligante. . . . . 79
- 5.2 Interações do Triac com (a) todo o ambiente, (b) com os LBDs e (c) com a água. As interações com todo o ambiente são semelhantes nas duas isoformas porque as interações com a água no TR $\beta$  compensam as interações mais favoráveis do LBD com o Triac na isoforma  $\alpha$ . . . . . 80

- 5.3 Interações do Triac com moléculas de água nas simulações do (a)  $TR\alpha$  e (b)  $TR\beta$ . As curvas de diferentes cores correspondem às interações do Triac com moléculas de água diferentes. Interações favoráveis do ligante com a água possuem energias de aproximadamente  $-10 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Várias moléculas de água interagem favoravelmente com o Triac na isoforma  $\beta$  simultaneamente. Na isoforma  $\alpha$  apenas uma água interage intensamente com o Triac em cada instante. . . . . 82
- 5.4 Mobilidade do Triac nas simulações. (a) Mobilidade média do ligante em função do tempo. (b) Média temporal da mobilidade de cada átomo. Sobreposição das conformações do Triac observadas nas simulações do ligante no (c)  $TR\alpha$  e (d)  $TR\beta$ . As transições conformacionais apontadas em (a) indicam uma maior mobilidade do Triac na estrutura  $\beta$ . Em (b) vemos que a maior diferença corresponde à mobilidade do carboxilato. . . . . 84
- 5.5 Cavidade hidrofílica do sítio de ligação dos TRs na presença do Triac: (a) Na conformação aberta da Arg282 no  $TR\beta$ , a cavidade de ligação é maior na isoforma  $\beta$  que na  $\alpha$ . (b) Para o T3 as cavidades são similares, porque o ligante interage diretamente com os resíduos Ser277/Asn331. A formação da interação entre a Ser331 e a Arg282 envolve um movimento da arginina que reduz a cavidade de ligação no mutante  $TR\beta$ -N331S, como mostrado por uma imagem do início da simulação (c) e após 20 ps (d). . . . . 86
- 5.6 Uma molécula de água sendo expulsa do sítio de ligação como consequência da mutação N331S ( $TR\beta$ ). (a) Visão lateral. (b) Visão frontal. . . . . 87
- 5.7 A Arg320 fecha o sítio ativo e interage com o Triac quando a mutação Asn331Ser é feita. . . . . 88

5.8	Modos de ligação encontrados em estruturas cristalográficas do GC-1 ligado ao (a) TR $\alpha$ e (b) TR $\beta$ (as conformações encontradas no TR $\alpha$ , transparentes, estão sobrepostas). Três conformações distintas são observada para a Arg228 no TR $\alpha$ . No TR $\beta$ apenas uma conformação da Arg282 é observada, e corresponde à conformação do TR $\alpha$ na qual a interação do GC-1 com a Arg228 é mais favorável. . . . .	91
5.9	Energias de interação do GC-1 (a) com o LBD e (b) com todo o ambiente. A diferenças das interações do GC-1 com o LBD nas isoformas é compensada pelas interações do ligante com a água e com os íons. . . . .	92
5.10	Posição dos resíduos negativamente carregados no TR $\alpha$ que são responsáveis por parte da diferença de energia de interação do GC-1 com os LBDs. Estes resíduos estão relativamente distantes do sítio de ligação. . . . .	93
5.11	Energias de interação associadas aos modos de ligação do GC-1, obtidas em simulações de dinâmica molecular. A conformação produtiva do TR $\beta$ é estabilizada pela interação da Arg282 com a Asn331, o que não ocorre na estrutura do TR $\alpha$ . . . . .	95
6.1	Desnaturação dos LBDs dos receptores (a) TR $\alpha$ e (b) TR $\beta$ , com e sem ligante, induzidas por temperatura e acompanhadas por medidas de dicroísmo circular. O ligante estabiliza ambas as estruturas, o TR $\beta$ em maior extensão. . . . .	105
6.2	Desvios quadráticos médios em função do tempo de simulação nos processos de desnaturação das estruturas do (a) TR $\alpha$ e (b) TR $\beta$ , com e sem ligante. Os maiores desvios das estruturas sem ligante sugerem que as simulações captaram parte de seu efeito estabilizador.	107
6.3	Parâmetros estruturais da desnaturação. As $\alpha$ -hélices e o os contatos nativos são perdidos antes da compactidade e do aumento da hidratação. . . . .	108
6.4	Desvio quadrático médio por resíduo da isoforma $\beta$ do TR (a) ligado ao Triac e (b) sem ligante. . . . .	111

6.5	Desvio quadrático médio por resíduo da isoforma $\alpha$ do TR (a) ligado ao Triac e (b) sem ligante. . . . .	112
6.6	(a) Regiões estabilizadas pela presença do ligante em todas as estruturas (em azul) e no TR $\alpha$ (em amarelo). (b) Contatos do ligante com as hélices 6, 8 e 11 que podem explicar parte do efeito estabilizador do ligante na estrutura. . . . .	113
6.7	O ligante blindo a hélice 6 do solvente no (a) TR $\alpha$ e no (b) TR $\beta$ . A hidratação das estruturas <i>apo</i> aumenta mais rapidamente do que a das estruturas com ligante. Os resíduos considerados em (a) e (b) estão em amarelo em (c). . . . .	115
6.8	Imagens da desnaturação do TR $\beta$ ligado ao Triac. Apenas nas últimas imagens a estrutura começa a se expandir. . . . .	117
6.9	Fator de compacidade individual e estrutura secundária de cada resíduo, no processo de desnaturação do TR $\beta$ ligado ao Triac. Em (a) a compacidade diminui de azul a vermelho. Em (b) o azul indica presença de $\alpha$ -hélices e o verde estruturas do tipo folhas- $\beta$ . . . . .	118
6.10	Fatores de compacidade individuais (à direita) e estrutura secundária de cada resíduo (à esquerda) para as simulações de desnaturação de: (a) TR $\beta$ sem ligante, (b) TR $\alpha$ com Triac e (c) TR $\alpha$ sem ligante. . . . .	119
7.1	Resposta típica ao aquecimento de um resíduo. Neste caso, a temperatura média dos resíduos da proteína obtidas como resposta ao aquecimento da Arginina 429 após 30 ps de simulação. A Arg429 é mantida a 300K enquanto o restante da proteína estava inicialmente a 10K. . . . .	128
7.2	A difusão do calor ocorre através da cadeia covalente e através de contatos próximos. . . . .	129
7.3	(a) Mapa de contatos do TR $\beta$ . (b) Mapa de difusão térmica. Há uma boa correlação entre os dois mapas, indicando que a energia cinética é difundida preferencialmente para resíduos próximos na estrutura. . . . .	130

7.4	Resposta do TR $\beta$ ao aquecimento de cada resíduo: (a) Aquecimento não-covalente. (b) Aquecimento covalente. Várias Argininas se destacam no perfil de aquecimento não-covalente. . . . .	131
7.5	Resposta do TR $\beta$ ao aquecimento de cada resíduo: à esquerda, a resposta não-covalente; à direita, a resposta covalente. Cores avermelhadas indicam resíduos que transferem calor efetivamente para o restante da proteína de acordo com cada mecanismo. . . . .	132
7.6	Contribuições das cadeias laterais: (a) Resposta térmica do receptor nativo. (b) Resposta térmica do receptor com cadeias laterais de Glicina. (c) Contribuição das cadeias laterais (diferença entre (a) e (b)). . . . .	134
7.7	Disposição dos aminoácidos carregados na estrutura da proteína: (a) Argininas. (b) Ácidos glutâmicos. (c) Lisinas. (d) Ácidos aspárticos. As Argininas parecem estar dobradas em direção ao interior da proteína, enquanto que outros resíduos carregados interagem preferencialmente com o solvente. . . . .	136
7.8	Resposta dos LBDs ao aquecimento do T3: (a) TR $\alpha$ e (b) TR $\beta$ . A transferência de energia não é apenas dependente da distância, como pode ser observado pela diferença da temperatura observada com relação à expectativa isotrópica. . . . .	139
7.9	Resposta dos LBDs ao aquecimento de ligantes $\beta$ -seletivos. As temperaturas resultantes em cada isoforma são mais semelhantes para o aquecimento do T3 do que para o aquecimento de ligantes seletivos. . . . .	140
7.10	Dependência temporal da resposta de cada resíduo do TR $\beta$ ao aquecimento do ligante T3. A passagem de azul a vermelho indica o aquecimento de cada resíduo. . . . .	141
7.11	Mecanismo de difusão térmica a partir do ligante que leva ao aquecimento da Asn233, passando pela Arg282 e pela Thr232. Este mecanismo pode estar associado à transmissão de sinal para o DBD. . . . .	142

# Lista de Tabelas

4.1	Caminhos encontrados em cada uma das simulações da dissociação do T3 usando DMAA . . . . .	57
4.2	Caminhos obtidos nas simulações usando DMAA para outras isoformas e outros ligantes. . . . .	59
4.3	Propriedades da força média nas simulações usando DMCI. . . . .	64
4.4	Forças máximas e integral das forças para as trajetórias de associação bem sucedidas do T3 (Força máxima em pN/Integral em pN ns). . . . .	73
4.5	Forças máximas e integrais das forças obtidas para a associação dos ligantes $\beta$ -seletivos estudados (Força máxima em pN/Integral da força em pN ns). . . . .	75
5.1	Energias de interação do Triac nas simulações. . . . .	81
7.1	Cadeias laterais com contribuições mais importantes. . . . .	137
7.2	Resíduos que respondem ao aquecimento dos ligantes $\beta$ -seletivos de forma diferente nos receptores $\alpha$ e $\beta$ (Numeração de acordo com o TR $\beta$ ). . . . .	141



## Capítulo 1

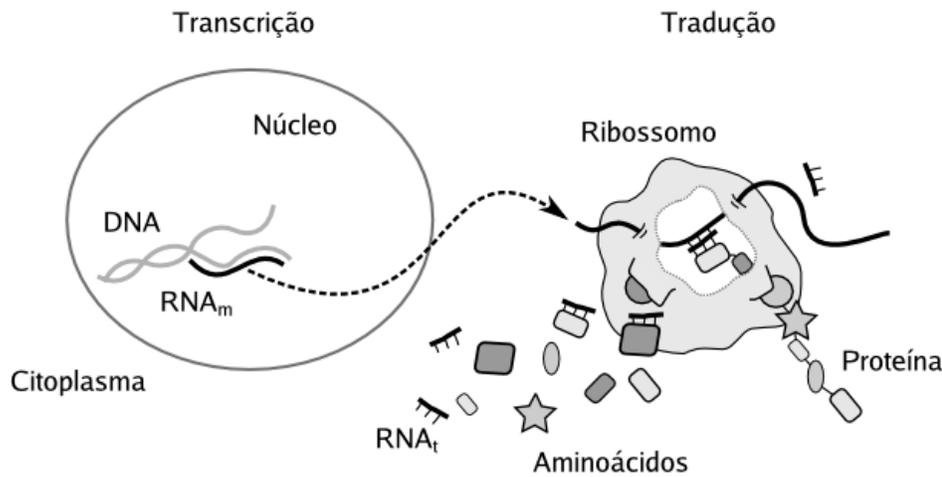
# Receptores Nucleares: Função e Estrutura

Receptores nucleares formam uma superfamília de proteínas responsáveis pela regulação da transcrição de genes. A transcrição é, para a maioria dos receptores, ativada pela ligação de pequenas moléculas: os hormônios. Um único receptor pode ser responsável pela regulação da transcrição de 1% dos genes ativos em uma célula. São conhecidos 48 receptores desta família [8], e algo entre 15% e 30% dos fármacos disponíveis no mercado atuam sobre estas proteínas.

### 1.1 A síntese de proteínas na célula

O processo de decodificação dos genes levando à síntese das proteínas em eucariotos tem duas etapas fundamentais: a transcrição e a tradução. A transcrição consiste na síntese de um RNA mensageiro ( $\text{RNA}_m$ ), que contém a informação genética. Este processo ocorre no núcleo das células, como mostra a Figura 1.1. O  $\text{RNA}_m$ , em seguida, sai do núcleo e chega ao ribossomo [9].

No citoplasma os aminoácidos ligam-se a pequenos trechos de três bases nitrogenadas de RNA, conhecidos como fitas de RNA transportador ( $\text{RNA}_t$ ). Uma vez ligados ao  $\text{RNA}_t$ , os aminoácidos também entram no ribossomo. No ribossomo, as fitas de  $\text{RNA}_m$  e  $\text{RNA}_t$  se ligam de acordo com o pareamento de suas bases nitrogenadas, fazendo com que os aminoácidos sejam associados ao código de três bases indicado no  $\text{RNA}_m$ . Nesse momento, forma-se a ligação peptídica entre os aminoácidos. A entrada sucessiva de novos aminoácidos no ribossomo, seu pareamento com o  $\text{RNA}_m$  e a formação de ligações peptídicas leva, finalmente, à síntese da proteína.



**Figura 1.1.** Dogma central da biologia: A síntese de proteínas tem basicamente duas etapas: a transcrição e a tradução. Na transcrição uma fita de RNA<sub>m</sub> é produzida a partir do DNA. Na tradução a seqüência de nucleotídeos do RNA<sub>m</sub> codifica a seqüência de aminoácidos da proteína.

### 1.1.1 O controle da transcrição

A primeira etapa da síntese das proteínas é, portanto, a transcrição do gene codificado no DNA a uma fita de RNA<sub>m</sub> correspondente. A partir daí, o RNA sai do núcleo e o processo de síntese da proteína prossegue. O controle da síntese de uma determinada proteína é controlado quase sempre na primeira etapa: a transcrição. Uma proteína necessária em determinado momento tem seu gene correspondente transcrito. Uma proteína desnecessária tem seu gene correspondente reprimido. Desta forma, uma célula apenas produz RNA<sub>m</sub> correspondente às proteínas que serão produzidas.

A proteína responsável pela formação de moléculas de RNA<sub>m</sub> a partir do DNA é a RNA polimerase (RNAP). O mecanismo de ação desta proteína é bastante conhecido e sua estrutura já foi determinada. A cadeia de reações químicas que leva à formação do RNA consome ATP e leva à rápida transcrição de um segmento de DNA, contanto que nenhum mecanismo de repressão esteja presente.

Existem três tipos de fatores reguladores da transcrição: os fatores gerais, os fatores *upstream* e fatores de transcrição indutíveis [9]. Os fatores de transcrição

gerais são proteínas que se ligam a sítios de DNA em que a transcrição deve ser iniciada e trazem a RNAP ao seu encontro. São necessários para a síntese de todos os RNAs mensageiros. Fatores de transcrição *upstream* se ligam a elementos de resposta específicos no DNA, e atuam de forma não-regulada. Isto é, sua ligação com o DNA e sua atividade não depende de outros fatores reguladores. Podem induzir ou inibir a transcrição. O controle da transcrição ocorre pela síntese ou não dos fatores *upstream* em diferentes etapas do desenvolvimento celular. Já os fatores de transcrição indutíveis são semelhantes aos fatores *upstream* no sentido de que se ligam a trechos específicos de DNA. No entanto, sua atividade como ativadores ou inibidores depende da ligação de outras moléculas. São muito interessantes porque são ativados ou desativados de acordo com a demanda da célula e, desta forma, possuem especificidade temporal.

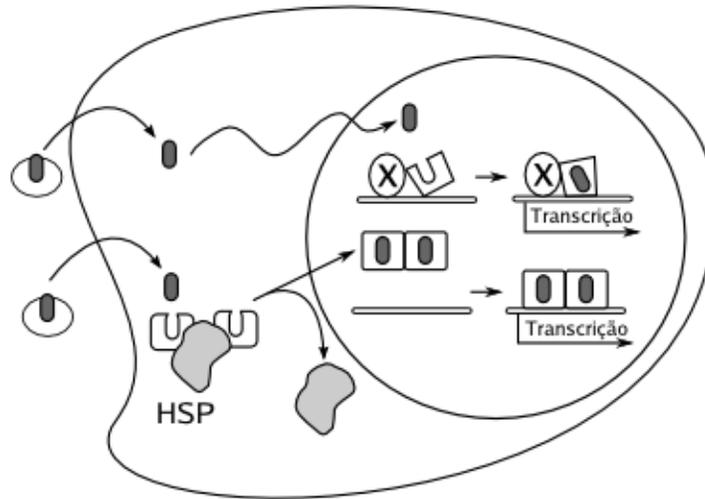
Receptores nucleares hormonais são fatores de transcrição indutíveis [8]. Se ligam a elementos de resposta específicos no DNA e geralmente atuam como repressores da transcrição. A associação com os ligantes os torna ativadores da transcrição, e o gene alvo é transcrito.

Os fundamentos estruturais do processo de transcrição não são simples. Sabe-se que o complexo de proteínas responsável pelo início da transcrição envolve seis fatores de transcrição gerais, sendo quatro deles, ainda, complexos multi-protéicos. Incluindo a RNAP, o complexo de proteínas tem torno de 20 mil aminoácidos.

### 1.1.2 O controle da transcrição pelos receptores nucleares

O mecanismo exato da atuação dos receptores nucleares hormonais não é conhecido. No entanto, sabe-se que estas proteínas são encontradas no citoplasma ou no núcleo (dependendo da classe de receptor). Os ligantes são pequenas moléculas basicamente hidrofóbicas. São transportados na corrente sanguínea e se difundem através da membrana celular, chegando ao citosol, como mostra a Figura 1.2. Os receptores geralmente atuam na forma de dímeros (homodímeros ou heterodímeros) [8, 10].

Alguns receptores nucleares permanecem, na ausência do ligante, ligados ao DNA, reprimindo a transcrição de um determinado gene. Neste caso, o ligante chega ao núcleo provavelmente por difusão e se liga ao receptor. A ligação do

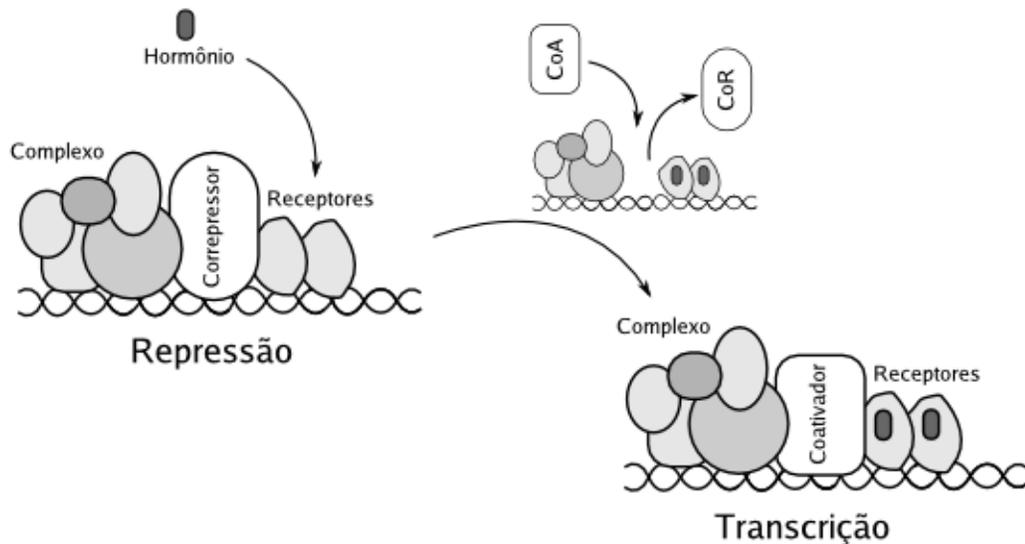


**Figura 1.2.** Mecanismo geral da ação dos receptores nucleares: Os receptores podem ser encontrados dentro ou fora do núcleo. Os receptores atuam geralmente na forma de dímeros, e a ligação dos hormônios induz a transcrição. Quando estão fora do núcleo, os receptores permanecem associados a proteínas de choque térmico (HSPs).

hormônio provoca mudanças estruturais no receptor, que passa a atuar como um ativador da transcrição.

Outros receptores permanecem no citoplasma, geralmente ligados a proteínas que colaboram com a manutenção de seu enovelamento (*Heat Shock Proteins*, por exemplo). O hormônio se liga ao receptor ainda no citoplasma, induzindo a dissociação do receptor da HSP. O receptor migra para o núcleo e se liga ao DNA, promovendo a transcrição.

No caso dos receptores que inibem a transcrição na ausência do ligante, sabe-se que a regulação envolve uma classe de proteínas chamadas cofatores. Existem cofatores repressores da transcrição (correpressores) e cofatores ativadores da transcrição (coativadores). A forma pela qual os receptores passam de inibir para ativar a transcrição parece estar fundamentalmente relacionada com a associação destes cofatores [8]. Supostamente, como ilustrado na Figura 1.3, o receptor permanece ligado ao correpressor na ausência do ligante. A associação do ligante promove a dissociação do correpressor e a associação do coativador.

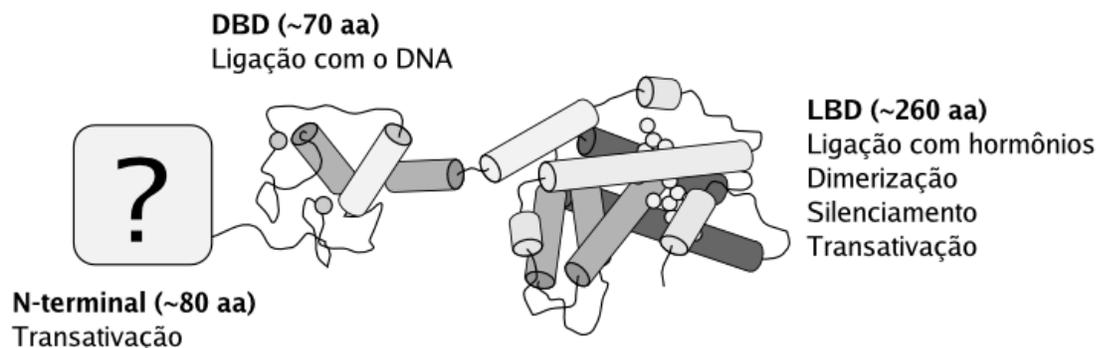


**Figura 1.3.** Alguns receptores permanecem ligados ao DNA na ausência do hormônio, inibindo a transcrição. A associação do hormônio induz a dissociação do corressor e a associação do coativador.

### 1.1.3 O papel dos hormônios

Os receptores nucleares são fatores de transcrição dependentes da associação com hormônios. Foram identificados cerca da metade dos ligantes dos aproximadamente 48 tipos diferentes de receptores nucleares conhecidos. Existem alguns receptores, no entanto, que não são específicos (receptores promíscuos), capazes de se associar a vários ligantes diferentes [8]. Este é o caso, por exemplo, dos receptores dos ácidos graxos e ácidos biliares. Muitos receptores são, ainda, órfãos (i. e. sem ligante reconhecido). Mais ainda, há um receptor para o qual a estrutura cristalográfica sugere a ausência de uma cavidade de ligação, de forma que este receptor pode ter uma atividade independente da associação de ligantes. Ainda não se sabe como este receptor tem sua atividade regulada [11].

De qualquer forma, a maior parte dos receptores nucleares dependem da ligação dos hormônios para promover a transcrição. A concentração destes ligantes na célula determina se os genes associados a cada receptor serão transcritos ou não. A afinidade dos receptores nucleares em relação aos seus ligantes é muito alta. Por exemplo, o ligante natural T3 do Receptor do Hormônio Tireoidiano possui



**Figura 1.4.** Representação esquemática dos domínios estruturais dos receptores nucleares e suas funções.

uma constante de dissociação da ordem de  $10^{-9}$  mol L<sup>-1</sup>. Desta forma, pequenas concentrações dos hormônios no organismo são capazes de induzir grandes respostas dos receptores. É graças às baixas concentrações necessárias destas moléculas que, mesmo sendo principalmente hidrofóbicas, podem se difundir no meio celular e cumprir sua função reguladora.

Os hormônios são em sua maioria moléculas relativamente pequenas (de 30 a 50 átomos), hidrofóbicas, possuem grupos aromáticos e alguns poucos grupos hidrofílicos em suas extremidades [12]. Se associam ao LBD dos seus receptores pela formação de várias interações dispersivas e poucas, mas importantes, interações hidrofílicas [7]. As cavidades de ligação dos LBD geralmente têm estruturas que conferem grande especificidade. A grande especificidade destes receptores e as baixas concentrações de hormônios necessárias para sua ativação torna os NRs importantes alvos para a formulação de medicamentos. Diversas doenças já são tratadas com ligantes que atuam sobre receptores nucleares, sendo os anticoncepcionais, a Vitamina A, os glucocorticóides e os hormônios tireoidianos os mais conhecidos.

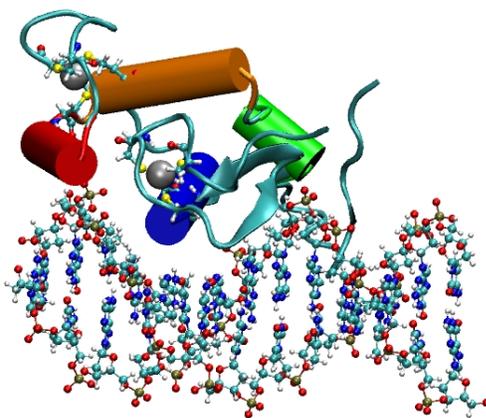
## 1.2 Estrutura

Os receptores nucleares possuem três domínios: um domínio N-terminal, que possui um fator ativador da transcrição, um domínio de ligação com o DNA (DBD, de *DNA binding domain*), e um domínio C-terminal que possui várias funções, sendo a mais destacada a ligação com os hormônios [10]. O domínio N-terminal

tem uma seqüência de aminoácidos muito variável entre as diferentes famílias dos receptores nucleares e possui em torno de 80 resíduos. O DBD, por sua vez, possui cerca de 70 resíduos e 40% de similaridade na seqüência de aminoácidos entre as diferentes famílias de receptores. É o domínio mais conservado. Por fim, o domínio C-terminal, conhecido como LBD (de *ligand binding domain*), é formado por cerca de 260 resíduos. As seqüências de aminoácidos dos LBDs são em torno de 20% similares entre as famílias de receptores nucleares. Estruturas cristalográficas do LBD do DBD de vários receptores diferentes já são conhecidas, mas nenhuma estrutura do domínio N-terminal foi obtida [8, 12]. Suspeita-se que este domínio seja fundamentalmente desestruturado em solução. A Figura 1.4 mostra esquematicamente as estruturas e funções dos receptores nucleares.

### A ligação com o DNA

O Domínio de Ligação com o DNA (DBD) reconhece seqüências de bases nitrogenadas no DNA. Estas seqüências são encontradas na forma de repetições diretas ou antissimétricas (palíndromos) de 5 bases nitrogenadas, separadas por 3 ou 5 outros nucleotídeos. Estas seqüências são específicas para cada receptor e são conhecidas como elementos de resposta dos hormônios (HRE, de *Hormone Response Elements*) [13].



**Figura 1.5.** Estrutura do domínio de ligação com o DNA do receptor do estrógeno. A ligação com o DNA se dá através de dois *dedos* de Zinco. Os átomos de Zinco ligados a cisteínas estão representados por esferas prateadas.

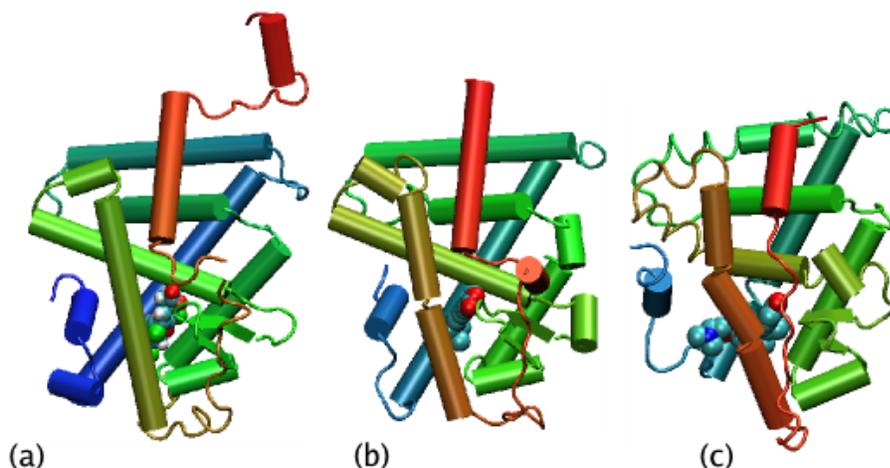
Os DBDs são estruturas formadas por dois *dedos de zinco*, estruturas bastante comuns em proteínas que se ligam ao DNA [9]. Cada um destes *dedos de zinco* possui quatro cisteínas, que se conservam nas diferentes classes de receptores. Estas cisteínas são responsáveis pela coordenação dos íons de zinco. A estrutura do DBD do receptor do estrógeno está representada na Figura 1.5. Os dedos de zinco são loops contendo as quatro cisteínas orientadas de forma geometricamente favorável à coordenação dos átomos de zinco (esferas cinzas). Uma das hélices é responsável pelo reconhecimento do HRE e outra hélice é responsável por fazer interações menos específicas com o DNA.

Os receptores se ligam aos elementos de resposta formando homodímeros ou heterodímeros [14, 15]. Os DBDs de cada um dos receptores, no dímero, se ligam a trechos de DNA separados por aproximadamente 9 bases nitrogenadas. Esta distância consiste em uma volta completa da hélice do DNA. Desta forma, os DBDs interagem pela mesma face da hélice. Os DBDs não possuem interações fortes entre si, de forma que a estabilidade do dímero depende da dimerização dos LBDs.

### 1.2.1 O domínio de ligação com os hormônios

O maior domínio dos receptores nucleares também é o que possui a estrutura mais complexa e a maior variedade de funções [12]. A Figura 1.6 mostra as estruturas de três LBDs de três receptores diferentes [7, 16, 17]. Como pode ser observado, as estruturas são bastante similares do ponto de vista global. Os ligantes estão posicionados de forma similar no sítio de ligação e possuem uma extremidade hidrofílica que aponta na direção de um pequeno conjunto de folhas- $\beta$  (em primeiro plano). A hélice C-terminal, em azul, parece fechar a cavidade de ligação.

Os LBDs possuem em torno de 12  $\alpha$ -hélices que estão organizadas na forma de um “sanduíche” [7]. Três grupos de três ou quatro hélices compõem a estrutura de forma que os dois grupos externos possuem hélices aproximadamente paralelas, enquanto que o grupo de hélices interno é perpendicular. A conexão com o DBD se dá através da região N-terminal, em vermelho nas estruturas da Figura 1.6. Estas estruturas possuem um fator ativador da transcrição na região C-terminal (azul) e superfícies de dimerização nas regiões próximas às hélices 10 e 11 (hélices



**Figura 1.6.** Estruturas dos LBDs dos receptores dos hormônios (a) tireoideano (b) ácido retinóico e (c) estrógeno. Os LBDs de diferentes receptores têm estruturas semelhantes, formadas por aproximadamente 12 hélices e duas pequenas folhas- $\beta$ .

alongadas em azul claro).

As superfícies de dimerização compreendem aproximadamente 11% da área superficial dos LBDs. As estruturas dos dímeros aparentemente são fundamentais para a atividade destes receptores, mas ainda não se sabe com certeza como a dimerização e a associação dos ligantes levam à transmissão de sinal para o complexo protéico responsável pela transcrição [14, 15, 18, 19].

### Transmissão de sinal

Existem duas explicações sugeridas para os mecanismos de sinalização que permitem que a associação de ligantes leve ao controle da transcrição. A primeira está relacionada com a superfície de ligação com cofatores [8]. Esta superfície é formada por alguns poucos aminoácidos das hélices 11 e 12 (região C-terminal do LBD). Já se sabe que a associação do ligante influencia a dinâmica e a estrutura desta região e, portanto, pode modificar a superfície de interação com cofatores. Como foi explicado, a sinalização pode se dar pelo fato da associação de um correpessor ser favorável na ausência do ligante, enquanto que a ligação de um coativador pode ser estável na presença do ligante. A associação do ligante levaria a mudanças

estruturais no LBD que permitem esta variação na afinidade das ligações com diferentes cofatores. Este modelo implica que o receptor deve permanecer ligado ao DNA, uma vez que o cofator faz parte do complexo responsável pela transcrição ou repressão. Esta é uma proposta razoável para os receptores que atuam como repressores na ausência do ligante [20].

No entanto, as modificações estruturais causadas pela associação do ligante ao LBD são mais drásticas que apenas a modificação da superfície de interação com os cofatores. Em particular, ocorre um importante rearranjo das hélices das superfícies de dimerização. Desta forma, parte do processo de sinalização pode se dar pelo efeito do ligante na capacidade do receptor de formar dímeros [18, 19, 21].

O efeito da dimerização sobre a atividade dos receptores depende das relações do LBD com o DBD, uma vez que a formação de dímeros é independente da associação do receptor com o DNA. No entanto, ninguém conseguiu ainda obter estruturas do receptor completo (ou mesmo do conjunto DBD-LBD), provavelmente porque estes dois domínios são conectados por uma hélice de grande mobilidade [22]. Mesmo que estas estruturas fossem obtidas, provavelmente estariam fortemente influenciadas pelo empacotamento cristalino, e a posição relativa dos domínios dificilmente representaria sua interação fisiológica.

Conhecendo estas limitações do sistema, o grupo do Prof. Polikarpov realizou experimentos de espalhamento de raios-X em baixo ângulo (SAXS), e determinaram estruturas de baixa resolução do conjunto DBD-LBD em solução [21]. Estas estruturas sugeriram um modelo interessante para a regulação da transcrição induzida pela associação do ligante: Foi demonstrado que, em solução, os receptores do hormônio tireoidiano podem formar tetrâmeros na ausência do ligante. Ao adicionar o hormônio à solução, estes tetrâmeros se dissociam e formam dímeros. Como os dímeros são as estruturas funcionais, isto sugere um mecanismo pelo qual o ligante pode induzir a transcrição. Mais ainda, as estruturas de baixa resolução obtidas permitiram determinar distância entre os DBDs nos tetrâmeros e nos dímeros. A distância entre os elementos de resposta no DNA é bem conhecida, pelo número de bases nitrogenadas envolvidos. As estruturas mostraram que, enquanto no tetrâmero a distância entre os LBDs era incompatível com a distância dos HREs, no dímero os DBDs estavam a uma distância adequada. Isto é, aparentemente, a associação do ligante não só promoveu a dissociação dos tetrâmeros,

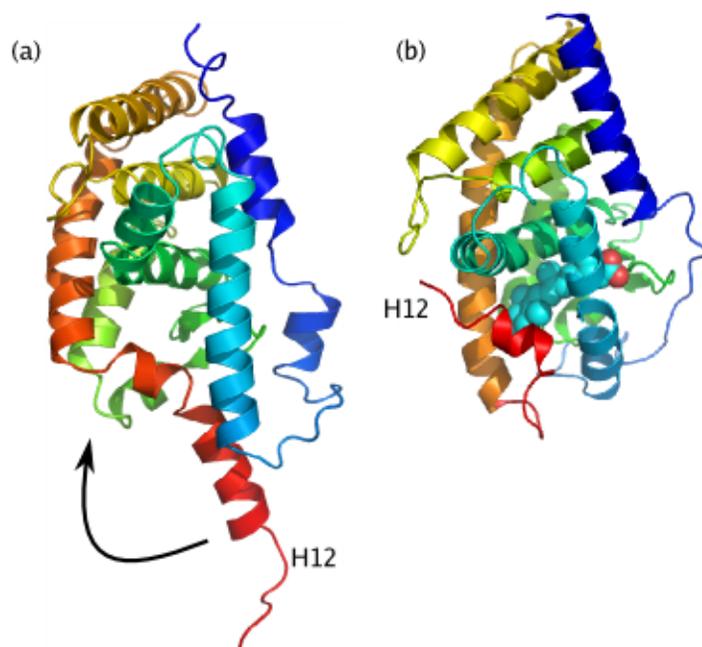
mas ainda permitiu que as estruturas diméricas formadas estejam de acordo com a associação do receptor ao DNA. Ainda não se sabe, no entanto, se existem de fato tetrâmeros biologicamente relevantes no ambiente celular.

### 1.3 Aspectos dinâmicos do LBD

Existem muitos estudos que abordam aspectos dinâmicos dos LBDs. A grande maioria procura propriedades funcionais da dinâmica da hélice C-terminal dos receptores (a hélice 12). O estudo sistemático das propriedades dinâmicas da H12 foi motivado pelas relações entre as estruturas com e sem ligante dos receptores do ácido retinóico (RAR e RXR) [16, 23]. Estas estruturas estão representadas na Figura 1.7. Estas duas estruturas foram, juntamente com a estrutura do TR $\beta$  ligada ao T3 [7], as primeiras estruturas de LBDs obtidas experimentalmente. Cerca de cinquenta estruturas de LBDs associados a ligantes foram obtidas desde então, mas há menos de dez estruturas *apo* (sem ligante) determinadas. A dificuldade da determinação das estruturas cristalográficas dos LBDs sem ligante pode estar relacionada com sua maior mobilidade.

Muitos resultados apontam para uma maior estabilidade do LBD na presença do ligante, ou na presença de cofatores. Vários estudos buscando estas correlações foram feitos, em particular, para os receptores do estrogênio. A ligação de agonistas protege a H12 da clivagem pela tripsina [24], mas a ligação de antagonistas têm um efeito bastante reduzido. Resultados surpreendentes foram obtidos para a estabilização do LBD pela associação do ligante em experimentos de desnaturação induzida por temperatura. Estudos independentes mostraram que a temperatura de desnaturação não aumenta pela associação do Estradiol [25, 26]. A associação com cofatores, no entanto, tem um efeito estabilizador bastante importante. Curiosamente, um ligante pode ter efeitos distintos nos padrões de desnaturação das diferentes isoformas. O Estradiol aumenta a exposição dos triptofanos na isoforma ER $\alpha$ , mas diminui sua exposição na isoforma ER $\beta$ . Nos TRs, como será discutido no Capítulo 6, os ligantes aumentam significativamente a temperatura de desnaturação dos LBDs.

Estudos de mutações nos LBDs, por sua vez, têm mostrado que o LBD é altamente cooperativo. Por exemplo, para o PPAR $\gamma$ , a interação entre as hélices 1 e 8



**Figura 1.7.** Estruturas do RAR (a) sem ligante e (b) ligada ao ácido retinóico, sugerindo o fechamento da H12 de acordo com o mecanismo ratoreira de associação dos hormônios.

(distantes do sítio ativo), são fundamentais para a estabilidade do receptor associado ao ligante [27]. Mutações também podem provocar perturbações dinâmicas da hélice 12 [28, 29]. Interações entre domínios distantes do receptor completo também parecem ser relevantes em alguns contextos funcionais [30]. No caso dos TRs, há mutações em praticamente toda a extensão do LBD que levam a receptores funcionalmente defeituosos. Muitas delas aumentam as taxas de dissociação do ligante e não estão próximas da H12 [31, 32].

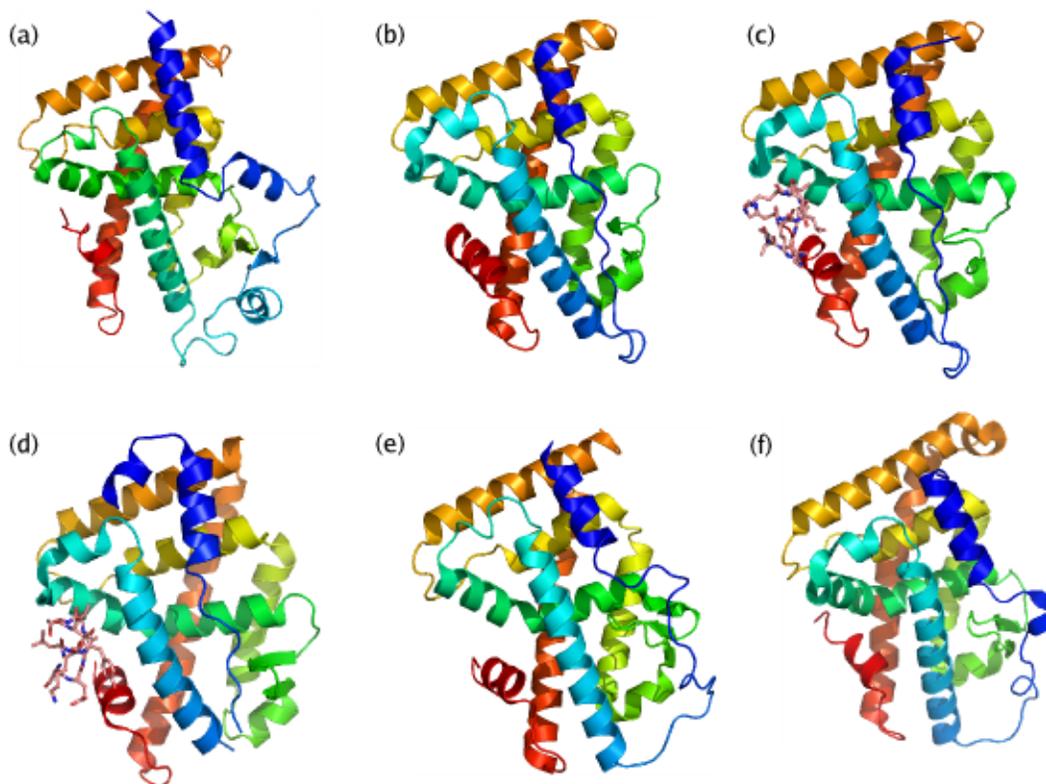
Alguns estudos têm mostrado que a dinâmica do receptor da vitamina D (VDR) é bastante interessante. Por exemplo, o LBD do VDR é capaz de se associar a ligantes com volumes moleculares muito diferentes. A cavidade de ligação do VDR pode ser modulada pelos ligantes, e seu volume varia em mais de 20% [33]. Simulações de dinâmica molecular mostraram, ainda, que um ligante pode assumir mais de uma conformação na cavidade. O ligante favorece a associação do coativador em uma das conformações e age, portanto, como um agonista. Em outra conformação

o ligante favorece a ligação do correpressor e, assim, atua como um agonista-inverso (o agonismo-inverso é diferenciado do antagonismo, no qual o ligante prejudica a ligação de qualquer cofator) [34].

### 1.3.1 A dinâmica da hélice 12

As estruturas da Figura 1.7 têm diferenças importantes, induzidas pela associação do ligante. A diferença mais notável é a movimentação da hélice 12, que na estrutura sem ligante se afasta do corpo do LBD, abrindo a cavidade de ligação. Esta comparação [35] sugeriu imediatamente um mecanismo para a entrada e saída do ligante: o mecanismo “ratoeira”. Supostamente, o LBD deveria permanecer com a hélice 12 aberta na ausência do ligante. A entrada do ligante induziria o fechamento da H12, prendendo o ligante na cavidade. Estas duas estruturas motivaram uma grande variedade de trabalhos a respeito do papel da hélice 12 na função dos LBDs. Estes trabalhos têm mostrado, de forma clara, que existem correlações importantes entre a dinâmica desta hélice e a modulação da transcrição. No entanto, o papel da dinâmica da H12 na entrada e saída dos ligantes do LBD não parece totalmente correto.

O papel funcional da dinâmica da H12 nos LBDs parece estar relacionado com a associação de coativadores e correpressores. Como vimos, a regulação da transcrição depende da substituição dos correpressores por coativadores, geralmente induzida pela associação dos hormônios. Vários trabalhos mostraram que a superfície do LBD na qual os coativadores se ligam depende do posicionamento da H12 de acordo com a estrutura do *holo*-RXR [1, 18, 23, 36, 37]. Alguns antagonistas do receptor do estrogênio, o Tamoxifeno por exemplo, impedem o posicionamento correto da H12 [37]. No entanto, os movimentos da H12 parecem ser menos extensos do que foi originalmente sugerido pelas estruturas dos receptores do ácido retinóico. Por exemplo, estruturas dos receptores do estrogênio e dos receptores ativados por proliferadores de peroxissomo, sem ligante, se assemelham mais às estruturas *holo* dos outros receptores que à estrutura *apo* do RXR [1, 2, 23]. Como mostra a Figura 1.8, mesmo estruturas de receptores associadas a coativadores, sem ligante e com a H12 na posição correta, podem ser obtidas. A imagem de um LBD com duas estruturas canônicas associadas à presença e à ausência do ligante



**Figura 1.8.** Estruturas de LBDs sem ligante nas quais a H12 aparece fechada: (a) PPAR $\gamma$  [1]. (b) ERR $\gamma$ 2 [2]. (c) ERR $\gamma$ 2 associado a um peptídeo do coativador [3]. (d) PPAR $\gamma$  associado a um peptídeo do coativador [4]. (e) Receptor órfão HMR [5]. (f) Receptor órfão DHR38 [6]. A hélice 12 está representada em vermelho, e os peptídeos coativadores estão representados por palitos em (c) e (d).

está sendo abandonada. A H12 tem uma dinâmica que depende da associação do ligante, da associação dos cofatores e de várias mutações [24, 28, 29, 38–40]. Diversos receptores são, inclusive, parcialmente ativos na ausência do ligante, sugerindo que o recrutamento dos coativadores pode ocorrer nestas condições, o que é inclusive observado em algumas estruturas [3, 4]. Como este recrutamento depende do correto posicionamento da H12, fica evidente que a conformação ativa pode ser encontrada nos receptores sem ligante [39]. A presença do ligante, ou do coativador, estabiliza a conformação ativa da H12.

A mobilidade da H12 é, certamente, importante. Sua posição em relação ao

LBD varia entre a conformação que favorece a ligação do coativador e a posição que favorece a ligação do correpressor. Atualmente acredita-se que a ligação dos hormônios desloca este equilíbrio conformacional para a formação da superfície de ligação dos coativadores, favorecendo a transcrição. Na ausência do ligante este equilíbrio favorece a ligação dos correpressores. Antagonistas podem ser desenvolvidos que perturbam a dinâmica da hélice 12, em particular bloqueando sua interação com a H3. Várias mutações parecem, também, ter este efeito, e geram receptores inativos ou parcialmente ativos [28, 29]. Simulações de dinâmica molecular [40–43], têm sustentado esta visão dinâmica da H12.

A importância desta hélice como um elemento chave para o controle da transcrição pode estar sendo sobrevalorizada. A maior parte dos estudos sobre a dinâmica do LBD foram feitos enfocando o papel desta hélice motivados pelas estruturas do RXR sem ligante. O fato desta hélice ser a hélice C-terminal do receptor, portanto de fácil deleção, também facilita seu estudo. Na verdade, muitos outros dados funcionais apontam para uma importância similar de outras regiões da estrutura. Os LBDs parecem ser estruturas fundamentalmente cooperativas, em que a mobilidade e estabilidade de cada elemento é essencial para a estrutura como um todo.

### 1.3.2 Mecanismos de associação e dissociação dos hormônios

O modelo ratoeira para a associação dos ligantes não parece ser totalmente correto. Em primeiro lugar, a variação conformacional da H12 não parece ter em outros receptores a extensão sugerida pelas estruturas do RXR. Algumas simulações de dinâmica molecular sugeriram que, de fato, é a abertura da H12 que permite a dissociação dos ligantes do RAR [41]. Outros estudos da dissociação do ácido retinóico deste mesmo receptor sugerem, no entanto, outros caminhos de dissociação [42, 44].

A maior incoerência associada ao mecanismo ratoeira vêm de que tanto correpressores como coativadores são proteínas grandes que se ligam na região do LBD envolvida neste mecanismo. Aparentemente, para que o ligante se dissocie por este caminho, os cofatores deveriam se dissociar da proteína. Isto é pouco provável, dado que o ligante é uma molécula pequena, com uma dinâmica mais rápida.

Além disso, é a associação e a dissociação dos hormônios que deve regular a associação e dissociação dos cofatores, e não o inverso. Detalhes de outros mecanismos sugeridos por simulações computacionais serão discutidos no Capítulo 4.

Evidências experimentais da importância de diferentes elementos da estrutura para os mecanismos de dissociação foram obtidos usando estudos de fluorescência. Gee e Katzenellenbogen mostraram que intermediários parcialmente desnaturados permitem a entrada e saída dos ligantes com velocidades muito maiores que as observadas nos receptores nativos [45]. Foi sugerido que em condições fisiológicas estas estruturas parcialmente desnaturadas podem ser importantes para os mecanismos de associação e dissociação, mesmo tendo tempos de vida muito curtos. Por sua vez, no receptor do estrogênio, uma mutação é capaz de reduzir tanto as taxas de associação como de dissociação do ligante. Isto implica que esta mutação estabiliza uma conformação compacta que se associa ao ligante com maior afinidade, mas, ao mesmo tempo, dificulta sua entrada no LBD [39]. Neste caso, o equilíbrio entre as taxas de associação e dissociação do ligante resultam em um receptor com uma afinidade menor que a do receptor nativo. Este estudo sugere que estruturas menos compactas do LBD são importantes para a entrada e para a saída do ligante. A mutação estudada encontra-se na região do loop entre as hélices 11 e 12 e, desta forma, relaciona a dinâmica da H12 com a dinâmica do ligante. No entanto, no mesmo trabalho um receptor no qual a H12 é eliminada do LBD foi produzido. Este receptor, sem a H12, não possui taxas de associação e dissociação significativamente diferentes das do LBD completo. Assim, a mutação parece estar estabilizando uma conformação compacta do LBD que não envolve a H12 [39]. Estudos recentes usando espectrometria de massas, não publicados, de Ana Carolina Figueira no grupo do Prof. Polikarpov, mostram que a proteção da H12 pelo ligante não é muito importante. A exposição da H12 ao solvente parece ser similar na presença ou na ausência do hormônio.

## Capítulo 2

# Os receptores do Hormônio Tireoidiano

Todos os estudos realizados neste trabalho foram feitos a respeito da dinâmica e estrutura dos Receptores do Hormônio Tireoidiano. Estes receptores são importantes para a regulação da atividade metabólica, para a diferenciação celular, e estão associados a várias doenças humanas, como o hipo- e o hiper-tireoidismo, alguns tipos de câncer, diabetes e obesidade [7, 46]. O tratamento destas doenças frequentemente é feito pela administração dos hormônios naturais e, como será discutido, esta prática leva a efeitos colaterais graves. Os efeitos colaterais são causados, no entanto, pela ação dos hormônios sobre diferentes isoformas do receptor, de forma que estratégias racionais para o desenvolvimento de novos ligantes clinicamente melhores são possíveis.

### 2.1 Membros da família dos receptores do hormônio tireoidiano

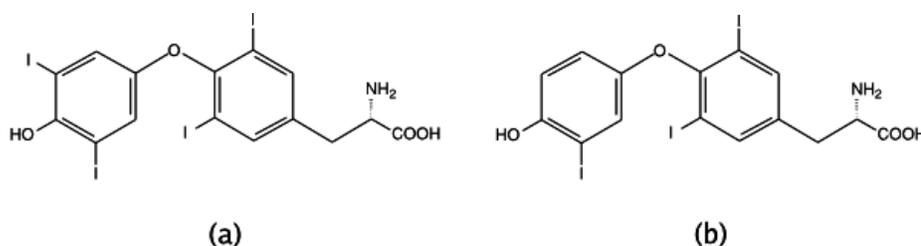
Existem duas isoformas básicas dos receptores do hormônio tireoidiano, que são resultantes da transcrição de dois genes distintos conhecidos como  $\alpha$  e  $\beta$  [7]. Mecanismos de splicing alternativo levam a isoforma  $\alpha$  a se manifestar em três formas diferentes ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  e  $\alpha 3$ ), enquanto que a isoforma  $\beta$  aparece em duas variantes ( $\beta 1$  e  $\beta 2$ ) [47]. As variantes  $\alpha 2$  e  $\alpha 3$  não se ligam aos hormônios, e provavelmente atuam como fatores de transcrição *upstream* (não regulados).

As isoformas são bastante semelhantes entre si. A seqüência de aminoácidos dos LBDs da isoforma  $\alpha 1$  e das isoformas  $\beta$  são 86% similares. Os LBDs das isoformas  $\beta 1$  e  $\beta 2$  são idênticos. Como apenas uma variante  $\alpha$  se liga aos hormônios e como

as variantes  $\beta$  têm LBDs idênticos, geralmente usa-se a terminologia  $\alpha$  e  $\beta$  sem maiores distinções. Ambas as isoformas se ligam aos mesmos ligantes naturais com grande afinidade [46, 47].

### 2.1.1 Hormônios tireoidianos naturais

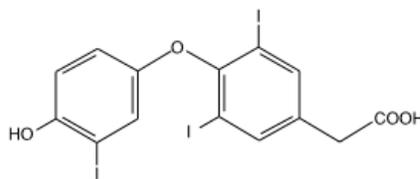
O principal hormônio secretado pela glândula tireóide é o 3,5,3',5'-tetraiodo-L-tironina (conhecido como tiroxina, ou T4) [47]. Uma quantidade menor de 3,5,3'-triiodo-L-tironina (T3) é produzida. Estes ligantes estão representados na Figura 2.1. No entanto, nos tecidos periféricos ocorre uma substancial perda de iodo das moléculas de T4 na posição 5' e a conseqüente formação de T3, de forma que o T3 é o ligante fisiologicamente mais importante.



**Figura 2.1.** Ligantes naturais mais importantes: (a) T4 (ou tiroxina) e (b) T3, ou triiodotironina. O T4 é produzido na glândula tireóide e a perda de um Iodo leva à formação do T3, que é o principal ligante fisiológico.

A abundância do T3 em cada tecido depende não só de sua produção, como da atividade dos processos de transporte e degradação dentro e fora das células. Os hormônios se ligam aos receptores com grande afinidade. Por exemplo, a constante de equilíbrio de associação do T3 com o receptor  $TR_{\beta}$  é da ordem de  $10^9$  Mol  $L^{-1}$ , mostrando que pequenas concentrações deste hormônio no organismo já são suficientes para estimular a resposta dos receptores [48, 49].

Um terceiro ligante natural importante é o ácido triiodo-acético, também conhecido como Triac (Figura 2.2). Este ligante é um subproduto do metabolismo do T3 e aparece em concentrações baixas no organismo. No entanto, é seletivo em relação à isoforma  $\beta$  e, por esta razão, passou a ser importante do ponto de vista clínico [50].



**Figura 2.2.** O ligante natural Triac. Este ligante é  $\beta$ -seletivo, sendo de grande importância farmacêutica.

O Triac difere do T3 pela remoção do grupo amino e de um carbono da cadeia, na extremidade hidrofílica do ligante. Esta pequena diferença faz com que o Triac tenha uma constante de dissociação do receptor  $\beta$  quase 3 vezes menor do que em relação ao receptor  $\alpha$  [49].

### 2.1.2 Distribuição no organismo e ação

As isoformas  $\alpha$  e  $\beta$  estão distribuídas de forma heterogênea no organismo. O receptor TR $\beta$ 1 é expresso em grandes quantidades no fígado e nos rins. O receptor TR $\beta$ 2 é particularmente abundante no hipotálamo e na glândula pituitária. Já o receptor TR $\alpha$ 1 é encontrado em concentrações altas nos tecidos cardíacos [47].

Desta forma, apesar de serem regulados pelos mesmos ligante naturais, os efeitos de cada isoforma no organismo são distintos. Os receptores  $\beta$  têm uma importante função regulatória do metabolismo basal e do consumo de gorduras e colesterol. Por outro lado, a isoforma  $\alpha$  está associada ao controle de funções cardíacas. Esta diferença de distribuição no organismo é o que faz deste sistema um importante alvo para o desenvolvimento de medicamentos. Em particular, ligantes que se ligam seletivamente à isoforma  $\beta$  poderiam ser úteis para o controle da obesidade, sem provocar efeitos deletérios sobre o controle de atividade cardíaca. Entretanto, isto não ocorre. Os tratamentos de disfunções metabólicas que usam hormônios tireoidianos naturais (a única opção atualmente disponível) possuem efeitos colaterais muito graves [46]. A seletividade do Triac em relação ao TR $\beta$  fez com que este ligante fosse uma boa opção, por induzir efeitos colaterais cardíacos mais leves que o T3. No entanto, em 1999 o FDA deixou de recomendar o Triac como um medicamento seguro para o tratamento da obesidade, por provocar vários efeitos colaterais como diarreia, alterações de humor, e inclusive hipotireoidismo [51].

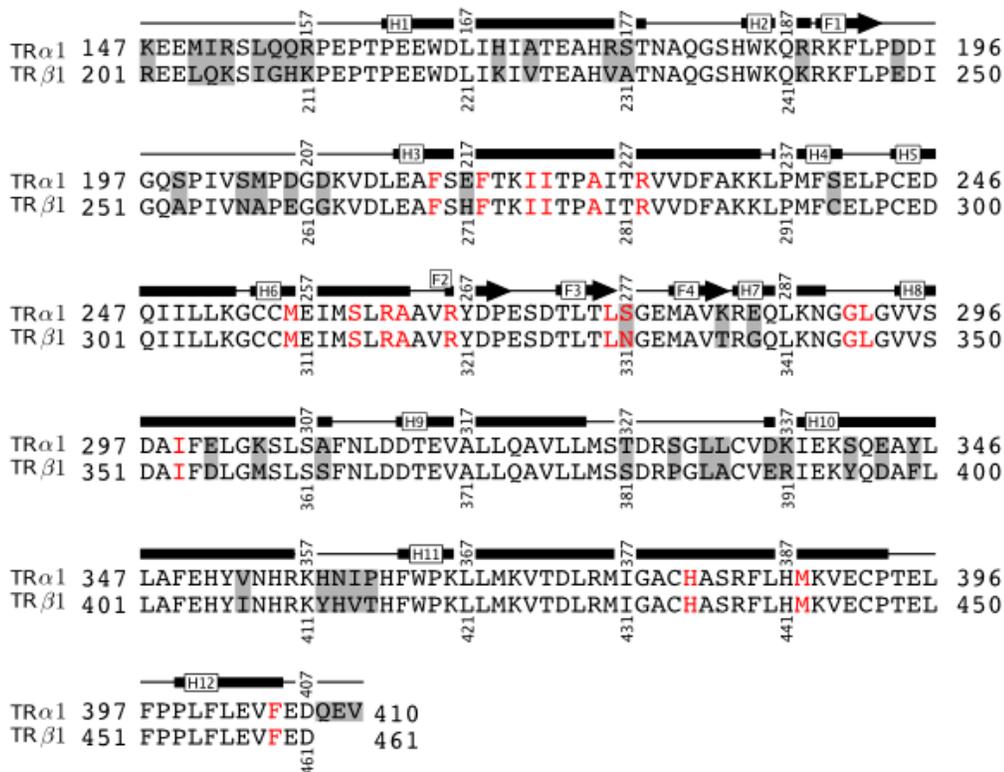
O uso recomendado dos hormônios tireoidianos é hoje restrito ao tratamento de hipotireoidismo, no qual apenas repõem-se as taxas normais de hormônio no organismo, e para suprimir o crescimento da glândula tireóide em casos de câncer. Mesmo assim, em casos graves de hipotireoidismo, o controle externo da concentração hormonal é tão precário e sensível que freqüentemente os pacientes passam a ter sintomas de bipolaridade (alternância entre momentos de grande euforia com momentos de depressão) [46].

Hoje sabe-se que estes efeitos colaterais estão associados à ação dos hormônios sobre as diferentes isoformas do receptor, em diferentes tecidos do organismo. Por esta razão existe uma pesquisa intensa buscando análogos dos hormônios que tenham atividades específicas e seletividades controladas. Como veremos, no entanto, a pesquisa nesta área tem sido feita em grande parte por tentativa e erro, e mesmo estruturas de alta resolução têm se mostrado insuficientes para elucidar os mecanismos da seletividade dos ligantes mais importantes. O desenvolvimento “racional” de novos medicamentos é apenas incipiente nesta área.

## 2.2 Os domínios de ligação com os hormônios

Os domínios de ligação com os hormônios dos receptores TR $\beta$ 1 e TR $\beta$ 2 são idênticos, de forma que o desenvolvimento de ligantes seletivos para uma ou outra isoforma não é possível baseando-se em sua estrutura. Por outro lado, 16% dos resíduos são diferentes em relação aos resíduos da isoforma TR $\alpha$ 1 [47]. O desenvolvimento de ligante seletivos para isoformas  $\beta$  ou  $\alpha$  é, portanto, possível. De fato, tanto o T3 como o T4 possuem afinidades ligeiramente diferentes em relação às isoformas, e o ligante Triac é bastante  $\beta$ -seletivo [51].

Na Figura 2.3 vemos uma comparação das estruturas primárias dos LBDs das isoformas  $\alpha$  e  $\beta$ . O LBD do TR $\alpha$ 1 possui 264 aminoácidos, enquanto que o LBD da isoforma TR $\beta$  possui 261 aminoácidos. Uma diferença notável e importante é a maior extensão (3 resíduos a mais) da região C-terminal da isoforma  $\alpha$ . Esta região é fundamental para a ligação com cofatores. No total, 43 resíduos são diferentes, cerca de 16% do total. A numeração dos LBDs é diferente por que o domínio N-terminal da isoforma  $\alpha$  é menor que o da  $\beta$ .

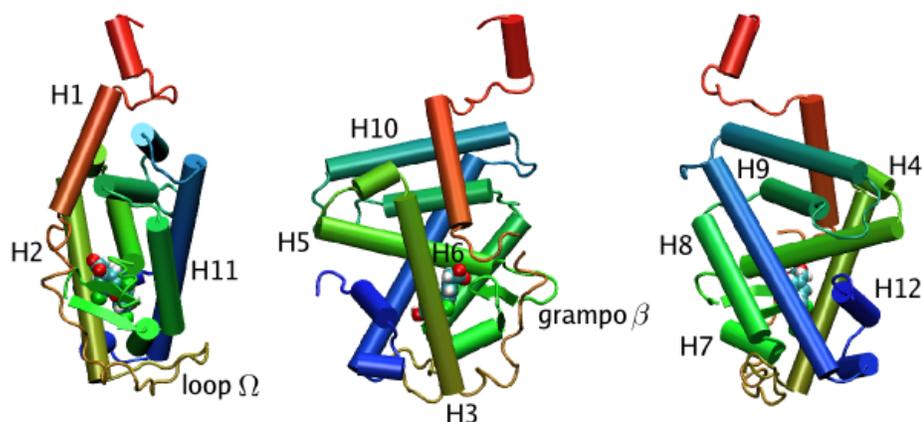


**Figura 2.3.** Sequência de aminoácidos e estrutura secundária dos LBDs dos receptores  $\alpha$  e  $\beta$ . Os resíduos diferentes estão sombreados e resíduos do sítio de ligação estão em vermelho [7].

### 2.2.1 Características estruturais

O domínio de ligação com o hormônio do receptor TR $\alpha$ 1 pode ser observado na Figura 2.4 [52]. Suas características principais são semelhantes às características estruturais dos LBDs de outros receptores nucleares. A estrutura é formada por três conjuntos de  $\alpha$ -hélices agrupados na forma de um “sanduíche”, no qual as hélices centrais (H6, H9 e H10) se encontram perpendiculares às hélices superficiais. Além disso, a estrutura possui um grampo  $\beta$ , localizado entre as hélices 6 e 7.

A hélice 12, nesta estrutura (assim como em todas as outras estruturas conhecidas de receptores do hormônio tireoidiano) está dobrada sobre o corpo da proteína, fechando a cavidade de ligação. O mesmo fenômeno se observa na maioria das outras estruturas conhecidas de LBDs de receptores nucleares, como pode ser visto



**Figura 2.4.** Estrutura do LBD dos receptores do hormônio tireoidiano. A estrutura mostrada aqui corresponde à estrutura do LBD do receptor TR $\alpha$ 1 humano ligado ao ligante Triac e está apresentada em três ângulos diferentes.

nas estruturas dos receptores do ácido retinóico e do estrógeno da Figura 1.6.

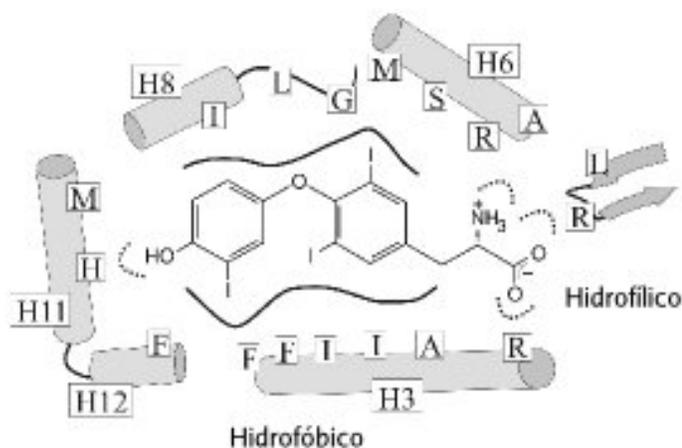
Como vimos no Capítulo 1, as estruturas do RAR com e sem ligante sugerem que o hormônio se associa ao receptor pela região da hélice 12. No entanto, outras estruturas foram obtidas, sem ligante, nas quais a H12 aparece fechada. Sabe-se que a remoção da hélice 12 aumenta as taxas de escape e associação dos ligantes, mas não está claro se estes mecanismos de associação ou dissociação têm relevância fisiológica [8].

O DBD se liga ao LBD através da hélice anterior à hélice 1 do LBD (em vermelho na Figura 2.4). Olhando a conformação desta hélice relativa ao LBD fica claro que há uma grande mobilidade na volta que conecta o LBD a esta hélice e, assim, ao DBD [22]. O fato da conexão do DBD com o LBD ser móvel sugere que os mecanismos de controle da transcrição devem passar por uma transmissão indireta do sinal da associação do ligante. Não se sabe ainda se a comunicação entre o LBD e o DBD é, de fato, importante, ou se a regulação da transcrição decorre unicamente da associação do LBD com os cofatores [53].

### A cavidade de ligação com os hormônios

Como vimos, os ligantes naturais dos receptores do hormônio tireoidiano são moléculas basicamente hidrofóbicas, mas possuem alguns grupos hidrofílicos em suas extre-

midades. Desta forma, a cavidade do LBD em que o ligante se associa têm essas mesmas propriedades. Uma representação esquemática da cavidade de ligação está na Figura 2.5.



**Figura 2.5.** Representação esquemática da cavidade de ligação dos receptores do hormônio tireoidiano. A cavidade é fundamentalmente hidrofóbica, mas há interações hidrofílicas importantes nas duas extremidades (à direita e à esquerda).

Os resíduos que fazem contatos diretos com o ligante, de acordo com a estrutura do TR $\beta$  ligado ao T3 pertencem às hélices 3, 6, 8, 11 e 12 e ao grampo- $\beta$  [7]. As hélices que têm o maior papel na formação desta cavidade são as hélices 3 (6 resíduos) e a hélice 6 (4 resíduos). As interações hidrofílicas ocorrem com uma arginina da hélice 3, uma da hélice 6, uma do grampo- $\beta$  (todas estas interagem com o carboxilato do hormônio) e com a histidina da hélice 11, que forma uma ligação de hidrogênio com o oxigênio fenólico da posição 4'. Todas as outras interações são hidrofóbicas. Desta forma, a primeira impressão é que as fortes interações eletrostáticas do carboxilato com as três argininas em uma extremidade do ligante devem ser dominantes para a afinidade e orientação do ligante no sítio ativo. Como mostraremos no Capítulo 4, no entanto, esta conclusão é falsa, pois as interações hidrofóbicas e a ligação de hidrogênio com a histidina são as interações fundamentais para a grande afinidade de ligação.

Todos estes resíduos que interagem diretamente com o ligante se conservam nas

isoformas  $\alpha$  e  $\beta$ . Mais ainda, também são conservados nos receptores do rato, da galinha e do sapo, mostrando que o modo de ligação ao T3 é muito específico e foi conservado ao longo de várias etapas evolutivas.

### 2.2.2 O desenvolvimento de ligantes seletivos

Como vimos, o desenvolvimento de ligantes seletivos em relação à isoforma TR $\beta$  pode ser bastante importante para o tratamento de diversas doenças. Do ponto de vista comercial, o grande desafio é o tratamento da obesidade com drogas que aumentem a taxa metabólica sem provocar danos nos tecidos cardíacos. Outras doenças, como o hipo- e o hipertireoidismo podem requerer ligantes com outras propriedades, como antagonistas específicos para uma das isoformas.

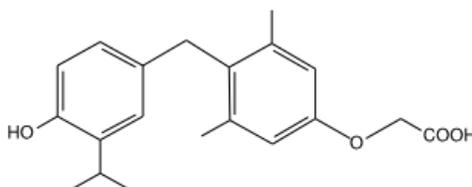
Os ligantes podem ser seletivos fisiologicamente por se ligar com maior afinidade a um dos LBDs, ou podem ser seletivos por serem distribuídos no organismo de forma heterogênea pelos mecanismos de transporte. Desde que as estruturas cristalográficas foram obtidas para os LBDs dos receptores, a primeira estratégia tem sido fortemente explorada. Porém, apesar de ter levado a ligantes muito promissores do ponto de vista clínico, o uso da informação estrutural para o desenvolvimento racional de novas moléculas ainda é incipiente [46, 52, 54]. Aqui descreveremos alguns ligantes sintéticos que têm sido estudados nos últimos anos e a forma como foram projetados.

#### O ligante GC-1

O ligante GC-1 foi desenvolvido por Grazia Chiellini (GC) no grupo de Thomas Scanlan [55]. O objetivo da síntese deste ligante foi o desenvolvimento de uma molécula similar ao T3, mas cuja síntese fosse mais simples. Foi o primeiro ligante desenvolvido com este propósito, razão pela qual é conhecido por GC-1. Sua estrutura é parecida com a do T3, mas o grupo amino é removido e um éter aparece na posição 1 do anél aromático, os iodos são substituídos por grupos alifáticos, e o éter do T3 é substituído por um grupo CH<sub>2</sub>, como mostra a Figura 2.6.

O GC-1 se revelou um modelo ideal para o estudo de ligantes com afinidades diferentes para os receptores TR $\alpha$  e TR $\beta$  [55–58]. Este ligante tem uma afinidade aproximadamente 10 vezes maior para receptor TR $\beta$ . Mais ainda, o ligante apre-

senta os efeitos esperados para um ligante  $\beta$ -seletivo em animais: ratos tratados com GC-1 apresentam redução de peso e de colesterol sem apresentar os conhecidos efeitos colaterais sobre os tecidos cardíacos [56, 59]. Recentemente, no entanto, foi demonstrado que o GC-1 promove proliferação celular no fígado e no pâncreas de ratos, o que é um efeito colateral indesejável [58]. Desta forma, o ligante GC-1 passou a ser um modelo para o estudo de ligantes  $\beta$ -seletivos, mas ainda há muitos desafios a serem superados para o desenvolvimento de drogas seguras para uso humano.

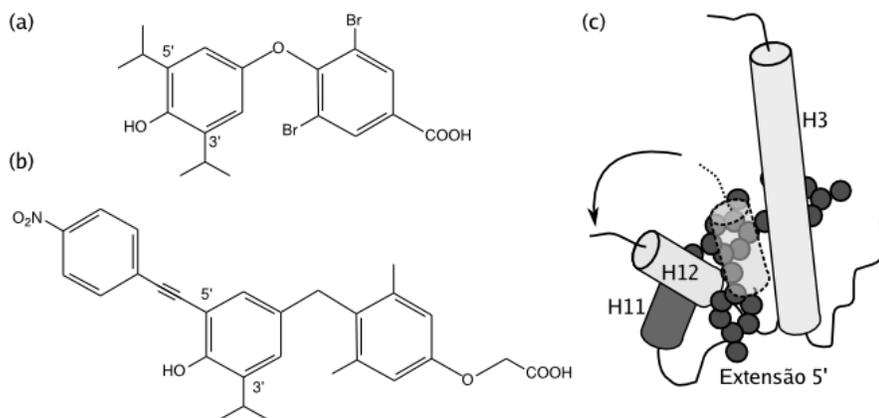


**Figura 2.6.** O ligante GC-1. Este ligante sintético é  $\beta$ -seletivo e é considerado um modelo para o desenvolvimento de ligantes farmacologicamente interessantes.

A seletividade deste ligante foi estudada, em seguida, do ponto de vista estrutural. Estruturas cristalográficas foram obtidas do GC-1 ligado à isoforma  $\alpha$  e estas foram comparadas com estruturas do ligante Triac associado a ambas as isoformas [52]. Apesar do título sugestivo do artigo: “Hormone Selectivity in Thyroid Hormone Receptors”, os resultados das análises estruturais foram insuficientes para uma determinação clara das razões da seletividade. Aparentemente, o ligante GC-1 participava de uma rede de ligações de hidrogênio envolvendo vários aminoácidos do sítio ativo, enquanto o Triac apresentava apenas uma única interação específica. Como veremos no Capítulo 5, mesmo a obtenção das estruturas do GC-1 ligado a ambas as isoformas permitiram apenas uma elucidação parcial das razões da seletividade. O fato de que estruturas de alta resolução são incapazes de fornecer uma explicação clara para a seletividade de um ligante mostra que a dinâmica dos receptores pode estar envolvida, ou ao menos deve haver fatores energéticos que não são evidentes [8].

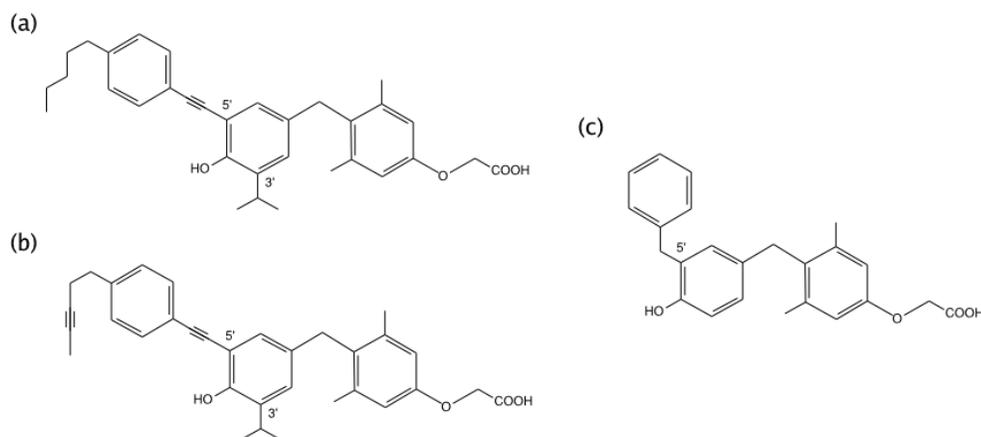
### Os ligantes substituídos na posição 5'

O conjunto de ligantes com substituintes na posição 5' é muito interessante do ponto de vista estrutural. A posição 5' no T3 é a posição no anel fenólico simétrica ao Iodo. A idéia por trás do desenvolvimento destes ligantes era que as interações hidrofílicas, supostamente as mais fortes e importantes para a afinidade dos ligantes, fossem conservadas, ao mesmo tempo que uma extensão na posição 5' seria capaz de induzir um enovelamento incorreto do receptor [54, 60]. Os ligantes com substituintes na posição 5' foram projetados, desta forma, para atuar como antagonistas. De fato, antagonistas foram desenvolvidos com esta estratégia, e acredita-se que atuam impedindo o enovelamento correto da hélice 12, inibindo a associação dos coativadores [46, 54]. As estruturas de dois antagonistas 5'-substituídos estão apresentadas na Figura 2.7, assim como uma representação esquemática da perturbação da posição da hélice 12 que impede a formação da superfície de associação de coativadores.



**Figura 2.7.** Antagonistas 5'-substituídos: (a) MIBRT, (b) NH-3 e (c) Suposto deslocamento da hélice 12 que impede a formação da superfície de associação com coativadores.

A importância da posição da hélice 12 para a formação da superfície de interação com cofatores já foi demonstrada. Várias estruturas de vários receptores associados a peptídeos contendo a superfície de interação dos cofatores foram obtidas [36, 53, 61]. Mais ainda, já foram obtidas estruturas dos receptores do estrogênio, e dos receptores ativados por proliferadores de peroxissomo, em que o deslocamento



**Figura 2.8.** Agonistas 5'-substituídos: (a) NH-2, (b) GC-17 e (c) GC-24.

da hélice 12 induzido pela associação de antagonistas fica claro [1, 17, 62]. O mecanismo de antagonismo resultante do posicionamento incorreto desta hélice está, portanto, bem justificado.

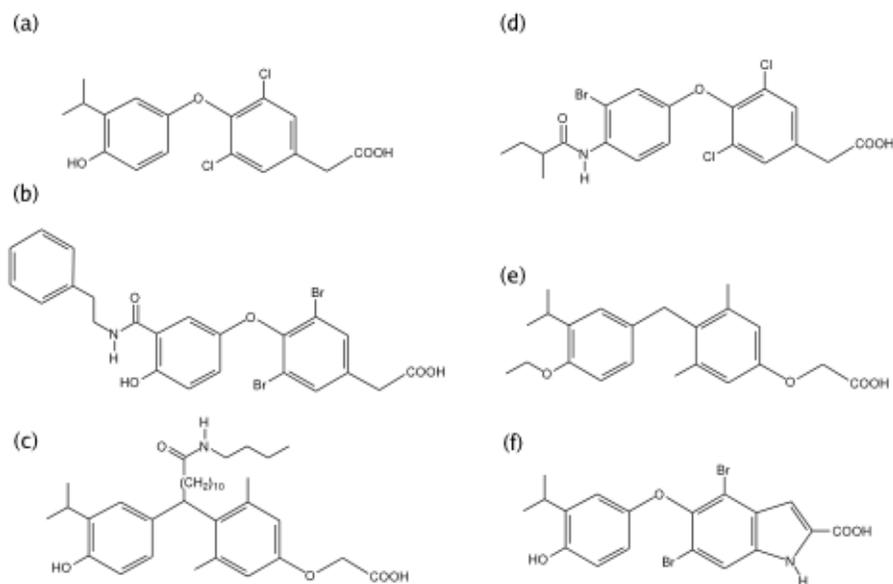
Não deixa de ser surpreendente, no entanto, que ligantes com extensões tão grandes como o NH-3 ainda sejam capazes de ligar-se ao LBD com grande afinidade. Por exemplo, o NH-3 possui uma constante de dissociação da isoforma  $\alpha$  de aproximadamente  $20 \times 10^{-9} \text{ Mol L}^{-1}$  [54]. A grande afinidade destes ligantes mostra que o LBD é bastante flexível. Além disso, os mecanismos de associação dos ligantes têm que ser compatíveis com o grande impedimento estérico que estas extensões introduzem para a entrada dos ligantes no LBD.

Ainda mais notável, no entanto, é que vários ligantes com grandes extensões na posição 5' atuam como **agonistas** [46, 63]. Isto quer dizer que, além de se ligarem com grande afinidade, não provocam mudanças estruturais importantes para a atividade dos receptores. Três destes ligantes estão representados na Figura 2.8. Como pode ser observado, as extensões na posição 5' são realmente grandes, e é notável que estes ligantes atuem como agonistas. Mais ainda, os mecanismos de associação envolvidos devem ser coerentes com a associação destas moléculas maiores. Do ponto de vista estrutural, foi demonstrado que a região C-terminal da hélice 11 e a hélice 12 são razoavelmente flexíveis, capazes de acomodar a fenila na posição 5' no ligante GC-24 sem perturbar a superfície de interação com os coativadores [64]. Este ligante é, ainda,  $\beta$ -seletivo, sendo uma nova promessa para

o desenvolvimento de moléculas com potencial farmacológico.

### 2.2.3 Outros ligantes e suas características gerais

Praticamente todos os ligantes sintéticos desenvolvidos até hoje são  $\beta$ -seletivos. Isto provavelmente se deve a que a isoforma  $\beta$  do LBD tem maior flexibilidade, sendo menor o custo energético da adaptação a novos ligantes do que para a isoforma  $\alpha$ . Outra característica comum de quase todos os ligantes é que o grupo amino da extremidade polar é removido, permanecendo apenas o carboxilato. A remoção da amina, curiosamente, aumenta a afinidade dos ligantes em ambas as isoformas [49, 65].



**Figura 2.9.** Ligantes desenvolvidos na *KaroBio*: (a) Agonista seletivo à isoforma TR $\beta$ , conhecido como KB-141. (b) Agonista com maior seletividade que o KB-141. (c) Antagonista “indireto”. (d) Agonista seletivo modificado na posição 4’. (e) Agonista desenhado para contrapor o efeito de uma mutação deletéria. (f) Agonista bicíclico na região hidrofílica.

A empresa *KaroBio* vem desenvolvendo sistematicamente ligantes diferentes com o objetivo de obter algum fármaco clinicamente viável [49, 60, 63, 66–68]. Seu trabalho inclui ainda cristalização dos receptores na presença de alguns destes

ligantes. Vários ligantes interessantes foram desenvolvidos que, além de terem propriedades interessantes do ponto de vista biológico, ainda contribuem para uma compreensão mais profunda da capacidade de adaptação das estruturas dos LBDs.

Alguns dos ligantes mais interessantes desenvolvidos pelo grupo da *KaroBio* estão representados na Figura 2.9. A molécula da Figura 2.9(a) é conhecida como KB-141 e foi a primeira da série de ligantes  $\beta$ -seletivos desenvolvidos pelo grupo. É semelhante ao Triac (Figura 2.2) no sentido de que possui um grupo acético no lugar do amino-ácido do T3. Os iodos foram substituídos por Cloro ou por um grupo isopropil. Estruturas cristalográficas das isoformas  $\alpha$  e  $\beta$  ligadas a este ligante não foram conclusivas em relação às razões da seletividade: novamente o que se observou foi um modo de ligação diferente, mas no qual os mesmos resíduos estavam envolvidos. Na verdade, o estudo da seletividade de vários ligantes baseados nas estruturas cristalográficas resultaram no mesmo tipo de informação: os modos de ligação são diferentes, mas os resíduos envolvidos são os mesmos. Há apenas um resíduo próximo do sítio de ligação que é diferente nas isoformas  $\alpha$  e  $\beta$ . Em nenhuma destas estruturas este resíduo interage diretamente com o ligante. Desta forma, apesar de que modos de ligação distintos são observados, e freqüentemente afirma-se que a razão estrutural da seletividade foi elucidada, na verdade não se sabe *por que* os modos de ligação são distintos. Os modos distintos de ligação deveriam decorrer, naturalmente, das diferenças estruturais entre os receptores  $\alpha$  e  $\beta$ .

O ligante da Figura 2.9(b) e o ligante GC-24 da Figura 2.8(c) têm características similares, baseadas nas extensões na posição 5'. Estes ligantes, como vimos, podem ser agonistas ou antagonistas, o que está provavelmente relacionado com a forma como afetam a superfície de associação dos cofatores. O ligante da Figura 2.9(b) apresenta maior  $\beta$ -seletividade que o ligante KB-141, mostrando que as extensões na posição 5' também contribuem com esta propriedade [60]. A  $\beta$ -seletividade nestes casos é explicada pelo fato de que esta isoforma tem um LBD aparentemente mais flexível (de acordo com os fatores de temperatura das estruturas cristalográficas) [7, 52, 69].

O ligante da Figura 2.9(c) é um antagonista. Na verdade, o mais impressionante deste ligante é o fato de se ligar com alta afinidade ao receptor. Note que o grupo localizado entre os dois anéis aromáticos possui uma cadeia de 10 carbo-

nos. Provavelmente este ligante não poderá ser usado clinicamente, uma vez que sua solubilidade em água deve ser baixa, mas o simples fato de que se ligue ao receptor com alta afinidade já implica em uma grande mobilidade do LBD. Seria muito interessante obter a estrutura cristalográfica do receptor associado a este ligante, mostrando como um grupo tão extenso pode ser acomodado. Este tipo de antagonista foi denominado “indireto” porque a extensão está posicionada de forma que não deve afetar diretamente a superfície de ligação com cofatores [63]. Provavelmente o antagonismo se dá por um rearranjo mais global da estrutura do receptor que, em última instância, inibe sua atividade.

Por sua vez, o ligante da Figura 2.9(d) é um agonista  $\beta$ -seletivo de alta afinidade. A diferença importante deste ligante consiste em que o fenol é substituído por uma amida. Esta modificação, como veremos mais adiante, é importante por envolver a única interação hidrofílica do ligante que não é influenciada pelo solvente. Este é o primeiro ligante cuja modificação visando a seletividade  $\beta$  se encontra no grupo fenólico [67, 70].

O ligante apresentado na Figura 2.9(e) foi desenvolvido por outro grupo [71]. Este ligante é semelhante ao GC-1, mas no lugar do grupo fenólico possui um éter etílico. O aspecto interessante deste ligante é que foi desenvolvido com o objetivo de compensar o efeito deletério de uma mutação humana. A mutação substituiu um resíduo de Histidina, que normalmente forma uma ligação de hidrogênio com o grupo fenólico (ver Figura 2.5), por uma Alanina. A Alanina possui uma cadeia lateral pequena e hidrofóbica. A idéia deste ligante foi substituir o hidrogênio do grupo fenólico por um grupo etila, de forma a induzir uma interação hidrofóbica entre este grupo e a metila da Alanina presente no receptor mutante. Uma ligação hidrofílica foi, portanto, substituída por uma interação hidrofóbica. Foi demonstrado que este ligante possui boa afinidade em relação a este receptor mutante, mas não em relação ao receptor nativo.

Por fim, o ligante da Figura 2.9(f) é um agonista de alta afinidade e seletividade em relação ao receptor  $TR\beta$ . É interessante por possuir uma região hidrofílica significativamente modificada pela inserção de um heterociclo de cinco carbonos [68]. Novamente, esta grande extensão, agora na outra extremidade, confere seletividade em relação à isoforma  $\beta$ . Novamente também, apesar de que boas estruturas cristalográficas foram obtidas para este receptor ligado a ambas as isoformas, e

---

modos de ligação claramente distintos foram observados, ainda restam dúvidas da razão estrutural para que estes modos de ligação sejam diferentes. Provavelmente a diferença também está relacionada à maior mobilidade do receptor TR $\beta$  na região do grampo  $\beta$ , que interage com a extremidade hidrofílica do ligante.



## Capítulo 3

# Simulações de dinâmica molecular

Suponha que você deseje conhecer como as moléculas de um determinado sistema químico se movem, com uma resolução espacial atômica, e com uma resolução temporal da ordem de femtosegundos. Suponha também que você queira saber quais são as energias de interação entre essas moléculas, quais são as correlações estruturais e dinâmicas, e como estas correlações afetam a atividade bioquímica, por exemplo, destas moléculas. Não existe técnica experimental capaz de fornecer informações dinâmicas com esse grau de completeza e precisão, apesar de que algumas técnicas modernas de espectroscopia e cristalografia resolvidas no tempo têm obtido resultados importantes e promissores.

A forma como este tipo de estudo pode ser feito, atualmente, é através de simulações computacionais dos movimentos moleculares. A realização de simulações implica, em primeiro lugar, no estabelecimento de um modelo do sistema molecular. O modelo deve fornecer informações suficientes para uma boa representação de cada molécula (ou seja, das interações intra-moleculares) e também das interações intermoleculares. Em princípio, se um bom modelo de todas as interações existentes em um sistema molecular está disponível, deve ser possível obter todo tipo de informação estrutural e dinâmica, com a resolução que se julgar necessária.

As simulações, portanto, requerem em primeiro lugar um modelo, que deve ser tão mais preciso quanto forem precisas as informações que esperamos obter a partir dele. Em segundo lugar, deve existir uma forma de obter a dinâmica das moléculas a partir de suas interações. Por fim, nem sempre os resultados que desejamos obter são acessíveis pelo estudo computacional da dinâmica convencional de um

sistema, e algumas técnicas novas de simulação (e de análise dos dados) devem ser desenvolvidas para que informações relevantes sobre os problemas abordados possam ser obtidas.

Neste capítulo, explicaremos brevemente como se constrói um modelo das interações intra e intermoleculares e como este modelo pode ser usado para obter informações da dinâmica de um sistema com resolução atômica. Em seguida, explicaremos em linhas gerais como foi feita a construção destes modelos para as moléculas que são estudadas neste trabalho. Por fim, descreveremos os algoritmos de integração numérica das equações de movimento, que são componentes essenciais das simulações.

### 3.1 A dinâmica molecular clássica

Um aspecto importante de todas as simulações feitas neste trabalho é que são simulações clássicas. Isto é, nenhum efeito quântico é considerado. Isto quer dizer que nas simulações que realizamos, nenhuma ligação química é rompida, não há interações entre orbitais e não há ressonância, por exemplo. À primeira vista isto pode parecer inadequado, já que sabe-se que inúmeros problemas relacionados à dinâmica, estrutura e reatividade das moléculas são fortemente influenciados por suas propriedades quânticas. Por outro lado, é importante colocar este fato de forma clara e imediata, exatamente para, em seguida, justificar como inúmeros resultados experimentais podem ser obtidos com modelos que não levam em conta explicitamente as propriedades quânticas da matéria.

#### 3.1.1 Do quântico ao clássico

Os potenciais utilizados nas simulações de dinâmica molecular são aproximações de potenciais quânticos. Em princípio, a dinâmica de uma partícula pode ser obtida pela resolução da equação de Schroedinger dependente do tempo,

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

que nos fornece as probabilidades de encontrar a partícula em qualquer posição no espaço  $\vec{x}$ , no instante  $t$ . Atualmente esta equação não pode ser resolvida de forma rápida para sistemas com milhares de átomos.

Quando os potenciais não são explicitamente dependentes do tempo, a equação de Schroedinger pode ser separada em sua parte dependente do tempo e em sua parte espacial. A função de onda pode ser escrita como

$$\Psi(\vec{x}, t) = \psi(\vec{x})f(t),$$

e parte independente do tempo da equação de Schroedinger toma a forma

$$\frac{-\hbar^2}{2m}\nabla^2\psi(\vec{x}) + V(\vec{x})\psi(\vec{x}) = E\psi(\vec{x}),$$

em que  $E$  é a energia associada a cada solução,  $\psi(\vec{x})$ , da equação.

Para um sistema formado por elétrons e núcleos, a equação de Schroedinger independente do tempo pode ser escrita de forma compacta por

$$\mathcal{H}\psi = E\psi,$$

sendo o operador hamiltoniano, em unidades atômicas, definido como

$$\mathcal{H} = -\sum_{i=1}^N \frac{1}{2}\nabla_i^2 - \sum_{A=1}^M \frac{1}{2M_A}\nabla_A^2 - \sum_{i=1}^N \sum_{A=1}^M \frac{Z_A}{r_{iA}} + \sum_{i=1}^N \sum_{j>i}^N \frac{1}{r_{ij}} + \sum_{A=1}^M \sum_{B>A}^M \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}}. \quad (3.1)$$

Nesta equação,  $N$  é o número de elétrons,  $M$  é o número de núcleos,  $Z_A$  é a carga do núcleo  $A$ ,  $r_{iA}$  a distância entre núcleos e elétrons,  $r_{ij}$  a distância entre elétrons,  $R_{AB}$  a distância entre núcleos, e  $M_A$  é a massa atômica dos núcleos [72].

Grande parte do custo computacional de um cálculo de dinâmica quântica decorre dos graus de liberdade eletrônicos. Felizmente, a função de onda dos elétrons pode ser desacoplada da função de onda dos núcleos, de acordo com a aproximação de Born-Oppenheimer. Os erros associados a esta aproximação são geralmente muito pequenos.

Na aproximação de Born-Oppenheimer, a função de onda é separada em sua parte nuclear e em sua parte eletrônica [72]. A função de onda dos elétrons é calculada assumindo núcleos pontuais. Por sua vez, os núcleos interagem com um potencial médio gerado pelos elétrons. Assim, o Hamiltoniano da equação 3.1 pode ser simplificado pela eliminação do termo associado à energia cinética dos núcleos (segundo termo), e da repulsão nuclear (último termo), que é constante para uma geometria fixa (a adição de uma constante não tem nenhum efeito sobre

as autofunções). Assim, podemos definir um Hamiltoniano puramente eletrônico,

$$\mathcal{H}_{ele} = - \sum_{i=1}^N \frac{1}{2} \nabla_i^2 - \sum_{i=1}^N \sum_{A=1}^M \frac{Z_A}{r_{iA}} + \sum_{i=1}^N \sum_{j>i}^N \frac{1}{r_{ij}},$$

associado à equação de Schroedinger para os elétrons,

$$\mathcal{H}_{ele}\psi_{ele} = E_{ele}\psi_{ele}. \quad (3.2)$$

Aliada às restrições decorrentes do princípio de exclusão de Pauli (a anti-simetria da função de onda), esta equação nos permite calcular uma superfície de energia potencial gerada pela presença dos elétrons para cada posição dos núcleos. Esta energia potencial e a repulsão eletrostática entre os núcleos compõem a energia potencial total do sistema.

Para os núcleos, a aproximação de Born-Oppenheimer define um novo Hamiltoniano. A componente associada à energia cinética dos núcleos é tratada explicitamente. A interação entre elétrons, e entre núcleos e elétrons, pode ser obtida da superfície de energia potencial dos elétrons, calculada pela equação 3.2. Por fim, a repulsão entre os núcleos é tratada explicitamente, levando ao Hamiltoniano

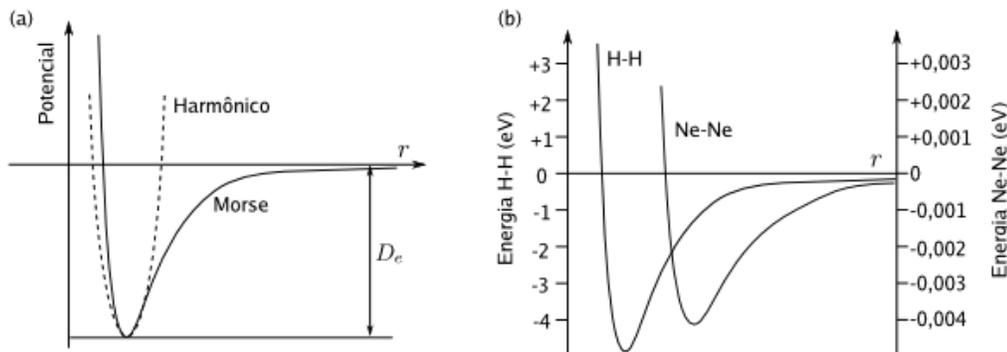
$$\mathcal{H}_{nuc} = - \sum_{A=1}^M \frac{1}{2M_A} \nabla_A^2 + \left\langle - \sum_{i=1}^N \frac{1}{2} \nabla_i^2 - \sum_{i=1}^N \sum_{A=1}^M \frac{Z_A}{r_{iA}} + \sum_{i=1}^N \sum_{j>i}^N \frac{1}{r_{ij}} \right\rangle + \sum_{A=1}^M \sum_{B>A}^M \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}}.$$

O segundo termo,  $\langle \mathcal{H}_{ele} \rangle$ , está associado à superfície de energia potencial gerada pelos elétrons assumindo núcleos estáticos e pontuais, de acordo com a equação 3.2. O potencial gerado pelos elétrons e a repulsão nuclear são constantes nesta equação. Assim, o Hamiltoniano pode ser escrito de forma simplificada por

$$\mathcal{H}_{nuc} = - \sum_{A=1}^M \frac{1}{2M_A} \nabla_A^2 + \mathcal{E}_{tot}, \quad (3.3)$$

em que  $\mathcal{E}_{tot}$  é a energia total associada à conformação dos núcleos, e pode ser usada como um potencial para o movimento nuclear.

$\mathcal{E}_{tot}$  pode ser obtida por um cálculo *ab-initio* ou semi-empírico tradicional. Dadas a superfície de energia potencial gerada pelos elétrons e as repulsões nucleares, as forças agindo sobre cada núcleo podem ser calculadas. Elas podem ser usadas para propagar as trajetórias dos núcleos em intervalos de tempo pequenos, nos



**Figura 3.1.** (a) O potencial de Morse é uma boa aproximação para a interação entre dois átomos. Próximo do mínimo, pode ser aproximado por um potencial harmônico. (b) Diferença de escala (mas não de aparência) nos potenciais de interação de dois átomos de hidrogênio e de dois átomos de neônio.

quais as posições dos núcleos variem pouco. Assim, a presença dos elétrons não é considerada de forma explícita na propagação da trajetória.

Evidentemente, estudar a dinâmica molecular de um sistema obtendo os potenciais através de cálculos de estrutura eletrônica é muito caro do ponto de vista computacional, mesmo usando a aproximação de Born-Oppenheimer.

No entanto, o termo  $\mathcal{E}_{tot}$  da equação 3.3 pode ser aproximado por potenciais clássicos analíticos, muito convenientes computacionalmente. O termo da repulsão nuclear consiste, simplesmente, em um potencial coulômbico. Já as superfícies de energia potencial geradas pelos elétrons são aproximadas usando diferentes funções, de acordo com o tipo de interação envolvida. Todas as interações intra- ou intermoleculares podem ser representadas por estas aproximações. Por exemplo, o potencial associado à distância entre os núcleos na molécula de hidrogênio pode ser aproximado por um potencial de Morse,

$$V(r) = D_e \left[ 1 - e^{-a(r-r_e)} \right]^2$$

em que  $r$  é a distância entre os núcleos,  $r_e$  é a distância de equilíbrio,  $D_e$  é o potencial mínimo, e  $a$  é um parâmetro associado à constante de força do potencial próximo do mínimo, como mostra a Figura 3.1(a). Interações dispersivas também podem, em princípio, ser aproximadas por potenciais de Morse. Por exemplo, a

Figura 3.1(b) mostra as curvas de energia potencial em função da distância entre os núcleos para a molécula de hidrogênio e para dois átomos de Neônio [73]. A forma das curvas de energia potencial é aproximadamente a mesma, mas há uma diferença grande na escala das energias envolvidas (ver escalas em ambos os lados do gráfico). O mínimo de energia da interação Ne-Ne é da ordem de -0,004 eV, enquanto que na molécula de hidrogênio a distância ótima corresponde a uma energia potencial de -5 eV.

Resumindo, a definição dos potenciais clássicos não é independente das propriedades quânticas das interações. Primeiro, a dinâmica dos núcleos é desacoplada da dinâmica dos elétrons de acordo com a aproximação de Born-Oppenheimer. Com isto, passa a fazer sentido propagar as trajetórias dos núcleos em uma superfície de energia potencial gerada pelos elétrons. Esta superfície poderia ser obtida por cálculos de estrutura eletrônica em todos os passos da trajetória. Na prática, estes cálculos podem ser feitos para grupos pequenos de partículas. Funções analíticas, como o potencial de Morse, são então ajustadas às curvas de energia potencial obtidas. Estas curvas são usadas para construir a superfície de energia potencial gerada pelos elétrons em sistemas mais complexos, mas sem a necessidade da realização de cálculos de estrutura eletrônica. A dinâmica dos núcleos é obtida pela propagação de suas trajetórias neste potencial aproximado. A propagação da trajetória dos núcleos poderia ser feita pela resolução da equação

$$\mathcal{H}_{nuc}\psi_{nuc} = i\hbar\frac{\partial\psi_{nuc}}{\partial t},$$

que fornece a dinâmica quântica dos núcleos na superfície de energia potencial gerada pelos elétrons. No entanto, isto nem sempre é necessário. O pacote de onda correspondente a cada núcleo,

$$\Psi_{nuc}(\vec{x}, t) = \sum_{i=1}^{\infty} C_i\psi_i(\vec{x})e^{-iE_it/\hbar},$$

possui contribuições importantes de várias autofunções de maior energia à temperatura ambiente. A combinação das várias autofunções que contribuem para o pacote de onda leva à sua localização, e seu comprimento de onda corresponde aproximadamente ao comprimento de onda térmico de de Broglie [74]. O comprimento de onda de de Broglie de um núcleo de carbono a 298K, por exemplo, é aproximadamente 0,3Å, enquanto que a distância mínima entre átomos na simulação é

maior que  $1\text{\AA}$ . Assim, os núcleos podem ser considerados partículas pontuais e suas trajetórias podem ser propagadas classicamente. Isto não é totalmente verdadeiro para partículas mais leves, como átomos de Hidrogênio, que têm um comprimento de onda térmico de de Broglie de aproximadamente  $1\text{\AA}$  à temperatura ambiente. De fato, várias propriedades que dependem fundamentalmente da dinâmica destes átomos precisam ser corrigidas quanticamente para que uma simulação produza resultados comparáveis com os experimentais [74].

Diversos tipos de potenciais analíticos podem ser usados para representar as interações entre partículas. Estes devem ser escolhidos para cada tipo de interação, procurando a melhor representação da curva de energia potencial verdadeira, de acordo com os recursos computacionais disponíveis e com o tipo de fenômeno observado. Estes potenciais analíticos poderiam ser usados para propagar a trajetória dos núcleos tanto quanticamente, de acordo com a equação de Schrodinger dependente do tempo, como classicamente, pelas equações de Newton. O cálculo das trajetórias usando mecânica clássica é, evidentemente, muito mais rápido. Para o estudo de propriedades dinâmicas de biomoléculas, à temperatura ambiente, isto não acarreta em uma perda importante de precisão.

### 3.1.2 Potenciais de interação para moléculas comuns

A energia térmica típica ( $\sim kT$ ) de um sistema à temperatura ambiente é da ordem de  $0,026\text{ eV}$ . Portanto, a energia da ligação H-H é muito maior do que  $kT$ , e a energia da ligação Ne-Ne é menor do que  $kT$ . A ligação H-H é, assim, estável à temperatura ambiente, enquanto que a ligação Ne-Ne não é. A ruptura de uma ligação H-H não é estatisticamente relevante em uma simulação de centenas de nano-segundos. Desta forma, não é necessário representar toda a curva de energia potencial da molécula por um potencial dissociativo, como o de Morse da Figura 3.1(a). A ligação H-H terá sempre uma distância próxima à que corresponde ao mínimo de energia. Nesta região, o potencial pode ser aproximado de forma conveniente por um potencial harmônico. Este é o caso de todas as ligações covalentes em moléculas comuns, em particular em biomoléculas, nas temperaturas e escalas de tempo que são geralmente estudadas por dinâmica molecular. O

potencial harmônio que representa estas ligações tem a forma

$$V_{cov}(i, j) = K(r - r_{eq})^2,$$

em que  $r$  é a distância entre os dois núcleos.  $K$  e  $r_{eq}$  são, respectivamente, a constante de força do oscilador harmônio e a distância de equilíbrio. Com isto apenas, podemos definir uma molécula de monóxido de carbono: dois átomos, com massas 12 e 16 (u. a.), interagindo através de um potencial harmônio que tem um  $r_{eq}$  correspondente à distância ótima da ligação C-O e uma constante de força  $K$ . A distância de equilíbrio e a constante de força podem ser obtidas, por exemplo, a partir de um espectro vibracional, ou usando cálculos de estrutura eletrônica.

Para reproduzir as propriedades do gás CO, no entanto, é necessário incluir interações intermoleculares. O modelo mais usado, e também um dos mais simples, para estas interações, inclui explicitamente apenas interações eletrostáticas e dispersivas.

A interação eletrostática é dada por um potencial coulômbico clássico atuando entre átomos de moléculas diferentes (em unidades atômicas),

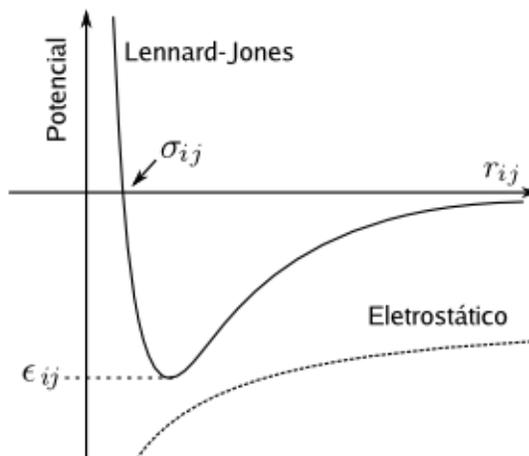
$$V_{elec}(i, j) = \frac{q_i q_j}{r_{ij}}$$

em que  $q_i$  e  $q_j$  são as cargas dos dois átomos e  $r_{ij}$  é a distância entre eles.<sup>1</sup> Na molécula de CO, o oxigênio possui uma densidade de carga negativa (por ser mais eletronegativo) e, portanto, terá uma carga negativa. O átomo de carbono terá uma carga positiva. Cada par de átomos de moléculas diferentes interage de acordo com um potencial eletrostático dado desta forma.

Como vimos, as interações dispersivas (como a interação Ne-Ne), têm energias menores, da ordem de  $kT$ . Assim, apesar de que o tipo de interação é semelhante à interação covalente, não podemos aproximar a curva de energia potencial por uma função harmônica. Nos campos de força que são usados para estudar proteínas, as interações dispersivas são representadas por potenciais de van der Waals (funções de Lennard-Jones),

$$V_{disp}(i, j) = 4\epsilon_{ij} \left[ \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right]$$

<sup>1</sup>No sistema internacional de unidades, que é usado nas simulações em geral, o potencial eletrostático é multiplicado por  $1/(4\pi\epsilon_0)$ .



**Figura 3.2.** Os potenciais de interação entre pares de átomos não-ligados covalentemente em uma simulação. O potencial de Lennard-Jones representa as interações dispersivas: possui um mínimo e é fortemente repulsivo em distâncias curtas, definindo o raio atômico. O potencial eletrostático depende das cargas dos átomos e consiste em um potencial coulômbico clássico.

que dependem da distância entre os átomos,  $r_{ij}$ , e de parâmetros que definem a forma do potencial. O potencial de Lennard-Jones se caracteriza por ser atrativo a longas distâncias, extremamente repulsivo a curtas distâncias e por possuir um mínimo. Os parâmetros  $\epsilon_{ij}$  e  $\sigma_{ij}$  determinam a forma deste potencial e, portanto, a posição do mínimo e a distância a partir da qual o potencial passa a ser atrativo, como mostra a Figura 3.2. As interações dispersivas de longa distância devem diminuir de acordo com  $r_{ij}^6$ , porque esta é a forma pela qual dipolos transientes interagem, em média, no tempo [73]. A repulsão de curto alcance seria melhor representada por uma exponencial, mas o termo  $r^{-12}$  é mais conveniente do ponto de vista computacional (por ser  $(r^6)^2$ ).

Os parâmetros  $\sigma_{ij}$  e  $\epsilon_{ij}$  correspondem aproximadamente à soma dos raios de van der Waals dos dois átomos envolvidos na interação e ao potencial associado à distância em que estes átomos interagem dispersivamente da forma mais efetiva. Na prática, parametriza-se um valor de  $\sigma$  e de  $\epsilon$  para cada tipo de átomo na simulação (por exemplo, para C e para O na simulação do monóxido de carbono). Todos parâmetros de interação entre pares são calculados pela combinação dos parâmetros

atômicos geométrica ou aritmeticamente, dependendo de como o campo de força foi parametrizado. No caso da simulação do CO teríamos, assim, os seguintes parâmetros, supondo uma combinação aritmética:

$$\sigma_{CC} = (\sigma_C + \sigma_C)/2, \quad \epsilon_{CC} = (\epsilon_C + \epsilon_C)/2$$

$$\sigma_{OO} = (\sigma_O + \sigma_O)/2, \quad \epsilon_{OO} = (\epsilon_O + \epsilon_O)/2$$

$$\sigma_{CO} = (\sigma_C + \sigma_O)/2, \quad \epsilon_{CO} = (\epsilon_C + \epsilon_O)/2.$$

No caso da simulação de CO, então, o conjunto de equações e parâmetros que definem as interações (também chamado de campo de força) conteria interações covalentes representadas por potenciais harmônicos, interações intermoleculares eletrostáticas, e interações de van der Waals. Seriam necessários apenas 8 parâmetros para definir todas estas interações (as cargas, raios atômicos e os  $\epsilon$ s para cada tipo de átomo, C e O, e os dois parâmetros da ligação covalente), independentemente do número de moléculas de CO no sistema.

Os potenciais eletrostático e dispersivo especificam *todas* as interações intermoleculares nestas simulações. Isto é, para todos os efeitos, como as interações dipolo-dipolo, interações de van der Waals, ou até mesmo efeitos quânticos, como as ligações de hidrogênio (e a conseqüente estrutura tetraédrica da água) ou o empacotamento  $\pi$  de anéis benzênicos, a parametrização adequada de potenciais com esta estrutura é suficiente.

As interações intramoleculares, por outro lado, podem possuir outros parâmetros. Se uma molécula é grande, átomos separados por mais de 4 ligações covalentes interagem como se fossem átomos não-ligados e, portanto, através de interações eletrostáticas e dispersivas como as descritas. No entanto, outros parâmetros devem ser incluídos para uma representação adequada das torções de ângulos e de ângulos de diedros. Estes potenciais também são tratados de forma clássica, usando potenciais harmônicos para os ângulos e potenciais periódicos para as rotações dos diedros:

$$V_{ang}(i, j, k) = K_{\theta}(\theta - \theta_{eq})^2$$

$$V_{die}(i, j, k, l) = K_{\psi}[1 + \cos(n\psi - \delta)].$$

$K_{\theta}$ ,  $\theta_{eq}$ ,  $K_{\psi}$  e  $\delta$  são parâmetros que são ajustados para melhor representar cada uma

das interações. Há ainda potenciais adicionais para algumas interações particulares, como a rotação de diedros impróprios (amidas, por exemplo).

### 3.1.3 A parametrização do campo de força

Um dos maiores desafios para a realização de simulações de dinâmica molecular é a parametrização dos campos de força. Para o caso do CO, citado acima, são necessários oito parâmetros, sendo que dois deles podem ser obtidos a partir de espectros vibracionais. As cargas podem ser obtidas a partir de cálculos de estrutura eletrônica. Os parâmetros de Lennard-Jones, no entanto, são mais difíceis de estimar. Nem sempre o ajuste de curvas de energia de potencial obtidas por cálculos de estrutura eletrônica de pequenos grupos de moléculas é satisfatório. A obtenção destes parâmetros pode passar, por exemplo, pela reprodução da curva de compressibilidade em função da pressão deste gás. Podem ser feitas simulações usando algum parâmetro estimado grosseiramente, e ajustar os parâmetros de van der Waals até que a curva de compressibilidade seja bem representada. Este é um processo trabalhoso mesmo para moléculas simples, e bastante mais trabalhoso no caso de moléculas complexas, como as proteínas. A reprodução de parâmetros experimentais é muito usada para a obtenção dos parâmetros de interação de líquidos ou gases simples. Usando esta metodologia, vários modelos para a água foram desenvolvidos, por exemplo.

No caso de moléculas como as proteínas a parametrização é ainda mais complexa. A quantidade de dados experimentais termodinâmicos disponíveis para proteínas é bastante limitada. Por esta razão, a parametrização de um campo de forças para proteínas geralmente envolve um trabalho sistemático que busca reproduzir dados energéticos obtidos a partir de cálculos *ab-initio*. Um exemplo típico deste trabalho pode ser a determinação dos parâmetros de Lennard-Jones para um resíduo de Glicina. Neste caso, pode-se, por exemplo, fazer cálculo *ab-initio* contendo uma molécula de glicina com algumas esferas de solvatação de água. Este sistema possui uma determinada energia total, que sai diretamente do cálculo. Em seguida, determina-se quais parâmetros de Lennard-Jones que fazem com que a energia do sistema, calculada agora a partir das interações clássicas, mais se pareça à energia *ab-initio*. Esta é uma das estratégias usadas para a

determinação dos parâmetros para aminoácidos. O mesmo é feito para alguns peptídeos. Dados experimentais são usados quando disponíveis, como por exemplo as frequências de estiramento das diversas ligações químicas dos aminoácidos. Torções freqüentemente são parametrizadas fazendo diversos cálculos *ab-initio* com diferentes ângulos de torção e, em seguida, ajustando o potencial periódico à curva de energia obtida.

Estratégias mistas que usam tanto dados experimentais como cálculos foram usadas para o desenvolvimento dos campos de força CHARMM, por exemplo. O campo de força OPLSAA, por outro lado, usa uma sistemática auto-consistente baseada apenas em cálculos quânticos. Qualquer destas metodologias busca encontrar um conjunto de parâmetros não muito grande, que seja extensível para o estudo de propriedades diferentes daquelas a partir das quais os parâmetros foram obtidos. Por exemplo, a parametrização dos campos de força para proteínas ou ácidos nucleicos são feitas usando cálculos e dados experimentais de peptídeos, mas espera-se que, no fim, os parâmetros dos aminoácidos possam ser usados para a simulação de proteínas em geral.

Evidentemente que a qualidade do campo de força depende da complexidade do sistema estudado. Desta forma, a precisão dos resultados obtidos usando um destes campos de força também depende desta complexidade. Por exemplo, é possível reproduzir quantitativamente grande parte das propriedades termodinâmicas da água (tanto propriedades dinâmicas como estruturais) usando os modelos que foram desenvolvidos. Por outro lado, não é possível esperar a reprodução de parâmetros quantitativos com a mesma precisão em simulações de proteínas. Talvez surpreendentemente, no entanto, muitos resultados quantitativamente corretos são obtidos mesmo para sistemas de grande complexidade, inclusive usando parâmetros ajustados de forma qualitativa. Na verdade, uma propriedade destes sistemas de grande complexidade é que grande parte da dinâmica é dominada por fatores coletivos, como o empacotamento das moléculas, e desta forma os erros associados aos detalhes das interações entre pares de átomos acabam sendo minimizados. Por exemplo, modelos de água que possuem apenas três sítios de carga (o oxigênio e os hidrogênios) são capazes de reproduzir a estrutura da água líquida [75]. Esta, por sua vez, deveria ser em grande parte influenciada pela presença dos elétrons não-compartilhados, já que deles depende a estrutura eletrônica tetraédrica ao redor

do átomo de oxigênio. No entanto, apenas o fato do ângulo entre as ligações ser aproximadamente  $107^\circ$  é suficiente para que, coletivamente, a estrutura da água seja tetraédrica. Note que duas moléculas de água isoladas, representadas por um modelo clássico de três sítios, *não* formarão uma ligação de hidrogênio com um ângulo correspondente ao mínimo de energia de um cálculo *ab-initio*.

### 3.1.4 Integrando as equações de movimento

Uma vez conhecendo como todas as partículas de um sistema interagem entre si, basta ter condições iniciais para poder prever a trajetória das partículas ao longo do tempo. Em simulações de dinâmica molecular, as condições iniciais consistem nas posições e velocidades de todas as partículas. Posições iniciais são obtidas, por exemplo, pela colocação das moléculas aleatoriamente em uma caixa. No caso de simulações de proteínas, as posições iniciais geralmente são obtidas a partir das estruturas cristalográficas. Outras formas mais sofisticadas podem ser usadas para obter posições para todos os átomos do sistema de forma adequada para cada tipo de problema [76]. Velocidades iniciais, por sua vez, são geralmente atribuídas de forma aleatória aos átomos do sistema de acordo com uma distribuição de Maxwell-Boltzmann para a temperatura desejada. Desta forma, a energia cinética do sistema corresponderá à temperatura termodinâmica.

Ou seja, ter condições iniciais para o sistema consiste em definir posições e velocidades iniciais para todos os átomos. Todas as componentes das interações interatômicas dependem apenas das posições dos átomos. Desta forma, dadas as posições de todos os átomos do sistema, as forças atuando sobre cada átomo podem ser calculadas. A força nada mais é do que a derivada do potencial,  $\vec{F} = -\nabla\vec{V}(t)$ . De acordo com a segunda lei de Newton, podemos calcular a aceleração de cada átomo,  $\vec{a}(t)$ , usando

$$-\nabla\vec{V}(t) = m\vec{a}(t)$$

sendo  $m$  a massa do átomo. O algoritmo mais simples para obter a evolução temporal do sistema consiste em calcular as velocidades no instante  $t + \Delta t$  por

$$\vec{v}(t + \Delta t) = \vec{v}(t) + \vec{a}(t)\Delta t \quad (3.4)$$

e, usando a equação

$$\vec{x}(t + \Delta t) = \vec{x}(t) + \vec{v}(t)\Delta t + \frac{\vec{a}(t)\Delta t^2}{2}, \quad (3.5)$$

obtem-se as posições no instante  $t + \Delta t$ . Dadas as posições neste novo instante, os potenciais são recalculados, definindo novas forças, novas acelerações e, assim, permitindo novamente o cálculo das posições em um instante posterior. A repetição deste ciclo leva à obtenção da trajetória de todas as partículas do sistema ao longo do tempo.

### O algoritmo Verlet

O algoritmo descrito acima possui todas as componentes fundamentais necessárias para a realização de uma simulação. No entanto, não é o algoritmo mais preciso. A equação 3.5 é expansão de Taylor de segunda ordem da posição no ponto  $\vec{x}(t)$ . Sendo assim, tem um erro associado da ordem de  $\Delta t^3$ . Já a equação 3.4 é a expansão de Taylor de primeira ordem da velocidade e, desta forma tem um erro associado da ordem de  $\Delta t^2$ . Para fazer com que o erro na velocidade fosse da ordem de  $\Delta t^3$ , pelo menos, seria necessário calcular a derivada da aceleração em relação ao tempo e computar o terceiro termo da expansão de Taylor na equação 3.4, o que não é desejável do ponto de vista da eficiência computacional. Outros algoritmos foram desenvolvidos que reduzem o erro no cálculo das velocidades sem introduzir custos computacionais importantes. Descreveremos agora o algoritmo Verlet e, em seguida, a algoritmo Verlet-velocidade, que é provavelmente o mais usado em simulações modernas.

A expansão de Taylor que dá a posição no instante  $t + \Delta t$  é

$$\vec{x}(t + \Delta t) = \vec{x}(t) + \frac{d\vec{x}(t)}{dt}\Delta t + \frac{1}{2}\frac{d^2\vec{x}}{dt^2}\Delta t^2 + \frac{1}{6}\frac{d^3\vec{x}}{dt^3}\Delta t^3 + O(\Delta t^4), \quad (3.6)$$

onde explicitamos os termos até terceira ordem. Façamos o mesmo para a o instante *anterior* ao momento atual, ou seja, para o instante  $t - \Delta t$ ,

$$\vec{x}(t - \Delta t) = \vec{x}(t) - \frac{d\vec{x}(t)}{dt}\Delta t + \frac{1}{2}\frac{d^2\vec{x}}{dt^2}\Delta t^2 - \frac{1}{6}\frac{d^3\vec{x}}{dt^3}\Delta t^3 + O(\Delta t^4). \quad (3.7)$$

Se somarmos as equações 3.6 e 3.7, temos

$$\vec{x}(t + \Delta t) = 2\vec{x}(t) + \frac{d^2\vec{x}}{dt^2}\Delta t^2 - \vec{x}(t - \Delta t) + O(\Delta t^4). \quad (3.8)$$

Os termos ímpares da expansão são naturalmente eliminados. Desta forma, é possível calcular a posição no instante  $t + \Delta t$  com um erro da ordem de  $\Delta t^4$  usando as posições dos dois últimos passos da simulação ( $t$  e  $t - \Delta t$ ). A velocidade poderia ser calculada, assim, pela equação

$$\vec{v}(t + \Delta t) = \frac{\vec{x}(t + \Delta t) - \vec{x}(t - \Delta t)}{2\Delta t}$$

que é uma aproximação linear da velocidade e, portanto possui um erro da ordem de  $\Delta t^2$ . Este erro na velocidade, duas ordens de magnitude maior que o erro nas posições, não é muito satisfatório, mas não se acumula porque a velocidade não é usada para propagar a trajetória. No entanto, é sempre necessário armazenar e atualizar dois vetores de posição [77]. Este algoritmo é conhecido como algoritmo Verlet.

### O algoritmo Verlet-velocidade

Um aprimoramento do algoritmo Verlet é o algoritmo Verlet-velocidade [77–79]. O algoritmo consiste no cálculo das posições usando uma expansão de Taylor de segunda ordem, como a da equação 3.5. Já a velocidade no instante  $t + \Delta t$  é obtida pela velocidade no instante  $t$  e pela média das acelerações nos instantes  $t$  e  $t + \Delta t$ , por

$$\vec{v}(t + \Delta t) = \vec{v}(t) + \frac{\vec{a}(t)\Delta t}{2} + \frac{\vec{a}(t + \Delta t)\Delta t}{2}. \quad (3.9)$$

A formulação acima sugere que é necessário armazenar as acelerações nos instantes  $t$  e  $t + \Delta t$ . Para que apenas um vetor de velocidades seja armazenado por passo de simulação, o algoritmo é implementado da seguinte forma: Em primeiro lugar, calculam-se as forças no instante  $t$ , de forma que as acelerações são determinadas. Em seguida, calculam-se as velocidades no instante  $t + \Delta t/2$ , usando

$$\vec{v}(t + \Delta t/2) = \vec{v}(t) + \frac{\Delta t}{2}\vec{a}(t). \quad (3.10)$$

A velocidade neste instante intermediário é usada para o cálculo das posições no instante  $t + \Delta t$ ,

$$\vec{x}(t + \Delta t) = \vec{x}(t) + \vec{v}(t + \Delta t/2)\Delta t,$$

e as forças são recalculadas para o instante  $t + \Delta t$  a partir destas novas posições. Com as novas forças, as velocidades no instante  $t + \Delta t$  são calculadas usando

$$\vec{v}(t + \Delta t) = \vec{v}(t + \Delta t/2) + \frac{\Delta t}{2} \vec{a}(t + \Delta t),$$

completando o ciclo.

As trajetórias geradas por este algoritmo possuem a mesma precisão do algoritmo Verlet, com erros da ordem de  $\Delta t^4$ . Note que, de acordo com a equação 3.5, as posições no instante  $t$  são dadas por

$$\vec{x}(t) = \vec{x}(t - \Delta t) + \vec{v}(t - \Delta t)\Delta t + \frac{\vec{a}(t - \Delta t)\Delta t^2}{2}.$$

Subtraindo este  $\vec{x}(t)$  do  $\vec{x}(t + \Delta t)$  calculado pela equação 3.5, temos

$$\vec{x}(t + \Delta t) = 2\vec{x}(t) - \vec{x}(t - \Delta t) + [\vec{v}(t) - \vec{v}(t - \Delta t)]\Delta t + [\vec{a}(t) - \vec{a}(t - \Delta t)]\frac{\Delta t^2}{2}.$$

Substituindo na equação acima a relação entre as velocidades nos instantes  $t$  e  $t - \Delta t$  dada pela equação 3.10,

$$\vec{v}(t) - \vec{v}(t - \Delta t) = \frac{1}{2}[\vec{a}(t) + \vec{a}(t - \Delta t)]$$

obtemos exatamente a propagação da posição de acordo com a equação 3.8. Ou seja, a propagação das posições no algoritmo Verlet-velocidade é equivalente à propagação das posições no algoritmo Verlet. As velocidades, no entanto, são calculadas com uma precisão maior, e menos vetores têm que ser armazenados. O algoritmo Verlet-velocidade é o algoritmo mais usado nas simulações atuais, e é o algoritmo implementado no programa NAMD [80], que foi usado ao longo deste trabalho.

## Capítulo 4

# Estudo dos mecanismos de dissociação de ligantes do LBD

As estruturas cristalográficas dos LBDs dos receptores nucleares são compactas e, geralmente, englobam totalmente o ligante. Desta forma, permitem apenas uma apreciação superficial de possíveis mecanismos dinâmicos importantes para a função dos receptores. A forma como os ligantes entram e saem da estrutura deve estar relacionada com mecanismos funcionais. O trabalho apresentado neste capítulo está parcialmente descrito na minha dissertação de mestrado [81], mas os resultados apresentados aqui estendem significativamente o trabalho anterior.

Os estudos da dissociação de ligantes do receptor foi feito com técnicas não-convencionais de simulação. A primeira, conhecida como Dinâmica Molecular com Amostragem Ampliada (DMAA) [41, 82], permite a obtenção de uma visão global dos caminhos de dissociação, mas não é adequada para uma descrição detalhada dos mecanismos. A segunda técnica, conhecida como Dinâmica Molecular com Caminho Induzido (DMCI) [44, 83], requer um conhecimento básico da dissociação, mas permite seu estudo detalhado, e sugere a importância relativa de diferentes mecanismos. Ambas técnicas tinham sido utilizadas para o estudo da dissociação do Ácido Retinóico do receptor RAR de forma independente [41, 44]. Neste trabalho, propomos a combinação destas metodologias, e estudamos a dissociação de vários ligantes naturais e sintéticos dos receptores do hormônio tireoidiano.

### 4.1 Mecanismos de dissociação em receptores nucleares

Os ligantes estão geralmente imersos totalmente na estrutura dos LBDs dos receptores nucleares. Desta forma, rearranjos estruturais significativos são necessários

para permitir sua entrada e saída. Há evidências, para o PPAR, que a região do receptor próxima do ligante torna-se desordenada na ausência de ligante, e estas variações estruturais podem estar relacionadas com os mecanismos de associação e dissociação [28, 45, 84, 85]. A natureza molecular destas variações estruturais, no entanto, não é bem conhecida.

A análise das estruturas cristalográficas sugere alguns possíveis mecanismos de associação ou dissociação. A estrutura do RAR sem ligante e as estruturas de vários receptores ligados a agonistas e antagonistas sugerem que o ligante afeta de forma importante a posição da hélice 12 em relação ao corpo do LBD [54, 86]. Antes de que outros dados funcionais e novas estruturas de receptores sem ligante fossem obtidas, estes dados foram interpretados como uma evidência de que o mecanismo de entrada e saída dos ligantes deveria envolver a abertura da H12 com a conseqüente exposição do sítio de ligação [23, 35, 41]. O posicionamento correto desta hélice é necessário para a associação de cofatores, mas seu papel nos mecanismos de associação e dissociação dos ligantes não é claro. Em geral, fatores que estabilizam a H12 reduzem as taxas de dissociação de ligantes, e fatores que a desestabilizam facilitam a dissociação [28, 39, 45, 62, 84]. O estudo dos fatores de temperatura nas estruturas cristalográficas sugere outras possibilidades: nas estruturas dos TRs, por exemplo, a região do loop entre as hélices H1 e H3 é muito móvel, incluindo o grampo- $\beta$  [7, 31, 36, 48, 52]. Além disso, o estudo das superfícies dos receptores RAR e das formas *apo* e *holo* do PPAR mostram cavidades nesta região [1, 23], sugerindo de forma conjunta que este pode ser um mecanismo de entrada e saída dos ligantes.

Existem três estudos a respeito da dissociação de ligantes dos receptores nucleares além dos aqui apresentados. Todos tratam da dissociação do ácido retinóico do seu receptor. Dois deles foram publicados de forma independente e usam as técnicas que serão usadas neste trabalho de forma combinada [41, 44]. O terceiro estudo é posterior ao trabalho aqui apresentado, e usa uma terceira técnica de simulação [42]. Várias técnicas diferentes são usadas porque o estudo dos mecanismos de dissociação por simulações de dinâmica molecular não pode ser feito usando simulações convencionais. O tempo de vida dos ligantes no interior dos receptores é da ordem de vários minutos [87], muitas ordens de magnitude maior do que qualquer simulação já feita. Isto não significa necessariamente que o evento

da dissociação é tão demorado, mas indica que, se é rápido, ocorre com uma probabilidade muito baixa. De qualquer forma, uma simulação convencional, que pode atingir, hoje, no máximo centenas de nano-segundos, não será capaz de observar um único evento de dissociação.

## 4.2 Metodologia

Foram usadas duas técnicas distintas e complementares para o estudo da dissociação dos ligantes. As técnicas usadas e outros detalhes metodológicos serão descritos a seguir.

### 4.2.1 Dinâmica Molecular com Amostragem Ampliada

A técnica de DMAA consiste em uma aproximação dos potenciais que objetiva a aceleração de processos que estão sujeitos a barreiras de potencial proibitivas do ponto de vista das simulações computacionais. No caso da dissociação de um ligante de seu receptor [41, 82, 88], a aproximação é feita da seguinte forma: vários ligantes idênticos, em posições iniciais também idênticas, são colocados no sítio de ligação da proteína. Os ligantes ficam sobrepostos na condição inicial, que deve corresponder, por exemplo, à posição do ligante na estrutura cristalográfica. Os ligantes não interagem entre si, de forma que a sobreposição de seus átomos não introduz instabilidades no cálculo das interações.

A proteína é representada da forma convencional. No entanto, sua interação com os ligantes é escalonada de acordo com o número de cópias do ligante. Isto é, se forem colocadas 15 cópias do ligante no sítio ativo, os potenciais de interação do ligante com a proteína serão divididos por 15. Desta forma, no instante inicial da simulação, no qual todos os ligantes têm posições idênticas, a proteína interage com este conjunto de ligantes da mesma forma que interagiria se houvesse apenas um ligante com potenciais completos. Os ligantes, por sua vez, interagem com uma proteína “suavizada”, com potenciais menores.

No início da simulação as velocidades iniciais são atribuídas aos ligantes de maneira aleatória (de acordo com a temperatura desejada). Desta forma, à medida que a simulação prossegue, as posições dos ligantes divergem. Como há vários ligantes, a probabilidade de que um deles se dissocie da proteína aumenta. No en-

tanto, o fator mais importante é que os ligantes interagem com a proteína apenas com uma fração do potencial  $e$ , desta forma, as barreiras de potencial associadas à dissociação são reduzidas. A redução de uma barreira de potencial aumenta exponencialmente as taxas de escape. Portanto, a probabilidade aumenta suficientemente para que estes eventos sejam observados em um tempo acessível à simulação computacional.

Na prática, a técnica tem limitações. A dissociação ocorre quando a proteína sofre alguma flutuação estrutural suficientemente grande que permite a passagem do ligante. No entanto, quando esta cavidade se abre, geralmente observa-se uma saída de todos os ligantes, devido às interações muito reduzidas destes com a proteína. Desta forma, um dos objetivos da técnica, que era observar vários mecanismos de dissociação em uma única simulação, acaba sendo frustrado. Várias simulações devem ser realizadas partindo de condições iniciais distintas para amostrar diferentes flutuações na estrutura da proteína. Ainda mais, como as interações dos ligantes com a estrutura protéica estão sujeitas a fortes aproximações, os detalhes das interações durante o processo de dissociação não são significativos. Não é adequado esperar que uma descrição detalhada dos mecanismos seja obtida.

É importante notar que estas limitações são particularmente relevantes em sistemas em que o tamanho do ligante e sua dinâmica não podem ser desprezados do ponto de vista da dinâmica da proteína. Por exemplo, no estudo da dissociação de um ligante menor, de dinâmica muito mais rápida, como o monóxido de carbono (na mioglobina), a técnica é capaz de fornecer inclusive taxas de dissociação [82, 89–91]. Isto se deve a que a dinâmica da proteína está desacoplada da dinâmica do ligante [82]. Nestes casos, modificações podem ser feitas na técnica que permitem que a cinética da dissociação seja respeitada na simulação [92], mas isso evidentemente não é interessante no estudo da dissociação dos ligantes de receptores nucleares [88].

A técnica DMAA, como descrita acima, foi implementada no programa Tinker [93] com a colaboração de Milton T. Sonoda. Todas as simulações foram feitas usando essa implementação.

### 4.2.2 Dinâmica Molecular com Caminho Induzido

A técnica de DMCI, por sua vez, consiste basicamente na aplicação de uma força externa a algum átomo na simulação, que induz uma dinâmica distinta da dinâmica convencional do sistema. A força é aplicada de forma a induzir um determinado mecanismo de interesse cujas características principais devem ser previamente conhecidas e assumidas pelo pesquisador [44, 81, 83].

No caso das simulações de dissociação de um ligante de seu receptor, a aplicação é evidente: uma vez que o aspecto geral da dissociação seja conhecido, define-se uma direção pela qual o ligante deve ser removido do LBD. O ligante é então induzido a se dissociar pelo caminho desejado pela aplicação da força externa. Apesar de que algumas características do caminho devem ser conhecidas, os detalhes não são necessários, porque as interações que o ligante faz com o ambiente também influenciam sua trajetória. Diferentemente da técnica DMAA, neste caso não é feita nenhuma aproximação sobre os potenciais. Os detalhes da dissociação e a importância relativa dos caminhos podem ser estudados.

A força externa é aplicada na técnica DMCI segundo

$$\vec{F}_{ext}(t) = k(\vec{v}t - \Delta\vec{x}) \quad (4.1)$$

em que  $k$  é uma constante de força,  $\vec{v}$  é o vetor velocidade da força, e  $\Delta\vec{x}$  é o deslocamento do sítio sendo puxado em relação à sua posição inicial. A direção em que esta força é aplicada é definida pelo vetor  $\vec{v}$ . O módulo deste vetor, assim como a constante de força  $k$ , são parâmetros que podem ser ajustados para que a dissociação ocorra em um tempo de simulação adequado às possibilidades do pesquisador. Quanto menor  $|\vec{v}|$ , mais lentamente a força vai atuar, e mais lenta será a dissociação. Neste caso, o ambiente em torno do sítio induzido tem mais tempo para se acomodar à passagem do ligante. A constante  $k$ , por sua vez, deve ser escolhida de forma que um pequeno deslocamento do sítio puxado, i. e. 1 ou 2Å, provoque uma redução perceptível da força.

A força possui a interessante propriedade de estar, a todo instante, sendo modulada pela resistência que o meio exerce ao movimento do sítio sendo puxado. Isto ocorre porque, se o deslocamento do sítio é brusco, o termo  $\Delta\vec{x}$  aumenta rapidamente, fazendo com que a força diminua. Por outro lado, se o sítio não se move, a componente  $\vec{v}t$  garante que a força vai aumentar até que a resistência do meio

ao movimento seja vencida (a resistência está geralmente associada às interações intermoleculares). O perfil da força em função do tempo de simulação permite encontrar correlações bastante claras entre instantes de grande resistência (maior força) e as interações do ligante com o meio. As interações que impedem a dissociação podem ser identificadas, e estão correlacionadas com a importância do mecanismo estudado.

### 4.2.3 Condições de simulação

No estudo dos mecanismos de dissociação usando DMAA o campo de força OPLSAA [94–96] foi utilizado. Os parâmetros para os átomos das proteínas foram diretamente obtidos do campo de força, e os parâmetros de van der Waals e potenciais intra-moleculares para os ligantes foram obtidos por analogia dentro do conjunto OPLSAA. As cargas dos ligantes T3 e Triac foram obtidas a partir de cálculos *ab-initio* usando o nível de teoria MP2/Lanl2DZ. Esta base teve de ser usada devido à presença de átomos de Iodo na estrutura. A presença do Iodo também fez com que cargas de Mulliken tivessem de ser usadas, uma vez que não há parâmetros ChelpG ou Merz-Kollman para estes átomos. As cargas dos outros ligantes foram obtidas a partir de cálculos Hartree-Fock com base 6-31G(d,p), e as cargas Merz-Kollman foram utilizadas, de acordo com os protocolos de parametrização descritos em [94]. Todos os cálculos *ab-initio* foram feitos com o programa Gaussian98 [97]. O campo de força utilizado e a implementação dos métodos foi testada pela realização das simulações de dissociação do ácido retinóico de seu receptor [81, 98], que reproduziram os resultados publicados em [41]. Os parâmetros usados nesta etapa do trabalho estão descritos na minha dissertação de mestrado [81]. Todas as simulações de DMAA foram feitas com o programa Tinker [93]. Foram feitas simulações usando diferentes números de cópias do ligante para a dissociação do T3, e usando diferentes condições iniciais (velocidades iniciais diferentes). Para os outros ligantes foram feitas simulações com 50 cópias do ligante. As simulações têm aproximadamente 150 ps, e foram realizadas com um passo de tempo de 2 fs. No total foram realizadas 69 simulações independentes.

Nas simulações com DMCI foram usados parâmetros CHARMM [99], para melhor compatibilidade com o programa NAMD [80]. Desta forma, a escolha dos

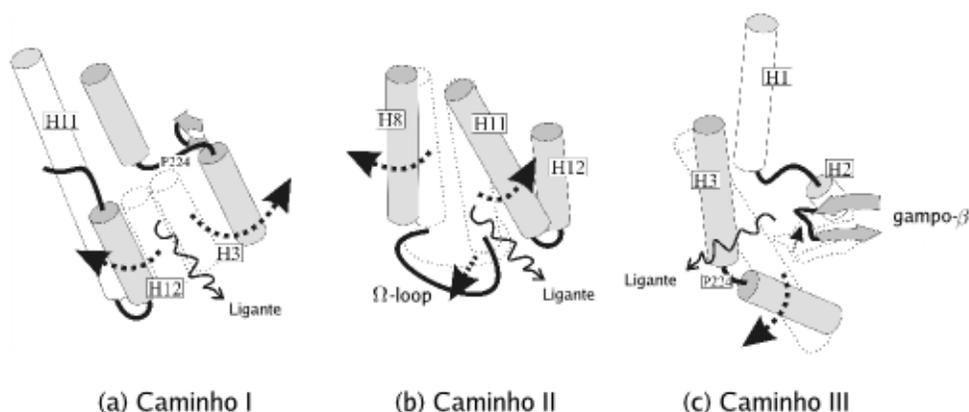
parâmetros de van der Waals e cargas foi refeita a partir do campo de força CHARMM. Foram usadas as mesmas cargas utilizadas no estudo anterior [70]. Todos os parâmetros utilizados estão descritos nos trabalhos [88] e [70].

Como neste caso não há aproximação sobre os potenciais de interação, foi necessário um ambiente mais realista para a proteína. Desta forma, os LBDs foram solvatados por uma camada no mínimo 15Å de água, e foram adicionados íons de forma a tornar o sistema neutro (um contra-íon para cada aminoácido carregado da proteína foi adicionado). Os sistemas foram construídos com o programa Packmol [76], sua energia foi minimizada usando gradientes conjugados mantendo, no entanto, os átomos da proteína fixos. Em seguida, três simulações de 100 ps foram realizadas, nas quais a temperatura foi reescalada a cada 1 ps para equilibrar o sistema a 300K. Na primeira etapa de termalização todos os átomos da proteína foram mantidos fixos. Na segunda etapa apenas os carbonos- $\alpha$  foram mantidos fixos e, finalmente, na terceira etapa nenhuma restrição foi adicionada ao sistema. Algumas partes das proteínas tiveram de ser modeladas, em particular o  $\Omega$ -loop nas estruturas do TR $\beta$ . Esta modelagem foi feita gerando-se uma série de estruturas (em torno de 1000) da região modelada e escolhendo aquela que ao ser adicionada à estrutura do LBD tinha a menor energia. Nas etapas de minimização e termalização as regiões modeladas não foram mantidas fixas. As simulações foram feitas usando o programa NAMD [80]. A força foi aplicada com uma velocidade de 0,032Å/ps e a constante de força utilizada foi 4,00 kcal mol<sup>-1</sup> Å<sup>2</sup>, de acordo com o estudo [44].

As estruturas cristalográficas utilizadas foram: a estrutura do T3 ligado ao TR $\alpha$  obtida do site do Prof. Robert Fletterick [7, 100], refinada até de 2,0Å de resolução. As estruturas das isoformas  $\alpha$  e  $\beta$  ligadas ao IH5 (KB-141) e do TR $\beta$  ligado ao GC-24 foram obtidas do Protein Data Bank e têm códigos e resoluções: TR $\alpha$ -IH5: 1NAV, 2,5Å; TR $\beta$ -IH5: 1NAX, 2,7Å [49]; TR $\beta$ -GC24: 1Q4X, 2,8Å [64]. As estruturas do GC-1 e do Triac ligado a ambas as isoformas foram obtidas no grupo do Prof. Polikarpov [69]. Estas estruturas foram refinadas até resoluções de 1,85Å (TR $\alpha$ -GC1), 2,1Å (TR $\beta$ -GC1), 2,4Å (TR $\alpha$ -Triac) e 2,6Å (TR $\beta$ -Triac). As forças foram aplicadas nas direções indicadas pelas simulações realizadas com DMAA. Maiores detalhes podem ser encontrados em [70, 81]. No total, foram realizadas 35 simulações independentes, de 1 ns cada uma.

### 4.3 Caminhos obtidos usando DMAA

Foram realizadas simulações com velocidades iniciais distintas para a dissociação do T3 dos LBDs da isoforma  $\alpha$  com um número de ligantes variando de 10 a 50. A dissociação dos ligantes foi observada com frequência e envolveu regiões do LBD relacionadas com a ligação do T3. Três caminhos de dissociação foram observados. Uma representação esquemática de cada um destes caminhos está feita na Figura 4.1. Nenhuma dissociação foi observada nas simulações com menos de 13 cópias do ligante.



**Figura 4.1.** Caminhos de dissociação encontrados usando a técnica DMAA. Três caminhos foram encontrados. O Caminho I se assemelha ao mecanismo raoteira. Os caminhos II e III são novos e não contradizem a associação de cofatores.

Os ligantes sofreram dissociação através de I) uma abertura entre as hélices 3 e 11, associada ao deslocamento da hélice 12. II) Entre as hélices 8 e 11, com a abertura do  $\Omega$ -loop. III) Por uma cavidade formada pela movimentação do grampo- $\beta$ , do loop entre as hélices 1 e 2 e da hélice 3. O Caminho I se assemelha ao caminho ratoeira, observado em simulações semelhantes para o receptor do ácido retinóico [41] e discutido no Capítulo 1. O Caminho II não tinha sido sugerido por nenhum estudo anterior, mas envolve o  $\Omega$ -loop, que é uma região de grande mobilidade, particularmente nas estruturas da isoforma  $\beta$ . O Caminho III, por sua vez, tinha sido sugerido a partir da observação das estruturas cristalográficas e dos fatores de temperatura [7], e também pela análise da estrutura do RXR [44], mas não tinha

vido observado espontaneamente em nenhum estudo.

O Caminho I foi observado em 14 das 33 simulações da dissociação do T3. O Caminho II foi observado com menor frequência, em apenas 6 das 33 simulações. Por fim, o Caminho III foi observado em 10 das 33 simulações, como mostra a Tabela 4.1.

Número de cópias	Caminhos encontrados					
13	II	—*	I			
14	III	II	III			
15	I	I	I			
16	I	I	—*			
17	I	III	I			
18	II	III	III			
19	—*	II	I			
20	III	II	I			
25	III	I	III			
50	I	I	III	I	II <sup>a</sup>	III

\*Não foi observada dissociação.  
<sup>a</sup>Três cópias saíram pelo caminho I

**Tabela 4.1.** Caminhos encontrados em cada uma das simulações da dissociação do T3 usando DMAA

### Dissociação ao longo do Caminho I

O Caminho I envolve o deslocamento da hélice 12. A diferença entre estas simulações e as simulações da dissociação do ácido retinóico descritas em [41] consiste na ruptura da hélice 3 nos TRs, enquanto que esta hélice permanece estendida no RAR. A região N-terminal da hélice 3 se afasta das hélices 11 e 12 aumentando a cavidade pela qual os ligantes se dissociam.

Os rearranjos na estrutura protéica que levam ao escape do ligante envolvem regiões relacionadas com o empacotamento do primeiro anel aromático da estrutura do T3. Em primeiro lugar, a H12 e o loop entre as hélices 11 e 12 se afastam da H3. Este movimento é seguido pelo rearranjo simultâneo nas hélices 3 e 12: A

H12 passa por um processo de desnaturação entre os resíduos Leu400 e Phe405, de acordo com a numeração dos resíduos da isoforma  $\alpha$  (ver Figura 2.3 e [81]). A Phe405 se encontra na região interna da hélice 12 e forma contatos diretos com o ligante [7]. A H3 se rompe em duas hélices, que são preservadas no decorrer da simulação. A ruptura ocorre na região que contém o resíduo Pro224. A região inferior da hélice 3 se move para longe da H12, abrindo a cavidade no LBD. O T3 passa pela cavidade formada entre a H3 e o loop entre as hélices 11 e 12.

### Dissociação ao longo do Caminho II

As características principais do Caminho II consistem na separação das hélices 8 e 11 e na concomitante separação do  $\Omega$ -loop do corpo da proteína. Os  $\Omega$ -loops freqüentemente estão relacionados com o controle da entrada e saída de substratos em catálise enzimática [101].

As regiões do LBD que se rearranjam para permitir a saída do ligante participam de interações hidrofóbicas com o ligante, com exceção da interação com a His381 (numeração do TR $\alpha$ ) que pertence à H11, e forma uma ligação de hidrogênio com o fenol do T3. A dinâmica da dissociação ocorre da seguinte forma: a H11 sofre uma desnaturação local nos resíduos Gly378 e Ala379. A integridade da H8 é preservada, mas os resíduos entre a Val295 e a Ala308 se afastam da H11 à medida que os ligantes se movem entre as hélices. O  $\Omega$ -loop se inclina juntamente com a H8 separando-se da H11. Contatos hidrofílicos mantêm uma interação forte entre a H8 e o  $\Omega$ -loop, levando a um deslocamento destes dois elementos para longe da H11, simultaneamente [81, 88].

### Dissociação ao longo do Caminho III

O Caminho III envolve regiões da proteína que já tinham sido identificadas como possíveis portas de entrada para os ligantes [7]. O ligante sai do receptor pela abertura formada entre a H3, o grampo- $\beta$  e o loop entre as hélices 1 e 2. As regiões do grampo- $\beta$  e o do loop entre a H1 e a H2 apresentam grande mobilidade, de acordo com os fatores de temperatura das estruturas cristalográficas [7, 52, 69].

### Dissociação de outros ligantes

Para testar a generalidade dos caminhos observados, foram feitas simulações complementares da dissociação de outros ligantes e de outras isoformas para os quais estruturas cristalográficas eram conhecidas. Os ligantes estudados são todos  $\beta$ -seletivos. Os mesmos caminhos foram observados para a dissociação destes ligantes, mas com frequências diferentes em cada uma das estruturas. Seis simulações independentes com 50 cópias do ligante foram realizadas para cada sistema. Os caminhos obtidos para cada ligante nestas simulações estão listados na Tabela 4.2.

Sistema	Caminhos encontrados					
TR $\beta$ com T3	I	I	I	I	I	I
TR $\beta$ com GC-24	III	III	III	III	III	III
TR $\beta$ com KB-141	I	I	I	I	III	I
TR $\beta$ com KB-141	III	III	I*	I	III	I
TR $\beta$ A317T com Triac	II	I	III	II	I	II
TR $\beta$ A234T com Triac	II	II	II	II	II	II

\*Uma das cópias saiu pelo caminho III.

**Tabela 4.2.** Caminhos obtidos nas simulações usando DMAA para outras isoformas e outros ligantes.

Foi estudada a dissociação do ligante T3 da isoforma TR $\beta$ , do ligante KB-141 de ambas as isoformas, e do ligante GC-24 da isoforma  $\beta$ . Além disso, ainda fizemos simulações do Triac ligado ao TR $\beta$  com as mutações A234T e A317T, que provocam a Síndrome da Resistência ao Hormônio Tireoidiano e aumentam as taxas de dissociação do ligante *in vitro* [31, 32].

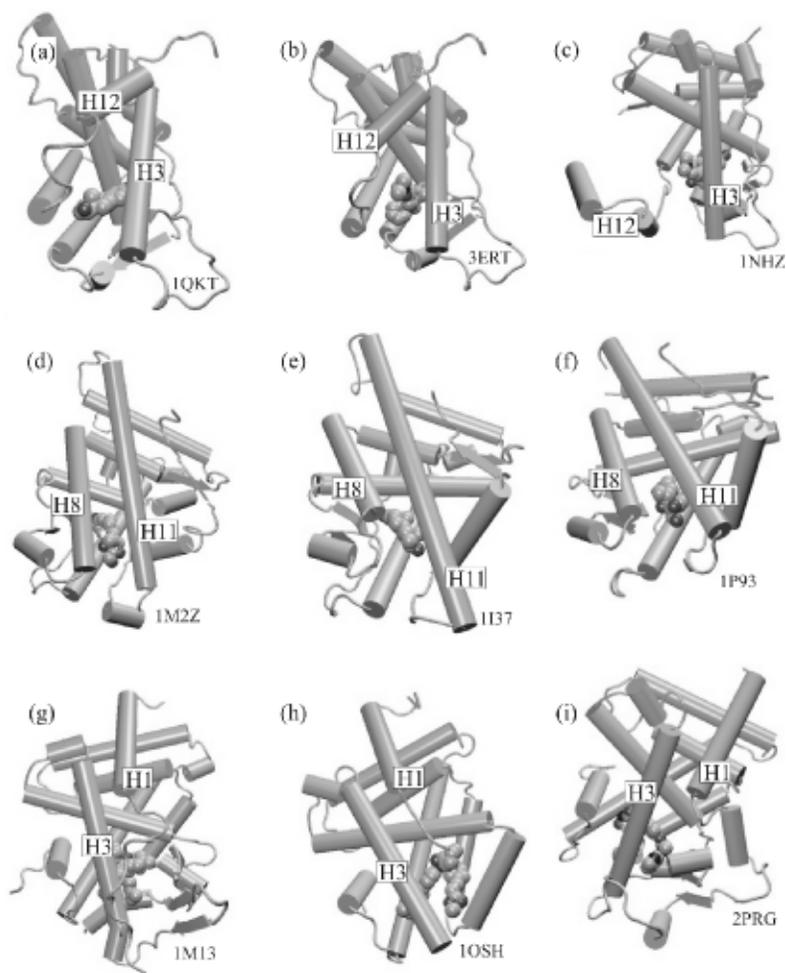
De uma forma geral, os caminhos encontrados para a dissociação do T3 da isoforma TR $\alpha$  são os mesmos encontrados para os outros ligantes e isoformas. Os caminhos I e III apareceram com frequência. O Caminho II foi detectado apenas nas simulações com os TR $\beta$  mutantes. Desta forma, as simulações indicam que os caminhos I e III devem ser gerais para ambas as isoformas. Em cada sistema um caminho de dissociação distinto parece ter sido favorecido. Por exemplo, nas seis simulações independentes do TR $\beta$  ligado ao GC-24, apenas o caminho III foi detectado, enquanto que as seis simulações do sistema TR $\beta$ -T3 mostraram um caminho

do tipo I. É possível que diferentes caminhos sejam favorecidos para diferentes isoformas, mutantes ou ligantes, mas a importância das condições iniciais (qualidade das estruturas, por exemplo), não pode ser subestimada. De qualquer forma, estas simulações sustentam a visão global de que os três caminhos observados podem ser importantes em um contexto mais geral e minimizam as chances de que outros caminhos que não foram observados possam existir e ser relevantes biologicamente.

Há evidências funcionais de que o T3 pode se dissociar do LBD por mais de um caminho. O papel da estabilização da H12 nas taxas de associação e dissociação *in vitro* é bem conhecido [48]. No entanto, alguns mutantes que provocam uma redução na afinidade do ligante possuem uma maior mobilidade na região dos loops entre as hélices 1 e 3, indicando que caminhos dos tipos II ou III podem ser importantes em certos contextos funcionais.

É importante lembrar, ainda, que apesar das evidências experimentais de que a dinâmica da hélice 12 está relacionada com as taxas de entrada e saída dos ligantes, o mecanismo envolvendo esta hélice é contraditório com o recrutamento de cofatores. Como vimos no Capítulo 1, os cofatores se ligam em uma superfície do LBD que depende do posicionamento correto da hélice 12 na presença ou na ausência dos ligantes. Desta forma, os caminhos II e III podem ser alternativas fisiológicas de mecanismos de entrada e saída que não dependem da dissociação dos cofatores numa mesma escala de tempo. Além disso, uma análise de várias estruturas cristalográficas de vários receptores com base nos resultados aqui obtidos mostrou que há estruturas que indicam possíveis mecanismos de ligação consistentes com cada um dos três caminhos observados.

A Figura 4.2 representa a estrutura cristalográfica de vários receptores distintos ligados aos seus respectivos ligantes. As estruturas representadas nas figuras 4.2(a) a (c) correspondem a: (a) o complexo ER-estradiol, (b) ER ligado ao 4-hidroxitamoxifeno e (c) o complexo GR-R486 [17, 37, 102]. Estas três estruturas possuem uma hélice 12 posicionada de maneira que o sítio de ligação fica exposto, de acordo com um mecanismo de associação ou dissociação do tipo do Caminho I. As estruturas das figuras 4.2 (d) a (f), por sua vez, correspondem a: (d) GR ligado à dexametasona, (e) o AR ligado à dihidrotestosterona e (f) outro complexo GR-dexametasona [18, 102–104]. Estas três estruturas mostram LBDs que não contém o  $\Omega$ -loop, e os ligantes ficam em contato com o solvente através das hélices 8 e 11,



**Figura 4.2.** Estruturas de outros receptores com seus ligantes, indicando que os mecanismos I (a-c), II (d-f) e III (g-i) podem ser importantes em diferentes contextos para toda a superfamília.

indicando condições favoráveis para uma dissociação ao longo do Caminho II. Por fim, as estruturas nas figuras 4.2(g) a (i) são: (g) O PXR ligado à hiperforina, (h) o complexo FXR-fexaramina e (i) o complexo PPAR $\gamma$ -rosiglitazona [1, 103, 105]. Nestas três estruturas os ligantes possuem extensões que saem do sítio de ligação por cavidades na região do grampo- $\beta$ , indicando que caminhos de associação ou dissociação do tipo III podem ser favorecidos.

As simulações descritas em [44] ainda indicam que o Caminho III pode ser

favorável para o RAR. Como veremos, este caminho é o mais favorável para a dissociação dos ligantes dos receptores do hormônio tireoideano. Provavelmente é o mecanismo de dissociação mais favorável para todos os ligantes com extremidades polares.

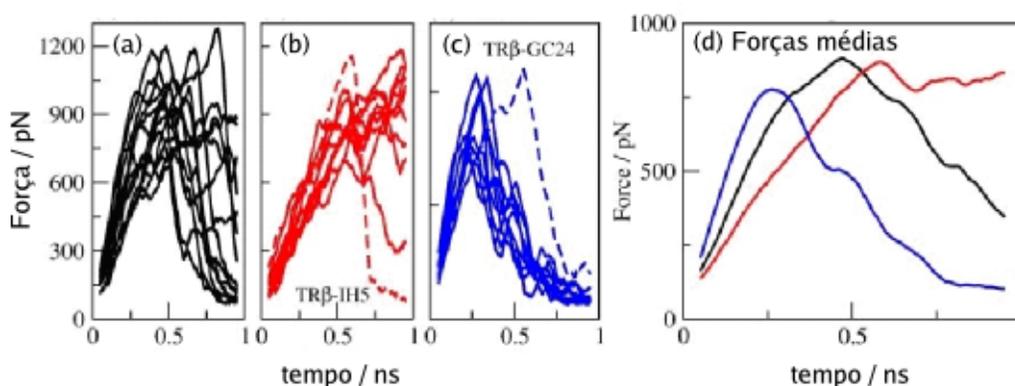
#### 4.4 Estudo dos mecanismos de dissociação com DMCI

O conjunto das simulações com a técnica DMAA permite deduzir que três mecanismos de dissociação distintos podem existir e competir em diferentes contextos biofísicos. No entanto, essas simulações não permitem uma dedução clara da importância de cada caminho, e tampouco são úteis para uma definição de detalhes mecanísticos.

As simulações com DMCI, por outro lado, permitem um estudo detalhado das interações do ligante com o receptor e da força necessária para remover o ligante do LBD. Estas simulações requerem um conhecimento prévio da dissociação, porque ao extrair o ligante é necessário definir uma direção para força externa que será aplicada. A combinação das técnicas DMAA e DMCI é, portanto, satisfatória, porque com a primeira obtêm-se uma visão global dos mecanismos, das quais é possível deduzir direções de dissociação adequadas para a aplicação da técnica DMCI. Assim, usando a técnica DMCI, podemos complementar os resultados obtidos com DMAA e responder às seguintes perguntas: Qual é o caminho mais favorável para a dissociação? Por que um caminho é mais favorável que outro? Que informações estes mecanismos podem fornecer para o desenvolvimento de ligantes de interesse farmacológico?

Como vimos, na técnica DMCI uma força externa é aplicada. Esta força é permanentemente modulada pela resistência que o meio oferece à dissociação do ligante. A força necessária para extrair os ligantes ao longo de cada caminho permite uma definição de quais caminhos são mais favoráveis. Além disso, como as interações não são aproximadas, é possível estudar com detalhes as interações do ligante com o ambiente durante a dissociação e, assim, compreender do ponto de vista molecular porque um caminho é favorecido em relação ao outro. Para a aplicação desta técnica, o LBD é solvatado por uma camada de água relativamente espessa, de forma que as interações existentes em um sistema real são representadas.

Os três caminhos obtidos com a técnica DMAA, representados na Figura 4.1, foram investigados com a técnica DMCI. Nossas simulações mostram que a dissociação foi obtida facilmente ao longo do Caminho III em todas as simulações, independentemente da estrutura inicial, do ligante e da isoforma. Os perfis de força em função do tempo para as simulações estão representados na Figura 4.3. As curvas apresentam simulações para vários ligantes distintos e sistemas distintos, descritos na Metodologia.



**Figura 4.3.** Perfis de força em função do tempo para as simulações de dissociação induzida. (a) Caminho I, (b) Caminho II e (c) Caminho III. As forças ao longo do Caminho III são sistematicamente menores.

Como pode ser visto na Figura 4.3, as forças necessárias para promover a dissociação ao longo do Caminho III são menores que as necessárias ao longo dos outros dois caminhos na grande maioria dos casos. As forças médias estão representadas na Figura 4.3(d). Como vimos, as forças aumentam quando o meio resiste à dissociação do ligante. A dissociação ao longo do Caminho I foi observada em 4 de 10 simulações (TR $\beta$ -T3, TR $\alpha$ -IH5, TR $\beta$ -IH5 e TR $\beta$ -GC1). Em apenas uma simulação o ligante foi capaz de se dissociar pelo Caminho II (TR $\beta$ -IH5). No entanto, uma ruptura abrupta das interações entre as hélices 8 e 11 foi necessária. Nas simulações nas quais a dissociação não foi observada a força não se anula no final da trajetória. A observação estrutural nestes casos é que a estrutura da proteína começa a se distorcer sem que uma cavidade que permita a dissociação do ligante seja formada. Por outro lado, a dissociação ao longo do Caminho III foi

	Força máxima / pN	Integral da força / pN ns
Caminho I	881	555
Caminho II	869	587
Caminho III	775	360

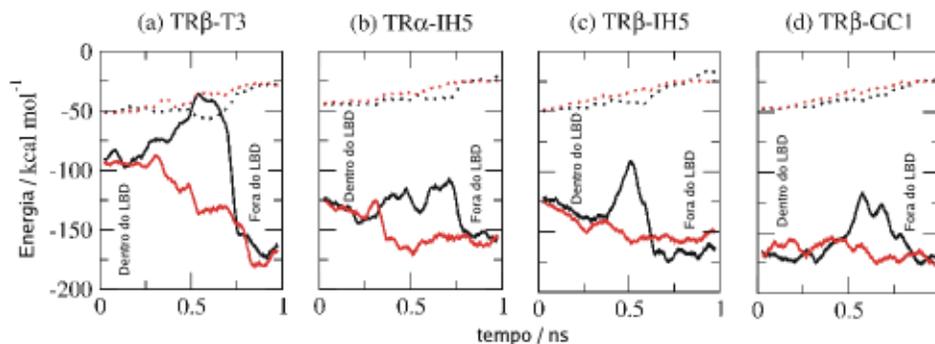
**Tabela 4.3.** Propriedades da força média nas simulações usando DMCI.

observada em todas as simulações. As forças necessárias para extrair os ligantes, de acordo com os perfis de força média, são menores para este caminho.

A Tabela 4.3 mostra as forças máximas e as integrais das forças médias para cada um dos caminhos. A força máxima associada à remoção do ligante ao longo do Caminho III é de 775 pN, enquanto que é 881 pN ao longo do Caminho I e 869 pN ao longo do Caminho II. Desta forma, a máxima resistência oferecida pelo ambiente para a dissociação dos ligantes ao longo do Caminho III é 12% menor que ao longo dos outros dois caminhos. A integral das forças faz a diferença dos três caminhos ainda mais notável. A força integrada ao longo do Caminho III (360 pN ns) é 36% menor que a integral da força ao longo do Caminho I (555 pN ns) e 38% menor que a do Caminho II (587 pN ns). Estes resultados confirmam qualitativamente o que foi observado nas simulações. Enquanto que a dissociação foi facilmente observada em todas as simulações do Caminho III, a dissociação foi difícil ao longo dos outros dois caminhos, mesmo quando diferentes direções de dissociação foram testadas. Ainda mais, as tentativas de dissociar os ligantes ao longo dos Caminhos I e II geralmente resultaram em distorções significativas da estrutura protéica, enquanto que ao longo do Caminho III apenas movimentos suaves da proteína foram necessários.

Por que a dissociação ao longo do Caminho III é mais favorável? Parte da explicação provavelmente está relacionada com o fato de que o ligante se dissocia por uma região bastante móvel da proteína [7, 52, 64, 69]. No entanto, esta não pode ser a única explicação, visto que o Caminho II também envolve uma região de grande mobilidade (o  $\Omega$ -loop) e, apesar disso, a dissociação não foi favorável.

Para compreender este fenômeno, calculamos a energia de interação do ligante com todo o ambiente (proteína+água+íons) durante a dissociação. Os perfis das interações dispersivas (vdW) e eletrostáticas, em função do tempo de simulação,



**Figura 4.4.** Energias de interação do ligante com o ambiente ao longo dos Caminhos I e III para as simulações em que ambos os caminhos foram observados. A dissociação ao longo do Caminho I envolve uma perda de interações eletrostáticas, enquanto que no Caminho III as interações eletrostáticas ficam mais favoráveis à medida que o ligante se dissocia.

para as quatro simulações nas quais a dissociação foi observada ao longo dos Caminhos I e III estão representados na Figura 4.4. As interações eletrostáticas entre o ligante e o ambiente passam por um máximo local (interações menos atrativas, que representam barreiras de potencial) durante a dissociação ao longo do Caminho I. Por outro lado, quando os ligantes são extraídos pelo Caminho III, as interações eletrostáticas tornam-se progressivamente mais favoráveis à medida que o ligante passa para o meio aquoso. Isto ocorre porque, no Caminho III, os grupos carregados ou polares do ligante se dissociam diretamente em direção ao exterior da proteína, o que pode ser visto comparando-se as Figuras 4.1 e 2.5. Desta forma, as interações favoráveis dos grupos polares dos ligantes com o receptor são substituídas por interações com moléculas de água igualmente fortes, e as interações eletrostáticas não são perdidas. Quando os ligantes se dissociam ao longo dos Caminhos I e II, por outro lado, suas extremidades hidrofílicas precisam atravessar a cavidade hidrofóbica. Assim, as interações destas extremidades com os resíduos hidrofílicos não são substituídas por interações com a água. As interações eletrostáticas mais importantes são, assim, perdidas.

O mesmo tipo de interação entre moléculas de água e a extremidade hidrofílica do ligante foi observada na dissociação do ácido retinóico do seu receptor em si-

mulações usando DMCI [44]. Além disso, o fato de que vários ligantes de receptores nucleares possuem polaridades similares, e estão posicionados de forma semelhante nos LBDs, indica que as conclusões obtidas podem ser aplicadas para outros membros da superfamília.

## 4.5 Implicações para o desenvolvimento de novos ligantes

A substituição das interações hidrofílicas dos ligantes com o LBD por interações com moléculas de água no exterior da proteína sugere que estratégias que aumentam a hidrofiliidade das extremidades polares dos ligantes não devem aumentar suas afinidades. Enquanto estas modificações aumentam as interações com os resíduos polares do sítio de ligação, também facilitariam a dissociação por favorecer a interação com moléculas de água no exterior do LBD. A extremidade polar do ligante é importante para determinar sua orientação no sítio de ligação, mas maiores polaridades não devem resultar em afinidades maiores. Isto é coerente com o fato de que os ligantes naturais T3 e T4 possuem um carboxilato e uma amina, mas muitos outros ligantes que não possuem a amina (sendo, portanto, menos polares), também se ligam aos LBDs com grande afinidade [46, 52, 64, 106]. A remoção da amina, inclusive, aumenta a afinidade do T3 e de outros ligantes análogos [49, 65]. Inclusive a substituição do carboxilato do GC-1 por um grupo hidroxietil ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ) resulta em ligantes que ainda têm grande afinidade. Desta forma, nossa proposta é que as melhores estratégias para gerar novos ligantes com grande afinidade devem se concentrar nas interações do anel fenólico do ligante com seu ambiente protéico. Esta proposta é coerente com o perfil da força da dissociação do ligante GC-24 pelo caminho III (linha tracejada na Figura 4.3(c)). Um aumento significativo na força necessária para dissociar este ligante foi necessária relativamente aos outros ligantes. Isto aconteceu porque o GC-24 possui um grupo benzênico ligado na posição 5' (Figura 2.8) que interage fortemente com os resíduos não polares das hélices 3 e 12 [64]. Esta interação hidrofóbica na região oposta à da dissociação pelo Caminho III resulta em barreiras maiores para a dissociação. A introdução de interações hidrofílicas específicas nesta região também deve resultar em ligantes com grande afinidade sem a contrapartida do efeito estéreo que as extensões grandes na posição 5' têm. Por exemplo, foi observado em um estudo nos laboratórios

Pfizer que a remoção do grupo fenólico em análogos do T3 diminui a afinidade do ligante em duas ordens de magnitude [107]. No contexto deste trabalho, este efeito resulta da remoção da única interação hidrofílica do ligante com a proteína que não é substituída por moléculas de água durante a dissociação ao longo do Caminho III.

Nossos resultados mostram, portanto, que o caminho preferencial para a dissociação de ligantes nos TRs ocorre através da região de grande mobilidade formada pelo grampo- $\beta$  e parte da hélice 3. Este mecanismo é favorecido pela substituição das interações hidrofílicas da extremidade polar do ligante por interações com moléculas de água no exterior da proteína. Estes resultados sugerem estratégias para o desenvolvimento de novos ligantes de grande afinidade, que devem se concentrar nas interações do anel fenólico dos ligantes com o sítio de ligação.

## 4.6 Mecanismos de associação dos ligantes

Uma continuação natural dos estudos da dissociação dos ligantes é o estudo de sua entrada no LBD. Nenhum estudo desta natureza foi feito, já que estudo dos mecanismos de dissociação de ligantes é potencialmente mais fácil. Isto porque as simulações são iniciadas de estruturas cristalográficas bem definidas, com o ligante posicionado dentro sítio ativo. Além disso, as trajetórias podem ser definidas usando simulações com DMAA. No caso da associação, não faz sentido usar DMAA, uma vez que os ligantes não *entrarão* na proteína espontaneamente.

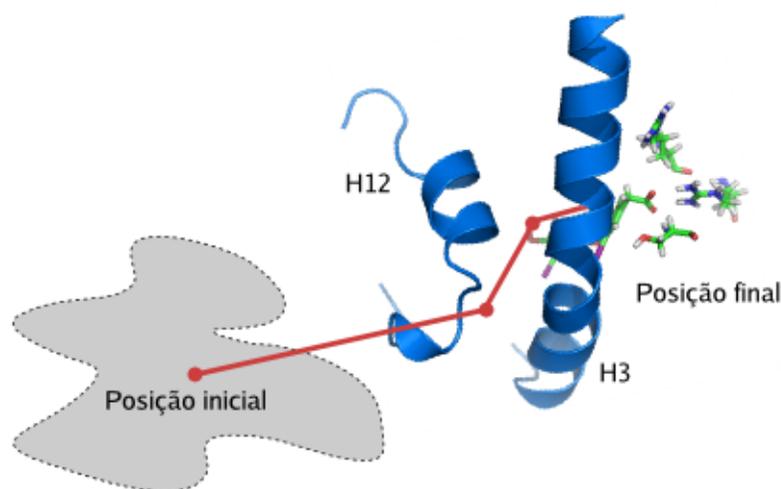
Além disso, como veremos, o estudo da entrada dos ligantes não pode ser feito usando a DMCI convencional, porque esta admite apenas trajetórias retilíneas. Para o estudo da entrada dos ligantes foi necessário desenvolver uma generalização desta técnica para trajetórias curvas, que será descrita a seguir. Existem alguns estudos que usam variações da técnica DMCI: por exemplo, o estudo da rotação de um subdomínio do citocromo C foi feito pela aplicação de um torque à estrutura, em lugar da aplicação da força DMCI convencional [108]. A generalização que propomos, no entanto, permite este tipo de estudo pela indução de trajetórias de qualquer complexidade.

### 4.6.1 Metodologia

Como descrito anteriormente, a técnica de dinâmica molecular com caminho induzido consiste na aplicação de uma força externa a um átomo, ou grupo de átomos, de forma que determinada trajetória deste grupo é induzida. A força externa tem a forma

$$\vec{F}(t) = k(\vec{v}t - \Delta\vec{x})$$

em que  $\vec{v}$  é um vetor unitário constante que define a direção do caminho,  $\Delta\vec{x}$  é vetor o deslocamento do sítio ao qual a força esta sendo aplicada com relação à sua posição inicial,  $t$  é o tempo desde o início da aplicação da força, e  $k$  é uma constante relacionada com a rigidez do potencial harmônico aplicado.



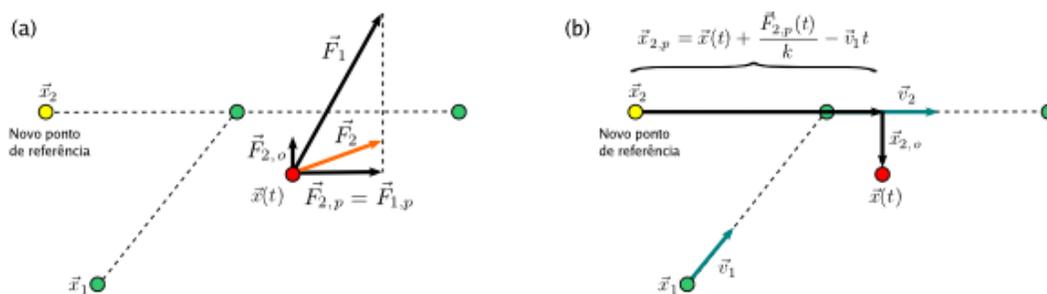
**Figura 4.5.** Uma trajetória simples de entrada requer um caminho curvo.

Na forma como foi originalmente proposta, a técnica DMCI permite apenas a indução da dissociação ao longo de trajetórias retilíneas, definidas pelo vetor  $\vec{v}$ . No entanto, para o estudo da associação (entrada) dos hormônios nos receptores, trajetórias não-retilíneas devem ser estudadas. Como mostra a Figura 4.5, a associação é um processo que parte de uma posição não muito bem definida, fora da proteína, e deve atingir uma situação final em que interações específicas no sítio ativo estarão presentes. O caminho, que neste caso é uma representação simplificada do Caminho I de dissociação proposto em [88], deve ser curvo e, portanto, a técnica

convencional de DMCI não pode ser utilizada. Para poder abordar este problema, desenvolvemos uma generalização da técnica que permite o estudo de caminhos curvos. O objetivo é modificar a direção  $\vec{v}$  cada vez que uma etapa da trajetória é cumprida, mantendo as seguintes propriedades: 1) Se a trajetória for retilínea, o resultado deve ser idêntico ao da DMCI convencional; 2) a modulação da força em função do tempo e do deslocamento deve ser conservada; 3) trajetórias contínuas (infinitas etapas) e suaves devem ter forças contínuas em módulo e direção.

Como a força na DMCI é controlada por dois parâmetros dependentes do tempo (o próprio  $t$  e o deslocamento em relação à posição inicial), a abordagem para formular a generalização da DMCI baseou-se na seguinte pergunta: *dada uma nova direção de indução  $\vec{v}$ , qual deveria ser o deslocamento  $\vec{x}$  de forma que a componente da força ao longo da nova direção fosse conservada?*

Uma representação esquemática de uma trajetória com uma mudança de direção está apresentada na Figura 4.6(a). A força que está sendo aplicada no instante da troca de direção pode ser decomposta em uma componente paralela à nova direção e em uma componente perpendicular à nova direção. A condição de que a componente paralela se conserve define parcialmente a nova força, sendo necessário especificar como deve ser construída a componente ortogonal. Isto é feito pela definição de um novo ponto de referência,  $\vec{x}_2$ .



**Figura 4.6.** Definição de um novo ponto de referência: (a) A componente da força paralela à nova direção,  $\vec{F}_{1,p}$ , deve ser preservada. (b) Um novo ponto de referência é definido de forma que  $\vec{F}_2$  cumpra a condição desejada.

Como o deslocamento  $\Delta\vec{x}$  é a diferença da posição do sítio puxado no instante  $t$  e no instante inicial, a resposta da pergunta acima, na verdade, generaliza este deslocamento introduzindo um “ponto de referência” dependente do tempo para

o cálculo da força. Desta forma, digamos que a primeira etapa do caminho foi cumprida e é o momento de aplicar a força em uma nova direção. A força nesse instante é

$$\vec{F}_1 = k[\vec{v}_1 t - (\vec{x}(t) - \vec{x}_1)], \quad (4.2)$$

onde  $\vec{v}_1$  é a direção inicial de indução e  $\vec{x}_1$  é o ponto inicial da trajetória. Digamos que na nova etapa da trajetória a direção passa a ser  $\vec{v}_2$ . Nosso interesse é conservar a componente de  $\vec{F}_1$  na direção de  $\vec{v}_2$ , o que define a componente da força paralela ao novo caminho por

$$\vec{F}_{2,p}(t) = \langle \vec{F}_1(t) | \vec{v}_2 \rangle \vec{v}_2. \quad (4.3)$$

Esta fórmula pode ser usada no momento da troca de direção. No entanto, em cada etapa do caminho é interessante que a força continue sendo modulada pelo deslocamento e pelo tempo, mas o deslocamento calculado por  $\vec{x}(t) - \vec{x}_1$  não tem mais sentido quando a direção foi modificada. Um novo vetor  $\Delta\vec{x}$  deve ser definido, e para isso é necessário encontrar um novo ponto de referência,  $\vec{x}_2$ . A componente do novo vetor deslocamento paralela ao novo caminho,  $\vec{x}_{2,p}$ , é definida de forma que a Equação 4.3 seja satisfeita, usando

$$\vec{x}_{2,p} = \vec{x}(t) + \frac{\vec{F}_{2,p}(t)}{k} - \vec{v}_1 t, \quad (4.4)$$

como mostra a Figura 4.6(b). Já a componente do novo deslocamento perpendicular à nova direção,  $\vec{x}_{2,o}$ , é simplesmente o vetor que une o ponto  $\vec{x}(t)$  à reta associada ao novo caminho (definida pelo ponto de referência e a nova direção). Assim, temos um novo ponto de referência

$$\vec{x}_2 = \vec{x} - (\vec{x}_{2,p} + \vec{x}_{2,o}).$$

A força, a partir deste momento, e até a próxima mudança de direção, passa a ser calculada simplesmente por

$$\vec{F}_2(t) = k[\vec{v}_2 t - (\vec{x}(t) - \vec{x}_2)],$$

preservando sua modulação em função do tempo e do deslocamento. É evidente, desta formulação, que quando a trajetória é retilínea o resultado é idêntico à DMCI convencional, dado que  $\vec{v}_1 = \vec{v}_2$  e, portanto,  $\vec{F}_{2,p} = \langle \vec{F}_1(t) | \vec{v}_2 \rangle \vec{v}_2 = \vec{F}_{1,p}$ . Além disso,

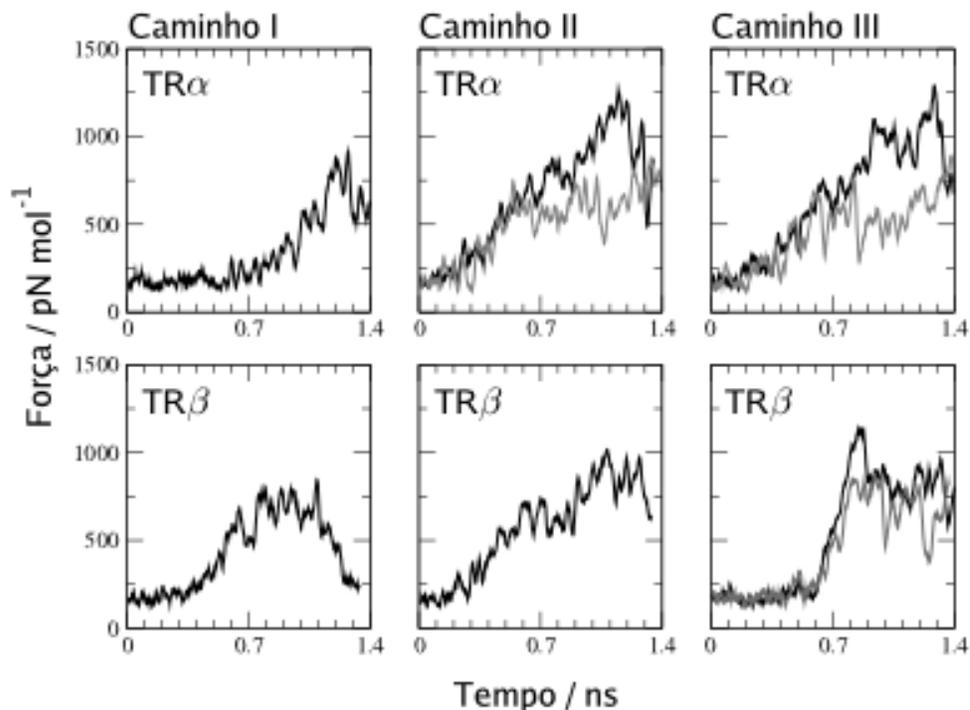
para trajetórias contínuas e suaves temos, para cada mudança de direção,  $\vec{v}_1 \sim \vec{v}_2$  e, portanto  $\vec{F}_2(t) \sim \vec{F}_1(t)$ , sendo as variações de módulo e direção da força também contínuas e suaves.

Outra maneira de definir uma força com propriedades satisfatórias pode ser obtida se, em lugar de conservar a componente da força paralela à nova direção, o módulo da força for conservado. Neste caso, temos que calcular  $\vec{x}_{2,o}$  e, em seguida, calcular  $\vec{F}_{2,p}$  e  $\vec{x}_{2,p}$  de tal forma que  $\|\vec{F}_1\| = \|\vec{F}_2\|$  por um procedimento semelhante ao descrito acima. Esta formulação tem a propriedade interessante de que o módulo da força é contínuo mesmo para trajetórias com variações bruscas de direção. Ambas as formulações são equivalentes para trajetórias suaves, já que nestes casos as componentes paralela e ortogonal da força variam pouco a cada mudança de direção e, então, o módulo da força também é contínuo na primeira implementação.

As trajetórias de associação que estudamos foram baseadas nas trajetórias de dissociação estudadas anteriormente. O método foi implementado de tal forma que a trajetória pudesse ser definida com base nas coordenadas de átomos de referência na proteína. Por exemplo, a primeira mudança de direção ao longo de uma trajetória semelhante ao Caminho I foi definida como a média das posições de um átomo da H3 e de um átomo da H12. Quando o átomo puxado se aproxima do ponto definido com uma certa precisão, a direção da força é alterada na direção do segundo ponto na trajetória. O ponto final das trajetórias foi em geral definido por uma distância entre o carbono carboxílico dos ligantes e uma das Argininas do sítio ativo. Isto é, a força é aplicada até que essa distância se satisfizesse. Para as trajetórias do tipo do Caminho III o ponto final era definido pela distância entre o oxigênio fenólico e um nitrogênio da His381/435, que estão em contato na estrutura nativa de todos os ligantes.

## 4.6.2 Resultados

A obtenção de caminhos de associação nos quais o hormônio terminasse em uma posição razoavelmente semelhante à sua posição no sítio ativo da proteína mostrou-se bastante complicada. Foram realizadas, no total, 76 simulações independentes, de 2 ns, para a associação do T3 e de vários ligantes  $\beta$ -seletivos. Tentamos es-



**Figura 4.7.** Perfís de força em função do tempo de simulação para as simulações bem sucedidas da associação do T3. Os gráficos com duas curvas indicam a obtenção de duas trajetórias de associação satisfatórias em simulações independentes.

tudar os caminhos I, II e III observados para a dissociação como trajetórias de entrada dos ligantes. Em 24 destas simulações trajetórias satisfatórias foram obtidas, sendo 6 ao longo do Caminho I, 9 pelo Caminho II e 9 pelo Caminho III. As outras 52 simulações tiveram problemas, como a distorção da estrutura protéica, o posicionamento incorreto do ligante no sítio ativo ou a entrada apenas parcial dos hormônios.

Para o estudo da entrada do T3 no LBD foram feitas 7 simulações buscando trajetórias satisfatórias para cada caminho, em cada isoforma. Foram bem sucedidas uma trajetória para cada isoforma ao longo do Caminhos I, duas ao longo do Caminho II para o TR $\beta$  e uma para o TR $\alpha$ , e duas para cada isoforma ao longo do Caminho III.

Na Figura 4.7 vemos os perfis de força em função do tempo de simulação para as trajetórias bem sucedidas de entrada do T3 por cada um dos caminhos, em cada isoforma. A Tabela 4.4 mostra a força máxima e a integral da força para cada uma destas trajetórias.

A Figura 4.7 sugere que a associação pelo Caminho I pode ter sido mais fácil que a associação pelos outros dois caminhos. No entanto, esta diferença se torna pouco evidente se as forças máximas e as integrais das forças são levadas em consideração. Na Tabela 4.7 vemos que, de fato, as forças máximas e as integrais ao longo do Caminho I são menores que as obtidas para algumas das simulações dos outros caminhos, mas nos casos em que mais de um caminho bem sucedido foi obtido a diferença praticamente não existe.

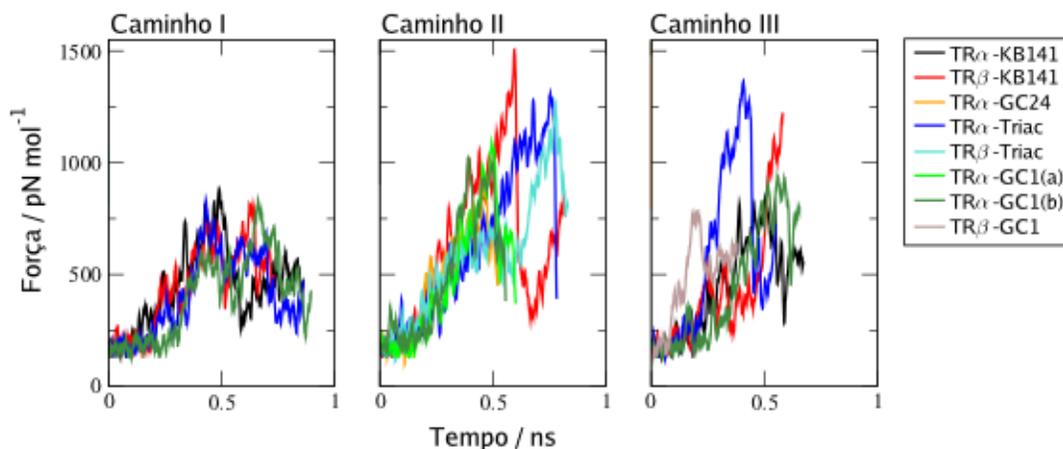
Isoforma	Caminho I	Caminho II	Caminho III
TR $\alpha$	902/352	1262/436 e 872/347	1285/462 e 884/340
TR $\beta$	846/286	1018/375	1132/406 e 873/301

**Tabela 4.4.** Forças máximas e integral das forças para as trajetórias de associação bem sucedidas do T3 (Força máxima em pN/Integral em pN ns).

A análise destas forças, portanto, sugere que os três caminhos são semelhantes do ponto de vista das barreiras envolvidas para a associação, o que é distinto do que foi observado para a dissociação dos ligantes. A entrada pelo Caminho I parece ser ligeiramente preferida.

O estudo da associação de outros ligantes ao longo destas trajetórias também sustenta a interpretação acima. A Figura 4.8 mostra os perfis da força em função do tempo de simulação para a associação dos ligantes ao longo dos três caminhos. Na Tabela 4.5 vemos as forças máximas e as integrais das forças obtidas nestas trajetórias.

A Figura 4.8 sugere que o Caminho I apresenta as menores barreiras para a dissociação, em particular no que concerne às forças máximas obtidas. As trajetórias de associação pelo Caminho I são, no entanto, mais longas. A força deixa de ser aplicada quando o ligante atinge sua posição final no sítio ativo. Ao longo do Caminho I este processo leva cerca de 0,8 ns, enquanto que ao longo dos outros dois caminhos várias trajetórias terminaram em menos tempo. Por esta razão, a



**Figura 4.8.** Perfís de força em função do tempo de simulação para as simulações bem sucedidas da associação dos ligantes  $\beta$ -seletivos.

diferença nas integrais das forças não é tão notável como a diferença nas forças máximas.

Como mostra a Tabela 4.5, existe uma diferença significativa entre as forças máximas ao longo do Caminho I (média: 837 pN) e ao longo dos outros dois Caminhos (II: média: 1203 pN, III: média 1026 pN). O Caminho II parece ser sistematicamente menos favorável que o Caminho I, mas duas simulações do Caminho II apresentaram forças máximas comparáveis às do Caminho I ( $\text{TR}\alpha\text{-KB-141}$  e  $\text{TR}\beta\text{-GC1}$ ).

O Caminho III parece ser favorável do ponto de vista das integrais das forças. A média das integrais ao longo deste caminho é 264 pN ns, enquanto que pelos Caminhos I e II as médias são 353 e 377 pN ns. Novamente, no entanto, três simulações do Caminho II apresentam forças integrais menores, semelhantes às observadas ao longo do Caminho III.

Diferentemente do que foi observado nas simulações da dissociação dos ligantes, não parece haver um caminho preferencial claro para as simulações de entrada. Estas simulações, no entanto, possuem a importante limitação de que não existem estruturas dos TRs sem ligante. Estas estruturas podem possuir diferenças importantes que favoreçam a associação por um ou outro caminho.

A forma como a DMCI generalizada foi concebida mostrou-se adequada. Tra-

Simulação	Caminho I	Caminho II	Caminho III
TR $\alpha$ -KB141	877/383	–	827/299
TR $\beta$ -KB141	815/323	1150/499	1224/244
TR $\beta$ -GC24	–	1505/242	–
TR $\alpha$ -Triac	831/351	904/482	1364/313
TR $\beta$ -Triac	–	1303/481	–
TR $\alpha$ -GC1(a)	–	1274/285	–
TR $\alpha$ -GC1(b)	825/356	1083/275	927/287
TR $\beta$ -GC1	–	–	789/177

**Tabela 4.5.** Forças máximas e integrais das forças obtidas para a associação dos ligantes  $\beta$ -seletivos estudados (Força máxima em pN/Integral da força em pN ns).

jetórias satisfatórias para a associação de diversos ligantes pelos três caminhos foram obtidas. Estes estudos, no entanto, apresentam dificuldades significativamente maiores que o estudo da dissociação, sendo a definição das trajetórias o maior problema.



## Capítulo 5

# Estudo da seletividade de ligantes $\beta$ -seletivos

O desenvolvimento de ligantes seletivos em relação à isoforma  $\beta$  dos receptores do hormônio tireoideano possui grande interesse farmacológico. Estes ligantes são potenciais inibidores de distúrbios metabólicos, como a obesidade, sem os efeitos colaterais associados à atividade dos hormônios tireoideanos sobre os tecidos cardíacos. Os estudos das razões estruturais da seletividade dos ligantes  $\beta$ -seletivos que foram desenvolvidos até o momento se basearam na análise de estruturas cristalográficas [49, 52, 64] ou no estudo da importância dos grupos funcionais dos ligantes [49, 60, 65]. No entanto, vários destes estudos foram capazes de fornecer apenas explicações parciais, pouco satisfatórias, para a seletividade dos ligantes [49, 52]. Recentemente, estruturas de boa resolução foram obtidas para as isoformas  $\alpha$  e  $\beta$  dos receptores do hormônio tireoideano ligadas aos ligantes Triac e GC-1, pelo grupo do Prof. Polikarpov. Como veremos, as estruturas do Triac aparentemente contradizem a seletividade do ligante Triac, e as estruturas do GC-1 permitem apenas uma apreciação parcial dos mecanismos envolvidos. O estudo das estruturas com auxílio das simulações permitiu, como veremos, explicar a aparente contradição observada nas estruturas com Triac. Além disso, as simulações forneceram um suporte mais quantitativo para deduções a respeito dos mecanismos por trás da seletividade do GC-1.

### 5.1 A seletividade do ligante Triac

O Triac é um metabólito do T3 que é naturalmente encontrado no organismo em concentrações baixas. É produzido principalmente no fígado [51]. Têm sido

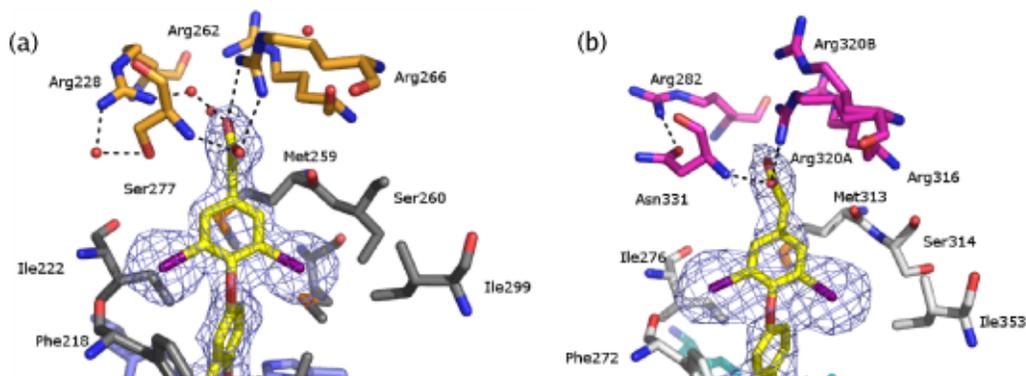
usado com bastante freqüência no tratamento do hipotireoidismo devido à sua  $\beta$ -seletividade e conseqüente menor toxicidade para os tecidos cardíacos [52]. Estruturas do Triac ligado ao TR $\beta$  humano e ao TR $\alpha$  do rato foram obtidas, mas a semelhança entre a maior parte dos resíduos do sítio ativo não permitiu uma dedução clara dos mecanismos envolvidos na seletividade deste ligante [52].

O Triac difere do T3 apenas na extremidade hidrofílica. O T3 possui uma cadeia de 3 carbonos ligada ao anel aromático em que estão ligadas uma amina e um carboxilato (ver Figura 2.1). No Triac, a cadeia perde um carbono e o grupo amina, como mostra a Figura 2.2. O Triac possui uma afinidade aproximadamente três vezes maior para a isoforma TR $\beta$  que para a TR $\alpha$ , e esta seletividade tem que estar associada às diferenças de sua extremidade hidrofílica.

### 5.1.1 Estruturas cristalográficas

Recentemente o grupo do Prof. Polikarpov obteve estruturas cristalográficas de boa resolução do Triac associado aos LBDs de ambas as isoformas humanas dos TRs [22, 69]. As estruturas foram obtidas com resoluções de 2,1Å e 2,6Å para o isoforma  $\alpha$  e  $\beta$ , respectivamente. Os resíduos do sítio de ligação do Triac em ambas as isoformas possuem conformações e posições muito parecidas, como mostram as Figuras 5.1(a) e (b).

No entanto, o conjunto de aminoácidos da extremidade hidrofílica da cavidade de ligação apresenta algumas diferenças. Em primeiro lugar, conformações distintas das Argininas 228 e 282 são observadas. No TR $\alpha$  esta Arginina interage com duas moléculas de água, que formam ligações com a Ser277 e com o ligante. No TR $\beta$  a correspondente Arg282, interage diretamente com a Asn331 (que corresponde à Ser277 na isoforma  $\alpha$ ), mas não parece interagir direta nem indiretamente com o ligante. A segunda variação conformacional notável é a da Arg266/320. Na estrutura do TR $\alpha$  a Arg266 interage fortemente com o ligante formando uma ponte salina (duas ligações de hidrogênio entre resíduos carregados), como mostra a Figura 5.1(a). No TR $\beta$ , por sua vez, apenas uma ligação de hidrogênio é observada entre o ligante e a Arg320, resíduo correspondente à Arg266 do TR $\alpha$ , como indica a Figura 5.1(b). Ainda mais, a Arg320 é observada em duas conformações. A que é capaz de formar uma ligação de hidrogênio com o ligante se assemelha

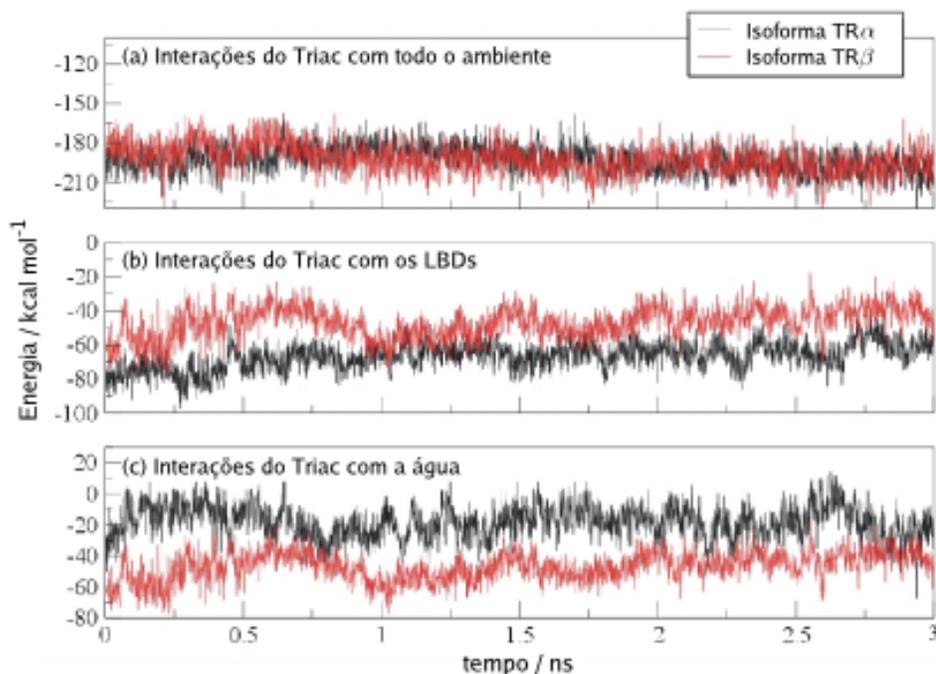


**Figura 5.1.** Estruturas cristalográficas do Triac ligado às isoformas (a)  $\alpha$  e (b)  $\beta$  dos receptores do hormônio tireoidiano. Na isoforma  $\alpha$  o Triac interage fortemente com a Arg266, enquanto que a Arg320 no TR $\beta$  é encontrada em duas conformações, indicando uma interação mais fraca com o ligante.

com a conformação observada para o TR $\alpha$  (Arg320A). No entanto, uma segunda conformação, na qual este resíduo não parece interagir com o ligante, também é observada na estrutura cristalográfica (Arg320B). A ausência de água na cavidade de ligação da isoforma  $\beta$  não pode ser considerada relevante, já que a menor resolução da estrutura pode inibir a observação destas moléculas caso não estejam em posições cristalográficas muito bem definidas.

A observação das estruturas cristalográficas indica que na isoforma  $\alpha$  há uma interação mediada por uma molécula de água entre a Arg228 e o ligante. Esta interação não é observada na estrutura do TR $\beta$ . Na estrutura do TR $\alpha$  há uma forte ponte salina entre o ligante e a Arg266. Na estrutura do TR $\beta$  a Arg320 é observada em duas conformações. Em uma delas, forma-se uma ligação de hidrogênio com o ligante. Na outra, não há a formação de nenhuma interação direta entre este resíduo e o Triac.

Desta forma, as estruturas cristalográficas parecem sugerir que a interação do Triac com o sítio ativo na isoforma  $\alpha$  é mais forte (forma ligações de hidrogênio a mais) que na isoforma  $\beta$ . Este resultado aparentemente contradiz a seletividade observada do Triac, que possui maior afinidade em relação à isoforma  $\beta$  que em relação à isoforma  $\alpha$ . As estruturas cristalográficas, portanto, não são suficientes para a compreensão da razão da seletividade deste ligante.



**Figura 5.2.** Interações do Triac com (a) todo o ambiente, (b) com os LBDs e (c) com a água. As interações com todo o ambiente são semelhantes nas duas isoformas porque as interações com a água no TR $\beta$  compensam as interações mais favoráveis do LBD com o Triac na isoforma  $\alpha$ .

### 5.1.2 Energias de interação

A aparente contradição observada entre a seletividade do Triac e suas estruturas cristalográficas pode ter as seguintes explicações: 1) O favorecimento da ligação em relação à estrutura do TR $\alpha$  pode ser um artefato da estrutura cristalográfica, ou simplesmente não ser favorável em relação à isoforma  $\alpha$  por algum motivo não-evidente. 2) Os modos de ligação observados podem não ser únicos para uma ou para ambas as isoformas; outros modos de ligação podem existir que justifiquem as seletividades observadas. 3) As afinidades observadas são fortemente determinadas por fatores entrópicos, sendo a mobilidade das estruturas, e não as energias de interação, o fator determinante para a seletividade.

As simulações de dinâmica molecular permitem a obtenção de informações sobre a mobilidade das estruturas e também sobre as energias de interação envolvidas.

Interações com	Isoforma $\alpha$ / kcal mol <sup>-1</sup>	Isoforma $\beta$ / kcal mol <sup>-1</sup>
Todo o ambiente	-192,74	-192,52
Resíduos do LBD	-66,63	-46,96
Moléculas de água	-18,37	-37,56
Íons	-107,74	-108,01

**Tabela 5.1.** Energias de interação do Triac nas simulações.

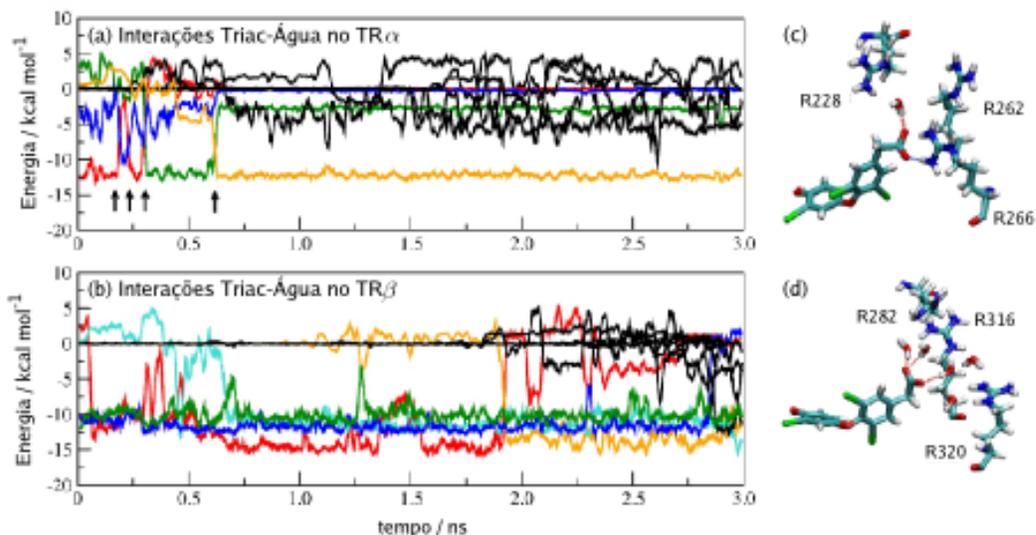
Foram feitas simulações partindo das estruturas do Triac ligado a ambas as isoformas.

A primeira questão a ser respondida pelas simulações é se, de fato, o Triac possui uma interação com o LBD mais forte para o TR $\alpha$  do que para o TR $\beta$ , como sugerem as estruturas cristalográficas. Calculamos a energia de interação do Triac com o ambiente e, surpreendentemente, estas energias são praticamente idênticas (diferindo na média em apenas 0,2 kcal mol<sup>-1</sup>), como mostram a Figura 5.2(a) e a Tabela 5.1.

No entanto, as interações do Triac com os LBDs são, de fato, favoráveis para a isoforma  $\alpha$  em cerca de 20 kcal mol<sup>-1</sup>, como foi sugerido pelas estruturas cristalográficas. Se a interação com os LBDs favorece a isoforma  $\alpha$  mas a interação com o ambiente como um todo não indica um favorecimento, interações com moléculas de água, ou com os íons, devem ser responsáveis pela compensação observada. Como mostra a Tabela 5.1 a interação com os íons no exterior da proteína difere em menos de 1 kcal mol<sup>-1</sup>, de forma que a compensação, claramente, se deve a interações favoráveis do ligante com moléculas de água na estrutura do TR $\beta$ .

O estudo destas energias mostrou que, de fato, a interação do Triac com o LBD do TR $\alpha$  é mais favorável que a interação do Triac com o LBD do TR $\beta$ , como sugerido pelas estruturas cristalográficas. No entanto, a análise das interações com todo o ambiente sugere que esta diferença é compensada pela interação com moléculas de água. Para caracterizar a natureza da interação do Triac com a água em cada uma das estruturas, calculamos as interações do ligante com cada molécula de água individualmente.

As energias de interação das moléculas de água que interagem fortemente com o Triac durante as simulações estão representadas nas Figuras 5.3(a) e (b). No TR $\alpha$ ,



**Figura 5.3.** Interações do Triac com moléculas de água nas simulações do (a) TR $\alpha$  e (b) TR $\beta$ . As curvas de diferentes cores correspondem às interações do Triac com moléculas de água diferentes. Interações favoráveis do ligante com a água possuem energias de aproximadamente  $-10 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Várias moléculas de água interagem favoravelmente com o Triac na isoforma  $\beta$  simultaneamente. Na isoforma  $\alpha$  apenas uma água interage intensamente com o Triac em cada instante.

o Triac parece formar ligações de hidrogênio fortes com apenas uma molécula de água por vez (interações da ordem de  $-10 \text{ kcal mol}^{-1}$ ). Não é apenas uma molécula de água que participa nesta interação. A molécula de água que interage com o Triac fortemente é frequentemente substituída por outra, nos instantes indicados pelas flechas na Figura 5.3(a). Há trocas entre moléculas situadas no exterior da proteína e na cavidade de ligação.

A forma como o Triac interage com moléculas de água no sítio ativo do TR $\beta$  é bastante diferente, como mostra a Figura 5.3(b). Durante a simulação, até quatro moléculas de água interagem de forma efetiva com o Triac simultaneamente, indicadas por diferentes cores. As moléculas de água envolvidas também sofrem intercâmbios frequentes. Estas três moléculas de água adicionais compensam a diferença da interação do Triac com o LBD que é favorável ao TR $\alpha$ .

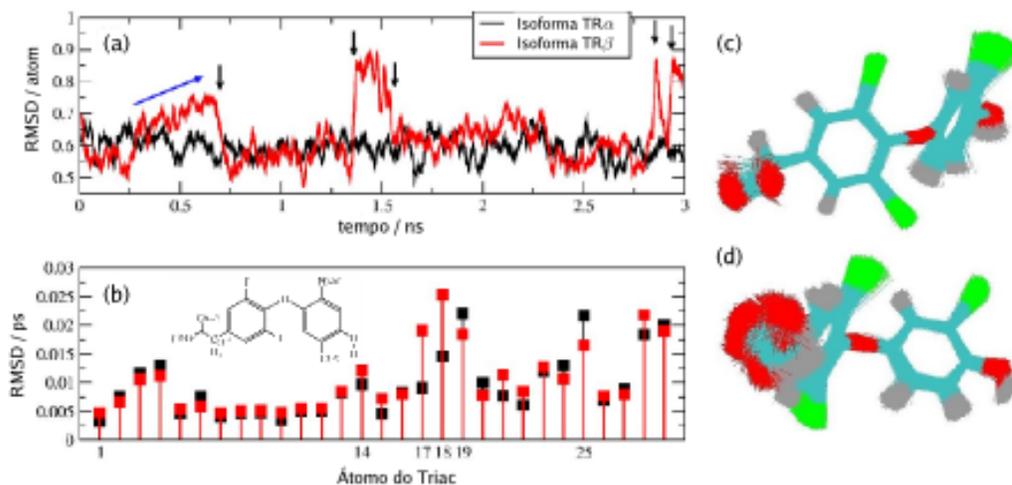
Representações esquemáticas dos modos de ligação do Triac com as águas no

$TR\alpha$  e no  $TR\beta$  podem ser vistas nas Figuras 5.3(c) e (d). Estas figuras são de instantes representativos das simulações, e mostram claramente como no  $TR\alpha$  apenas uma molécula de água interage com o carboxilato do Triac, e este forma uma ponte salina forte com a Arg266. Esta interação é responsável pela interação mais favorável do Triac com o LBD e persiste durante toda a simulação. A presença desta conformação única é suportada pela estrutura cristalográfica. No  $TR\beta$ , o Triac forma interações diretas com três moléculas de água, e outras duas moléculas se encontram próximas do carboxilato, porém não interagindo diretamente com o ligante. A Arg320 não interage diretamente com o carboxilato do Triac: todas as interações entre resíduos de arginina e o ligante são mediadas por moléculas de água. Estas observações estão de acordo com as energias de ligação. A hidratação da extremidade hidrofílica do Triac é mais importante na isoforma  $\beta$  que na  $\alpha$  e compensa as interações mais fracas do ligante com o LBD. A observação de que as interações hidrofílicas da extremidade do ligante podem ser substituídas sem custo energético pela interação com a água já tinha sido feita nos estudos da dissociação [70].

Resumindo, as simulações confirmam a observação estrutural cristalográfica de que a interação do Triac com o LBD do  $TR\alpha$  é mais forte. No entanto, estas interações são substituídas por interações com moléculas de água. O Triac é mais fortemente solvatado no  $TR\beta$ , resultando em interações com o todo ambiente similares. No entanto, estes resultados não explicam, ainda, a seletividade do Triac. Outros aspectos da dinâmica do sistema estão envolvidos neste fenômeno, como veremos a seguir.

### 5.1.3 A mobilidade do ligante

O desvio quadrático médio (RMSD) do Triac em função do tempo de simulação para as simulações do  $TR\alpha$  e do  $TR\beta$  estão mostrados na Figura 5.4(a). Podemos observar que o Triac, no sítio de ligação da isoforma  $TR\alpha$ , oscila em torno de uma conformação média com desvios da ordem de 0,5 a 0,7 Å, a maior parte do tempo. As variações do RMSD do Triac, no  $TR\alpha$ , indicam a oscilação da estrutura em torno de uma única conformação média. Por outro lado, o RMSD do Triac na estrutura do  $TR\beta$  mostra variações maiores, sugerindo que o ligante pode ser encontrado em



**Figura 5.4.** Mobilidade do Triac nas simulações. (a) Mobilidade média do ligante em função do tempo. (b) Média temporal da mobilidade de cada átomo. Sobreposição das conformações do Triac observadas nas simulações do ligante no (c) TR $\alpha$  e (d) TR $\beta$ . As transições conformacionais apontadas em (a) indicam uma maior mobilidade do Triac na estrutura  $\beta$ . Em (b) vemos que a maior diferença corresponde à mobilidade do carboxilato.

mais de uma conformação no sítio ativo.

Cinco transições conformacionais podem ser observadas pela variação do RMSD do ligante no TR $\beta$  (flechas pretas), assim como uma transição suave (flecha azul). O fato da maior parte das transições conformacionais serem rápidas indica que os intermediários não devem ser estáveis. Estas transições mostram, claramente, que o Triac tem maior mobilidade na estrutura do TR $\beta$  do que na estrutura do TR $\alpha$ .

Na Figura 5.4(b) a mobilidade de cada átomo do Triac é comparada nas simulações de cada isoforma. A mobilidade foi calculada relativamente à primeira estrutura da simulação, independentemente das transições conformacionais observadas. A mobilidade da maioria dos átomos é semelhante nas simulações das duas isoformas. O Iodo na posição 5' (I19) e o átomo de hidrogênio na posição simétrica a ele (H25) são  $0,004 \text{ \AA ps}^{-1}$  mais móveis na estrutura do TR $\alpha$  do que na estrutura do TR $\beta$ . Esta maior mobilidade indica que no TR $\alpha$  o anel fenólico oscila em um plano paralelo à ligação anel-OH mais facilmente no TR $\alpha$  do que no TR $\beta$ .

Os oxigênios do carboxilato (O17 e O18), por outro lado, são aproximadamente

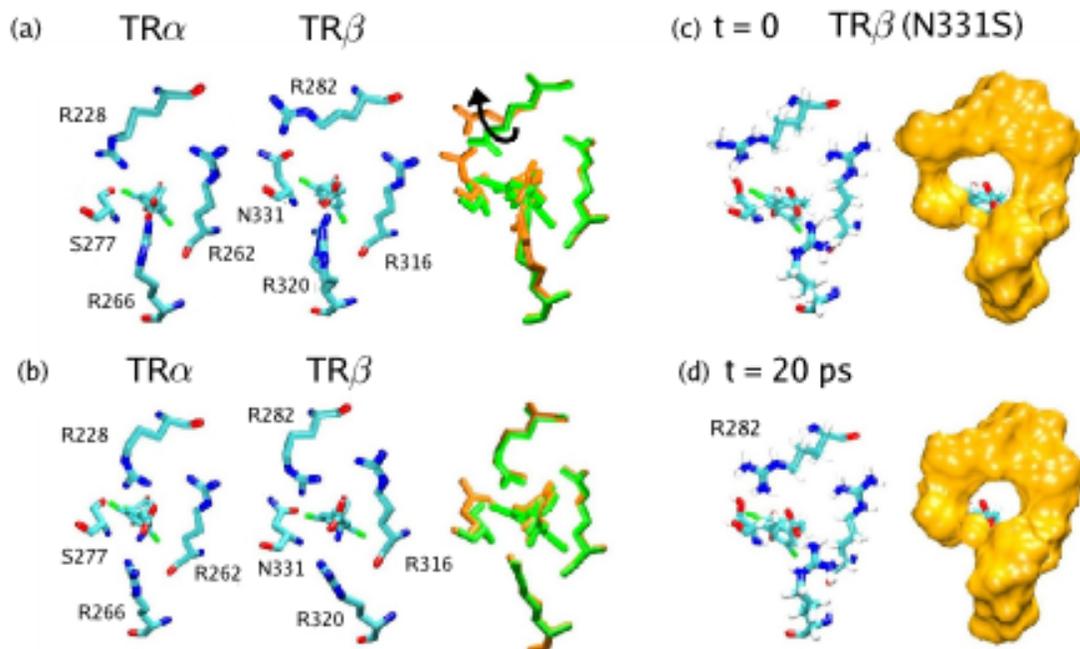
0,011Å ps<sup>-1</sup> mais móveis na estrutura do TR $\beta$  do que na do TR $\alpha$ . Este aumento de mobilidade é quase três vezes maior que o maior aumento de mobilidade na estrutura  $\alpha$ . Isto implica que as transições conformacionais observadas para o Triac na estrutura do TR $\beta$  são uma consequência da variabilidade conformacional do grupo carboxilato.

Nas Figuras 5.4(c) e (d) vemos a sobreposição das conformações do Triac em vários instantes das simulações. Como vemos, a mobilidade da maior parte dos átomos é semelhante em ambas as isoformas, mas há uma variabilidade conformacional maior e clara do carboxilato do Triac na isoforma  $\beta$ . O carboxilato oscila em torno de uma estrutura média bem definida no TR $\alpha$ , mas parece estar fundamentalmente deslocado na estrutura do TR $\beta$ .

A menor mobilidade do carboxilato no TR $\alpha$  é uma consequência da ponte salina que este forma com a Arg266. Como todas as interações do Triac com as argininas do sítio ativo são mediadas por moléculas de água na isoforma  $\beta$ , e estas águas possuem mais graus de liberdade para se moverem, o carboxilato acaba tendo maior mobilidade sem um prejuízo do ponto de vista da energia de interação. Como a diferença das interações do Triac com os LBDs está associada a uma maior mobilidade no receptor TR $\beta$ , a razão da seletividade parece ser entrópica.

#### 5.1.4 Os sítios de ligação

As simulações sugerem que há uma diferença fundamental entre os modos de ligação do Triac em cada isoforma, associada aos diferentes graus de hidratação do carboxilato. Uma inspeção cuidadosa do sítio de ligação mostra que a cavidade hidrofílica do sítio ativo é maior no TR $\beta$  do que no TR $\alpha$ , o que permite a entrada de água, como mostra a Figura 5.5(a). As questões fundamentais são: por que esta cavidade é maior no TR $\beta$ ? Por que um mecanismo similar não é observado para o T3? A análise das simulações, assim como das estruturas cristalográficas, sugere uma explicação para este mecanismo. Comparando os modos de ligação do Triac às isoformas, na Figura 5.5(a), vemos que as Argininas 228/282 interagem com a cadeia lateral da Ser277 no TR $\alpha$  e com a da Asn331 no TR $\beta$ . Devido à maior cadeia lateral da Asparagina em relação à Serina, esta interação provoca um afastamento da Arg228 do carboxilato, levando a uma cavidade de ligação maior.



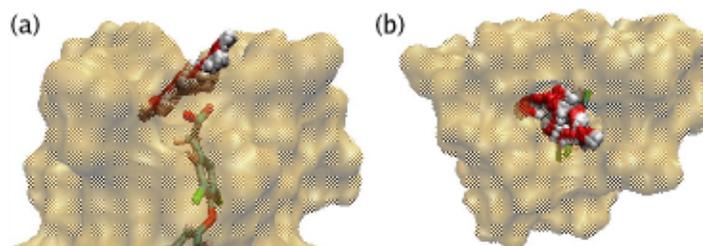
**Figura 5.5.** Cavidade hidrofílica do sítio de ligação dos TRs na presença do Triac: (a) Na conformação aberta da Arg282 no TR $\beta$ , a cavidade de ligação é maior na isoforma  $\beta$  que na  $\alpha$ . (b) Para o T3 as cavidades são similares, porque o ligante interage diretamente com os resíduos Ser277/Asn331. A formação da interação entre a Ser331 e a Arg282 envolve um movimento da arginina que reduz a cavidade de ligação no mutante TR $\beta$ -N331S, como mostrado por uma imagem do início da simulação (c) e após 20 ps (d).

Esta maior cavidade de ligação permite a entrada de moléculas de água que se ligam diretamente ao carboxilato do Triac. A abertura do sítio de ligação no TR $\alpha$  requer a ruptura da ligação Ser277-Arg228, o que não é favorável.

Este mecanismo não ocorre para o T3 porque não há variações conformacionais da Arg228 quando este ligante se associa a cada uma das isoformas, como mostra a Figura 5.5(b). Isto é uma consequência do carboxilato do T3 interagir diretamente com a Arg228/282, levando a modos de ligação semelhantes apesar da substituição Ser/Asn do sítio ativo.

Para reforçar nossa hipótese de que as diferenças de hidratação estão relacionadas com as interações das Argininas 228/282 com os resíduos Ser277 ou Asn331,

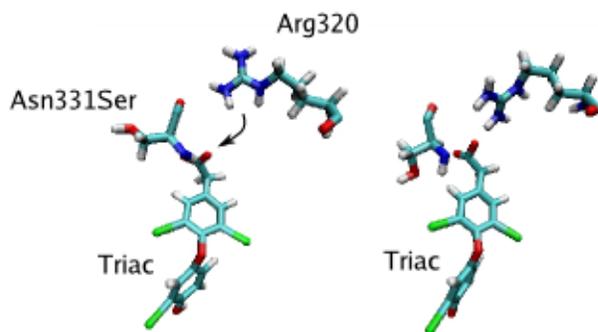
fizemos simulações dos mutantes TR $\beta$ -N331S e TR $\alpha$ -S277N. As simulações foram feitas a partir das estruturas nativas, mas com as cadeias dos resíduos laterais modificadas. Desta forma, as diferenças nas simulações decorrem somente do intercâmbio das cadeias. Cada uma destas simulações durou 3 ns. Vários aspectos destas simulações suportam a interpretação acima. Em ambas as simulações, a interação Arg228/282 com o resíduo nativo foi rapidamente substituída pela interação com a cadeia lateral do resíduo mutante. Isto forçou, como esperado, uma retração da cadeia lateral da Arg282 no TR $\beta$  para que esta pudesse interagir com a cadeia lateral da Serina, mais curta. Ao mesmo tempo, uma conformação aberta da Arg228 foi detectada no TR $\alpha$ , favorecida pela interação com a cadeia lateral da Asparagina mutante. Estes movimentos ocorreram nos primeiros instantes das simulações, e são bastante semelhantes às diferenças estruturais observadas nos modelos cristalográficos, como mostram as Figuras 5.5(c) e (d). Na simulação do TR $\beta$ -N331S vimos, ainda, a expulsão de uma molécula do sítio ativo, o que é consistente com o fato de que a menor cavidade de ligação implica em uma hidratação menos efetiva do carboxilato. A expulsão da molécula de água está representada nas Figuras 5.6(a) e (b).



**Figura 5.6.** Uma molécula de água sendo expulsa do sítio de ligação como consequência da mutação N331S (TR $\beta$ ). (a) Visão lateral. (b) Visão frontal.

Para uma reversão completa dos modos de ligação, seria necessário ter observado a formação da ponte salina entre a Arg320 e o carboxilato do T3 na estrutura do TR $\beta$ . Isto não foi observado, mas a Arginina se moveu para dentro do sítio ativo. Houve a formação de uma ligação de hidrogênio com o carboxilato, como mostra a Figura 5.7. Nesta figura vemos como a cadeia lateral da Arg320 se fecha e interage com o ligante após a mutação do resíduo Asn331 e a expulsão de uma molécula de água. A ruptura da forte interação da Arg266 com o carboxilato do

Triac na estrutura do TR $\alpha$  não foi observada, de forma que na simulação do TR $\alpha$  mutante não houve uma reversão completa dos modos de ligação.



**Figura 5.7.** A Arg320 fecha o sítio ativo e interage com o Triac quando a mutação Asn331Ser é feita.

### 5.1.5 Discussão

Os mecanismos da seletividade de ligantes tiromiméticos ainda precisam ser completamente compreendidos. Para o GC-1 uma rede de ligações de hidrogênio envolvendo a Asn331 parece ter papel fundamental [52] (ver próxima seção). Para o GC-24 uma contribuição adicional de um empacotamento hidrofóbico parece ser responsável por grande parte da seletividade [64]. Para o KB-141, outra rede de ligações de hidrogênio parece ter um papel importante, mas os detalhes por trás da seletividade ainda são pouco claros [49]. Diversos mecanismos diferentes parecem agir de forma a gerar ligantes  $\beta$ -seletivos.

Para o Triac, a entropia parece ser o principal fator governando sua seletividade em relação à isoforma  $\beta$ . As simulações confirmam a observação feita nas estruturas cristalográficas de que as interações do Triac com o LBD do TR $\alpha$  são mais efetivas que as interações com o TR $\beta$ , levando a uma aparente contradição em relação à seletividade observada. Ao mesmo tempo, as simulações mostram que não há diferenças significativas nas energias de interação quando as moléculas de água são consideradas, uma vez que o Triac é hidratado de forma mais efetiva na isoforma  $\beta$ . A mediação das interações do Triac com o LBD por moléculas de água permite que o Triac tenha maior mobilidade no TR $\beta$ .

Infelizmente, para que a diferença de entropia entre os dois sistemas possa ser calculada, simulações muito mais longas seriam necessárias. No tempo de simulação observado, as transições conformacionais do Triac na isoforma  $\beta$  ocorrem apenas algumas vezes, não sendo possível atribuir probabilidades estatisticamente confiáveis para cada conformação. Medidas calorimétricas da ligação do Triac a ambas as isoformas também seriam um complemento importante para este trabalho.

Algumas outras evidências das simulações fortalecem o argumento entrópico. Sabe-se que a mutação S277N praticamente reverte a seletividade. A energia de interação do ligante com estes resíduos é muito similar em ambas as isoformas ( $-17$  kcal mol $^{-1}$ ), mostrando que a interação direta do Triac com este resíduo não pode ser responsável pela seletividade.

Estes efeitos não são observados para o T3. O Triac não possui a amina e tem uma menor cadeia carboxílica. Esta cadeia menor dificulta a interação do carboxilato com as argininas, favorecendo a entrada de água na estrutura do TR $\beta$ . No  $\alpha$  a interação com a Arg266 ainda é favorável devido à menor capacidade de penetração da água na cavidade, mas esta interação tem um custo entrópico.

O estudo da seletividade de ligantes em receptores nucleares tem se baseado, historicamente, na análise das estruturas cristalográficas. Esta é a primeira evidência de que um mecanismo entrópico pode ser responsável pela seletividade de ligantes nos receptores do hormônio tireoidiano, e também nos receptores nucleares em geral. Este resultado pode fornecer uma nova perspectiva de análise dos dados estruturais, e funcionais, existentes para toda a superfamília.

## 5.2 A seletividade do ligante GC-1

O GC-1 (ver Figura 2.6), como foi descrito no Capítulo 5, se liga à isoforma  $\beta$  dos receptores do hormônio tireoidiano com uma afinidade 10 vezes maior que em relação à isoforma  $\alpha$ . Além disso, possui uma afinidade comparável à do T3. Foi o primeiro ligante com grande potencial farmacológico desenvolvido para a ativação seletiva do TR $\beta$  e, desta forma, têm recebido grande atenção [52, 55, 65]. Resultados encorajadores foram obtidos em vários testes *in-vivo* [56, 57, 109–112]. Estes testes mostraram que o GC-1 diminui as taxas de colesterol sem afetar os

tecidos cardíacos de forma importante, exatamente como esperado de um ligante  $\beta$ -seletivo. Além disso, o GC-1 também diminui as concentrações de triglicérides no plasma sanguíneo, e reduz a gordura corporal sem induzir a perda de tecido muscular.

O GC-1 tem servido como um modelo estrutural para o desenvolvimento de outros ligantes [64, 65, 113]. Desta forma, o estudo das razões estruturais da seletividade deste ligante é de grande importância para o desenvolvimento de novas moléculas com valor farmacológico.

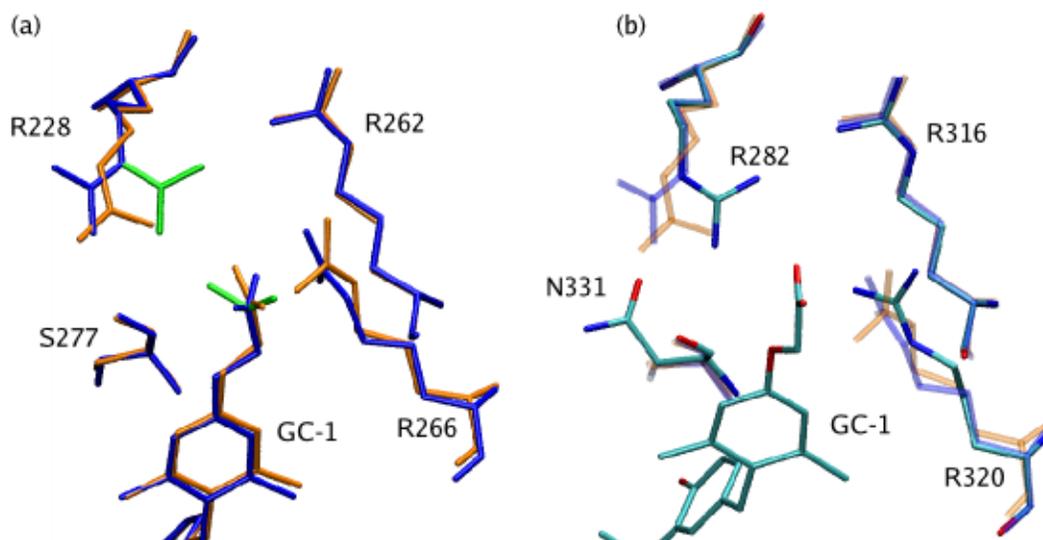
Neste estudo, uma interpretação estrutural para a seletividade do ligante GC-1 é feita com base em recentes estruturas cristalográficas e em simulações de dinâmica molecular.

### 5.2.1 Modos de ligação do GC-1

Na Figura 5.8 vemos os modos de ligação do GC-1 nas estruturas cristalográficas do TR $\alpha$  e do TR $\beta$  [69]. As estruturas cristalográficas sugerem que no TR $\alpha$  a Arg228 possui uma variabilidade conformacional que não está presente no TR $\beta$ . Na Figura 5.8, vemos que três conformações diferentes deste resíduo são encontradas no TR $\alpha$ . Duas delas correspondem a conformações distintas encontradas em um mesmo cristal (verde e azul) e a terceira corresponde a uma conformação encontrada em um grupo cristalino diferente do TR $\alpha$  (dados não publicados, fornecidos pelo Prof. Ricardo Aparício). Em uma destas conformações, a Arg228 interage fortemente com o carboxilato do GC-1 (em verde), enquanto que nas outras este resíduo está mais afastado do ligante.

Na única conformação do GC-1 associado ao TR $\beta$  observada, a interação entre a Arg282 e o carboxilato é direta. As conformações das Arg228 e 282 que resultam em uma interação direta com o carboxilato do ligante serão chamadas de conformações *produtivas*. As outras conformações encontradas no TR $\alpha$  serão chamadas *não-produtivas*.

As estruturas cristalográficas sugerem que as variações conformacionais da Arg228 no TR $\alpha$  podem estar relacionadas com a  $\beta$ -seletividade do GC-1. De forma simplificada, poderíamos deduzir que, no TR $\alpha$  conformações menos favoráveis do ponto de vista energético (as não-produtivas) estão presentes e, por isso, a afini-



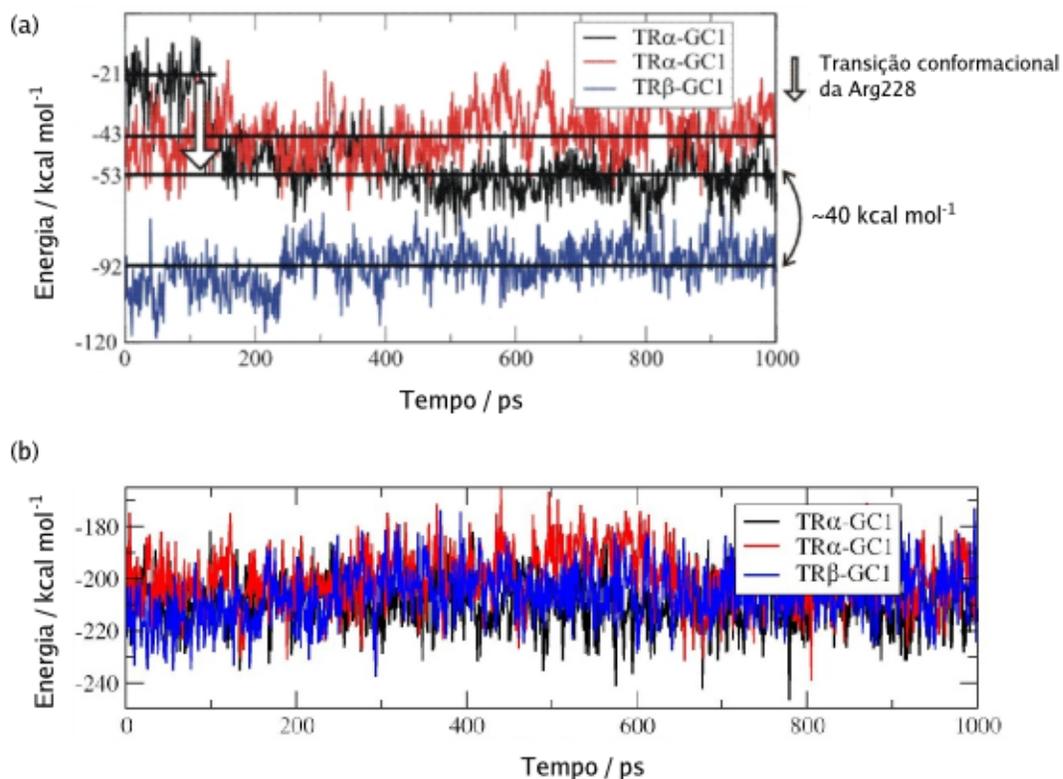
**Figura 5.8.** Modos de ligação encontrados em estruturas cristalográficas do GC-1 ligado ao (a) TR $\alpha$  e (b) TR $\beta$  (as conformações encontradas no TR $\alpha$ , transparentes, estão sobrepostas). Três conformações distintas são observada para a Arg228 no TR $\alpha$ . No TR $\beta$  apenas uma conformação da Arg282 é observada, e corresponde à conformação do TR $\alpha$  na qual a interação do GC-1 com a Arg228 é mais favorável.

dade do GC-1 em relação a esta isoforma é menor. Assim como no caso do Triac, é interessante calcular as energias de interação do GC-1 com o LBD e com todo o ambiente a partir de simulações de dinâmica molecular.

### 5.2.2 Energias de interação

Simulações do GC-1 associado aos LBDs foram feitas a partir das conformações produtivas e não-produtivas do TR $\alpha$  e da conformação produtiva encontrada no TR $\beta$ . As mesmas condições de simulação usadas para os estudos da dissociação foram usadas, mas simulações convencionais de 1 ns foram feitas para cada caso. Uma camada de 15Å de água e um íon para cada resíduo carregado da proteína foram adicionados.

A Figura 5.9(a) mostra as energias de interação do GC-1 com o LBD em cada simulação. As curvas preta e vermelha indicam as energias de interação do ligante

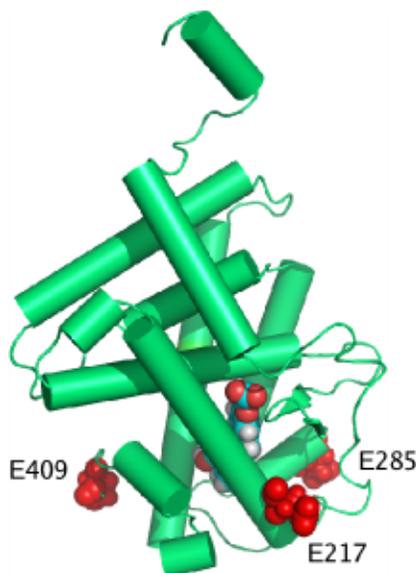


**Figura 5.9.** Energias de interação do GC-1 (a) com o LBD e (b) com todo o ambiente. A diferenças das interações do GC-1 com o LBD nas isoformas é compensada pelas interações do ligante com a água e com os íons.

com o LBD nas simulações do TR $\alpha$  partindo das conformações não-produtiva e produtiva da Arg228, respectivamente. Por volta de 130 ps de simulação uma transição que leva a Arg228 da conformação não-produtiva para a produtiva foi observada. Esta transição envolve uma variação na energia de interação do GC-1 com o LBD da ordem de 30 kcal mol<sup>-1</sup>. Além de sugerir que a conformação produtiva é, de fato, entalpicamente favorável à ligação do GC-1, a observação desta transição ainda reforça o caráter dinâmico da cadeia lateral deste resíduo.

No caso do GC-1, todas as componentes entálpicas das interações diretas do LBD com o ligante favorecem sua associação com a isoforma  $\beta$ . Aproximadamente 30 kcal mol<sup>-1</sup> estão relacionadas com as conformações da Arg228, mas uma diferença de 40 kcal mol<sup>-1</sup> ainda resta. Uma análise sistemática de todas as interações

do GC-1 com os LBDs mostrou que esta diferença de  $40 \text{ kcal mol}^{-1}$  está associada à repulsão eletrostática do ligante a resíduos que são negativamente carregados. Os seguintes resíduos apresentam interações significativamente diferentes entre as isoformas  $\alpha$  e  $\beta$  ( $\text{TR}\alpha/\text{TR}\beta$ ): E217/H271, E285/G339, E409/-. Como vemos, os resíduos, negativamente carregados na isoforma  $\alpha$ , correspondem a resíduos neutros (ou a nenhum resíduo) na isoforma  $\beta$ . Como o GC-1 é negativamente carregado, a repulsão eletrostática entre seu carboxilato e estes aminoácidos explica a diferença de  $40 \text{ kcal mol}^{-1}$  restante entre as duas isoformas. Esta observação é surpreendente porque estes resíduos não estão próximos do sítio ativo. Como mostra a Figura 5.10, nenhum destes resíduos interage diretamente com o ligante no sítio ativo. Ainda mais, são resíduos na superfície da proteína. Este efeito é, portanto, resultante de interações eletrostáticas de longo alcance.



**Figura 5.10.** Posição dos resíduos negativamente carregados no  $\text{TR}\alpha$  que são responsáveis por parte da diferença de energia de interação do GC-1 com os LBDs. Estes resíduos estão relativamente distantes do sítio de ligação.

É evidente, no entanto, que a presença dos íons não pode ser desprezada para o cálculo de uma interação eletrostática de longo alcance. Assim, da mesma forma como foi feito para o Triac, calculamos as energias de interação do GC-1 com todo o ambiente nestas simulações, de forma que as contribuições das águas e dos íons

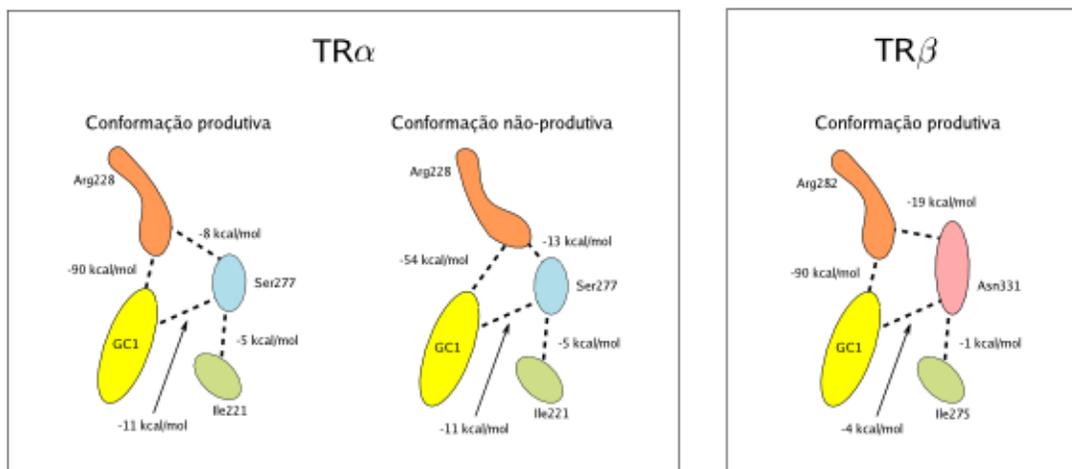
também fossem consideradas.

Assim como no caso do Triac, a inclusão das águas e dos íons no cálculo da energia reduz drasticamente as diferenças entre as energias de interação do GC-1, como mostra a Figura 5.9(b). Mesmo a variação da energia associada à transição entre conformações da Arg228 praticamente desaparece, o que reflete o fato de que esta interação foi substituída pela interação com uma molécula de água. Assim, apesar de que as interações do GC-1 com os LBDs fornecem uma base entálpica para a sua seletividade em relação à isoforma  $\beta$ , estas interações diretas ligante-LBD não são uma medida direta da afinidade do ligante. No caso do GC-1, a diferença de 40 kcal mol<sup>-1</sup> observada na Figura 5.9(a) é compensada por interações com moléculas de água (favoráveis no TR $\alpha$  em  $\sim$ 18 kcal mol<sup>-1</sup>) e pela interação do ligante com os contra-íons na solução (favoráveis ao TR $\alpha$  em  $\sim$ 23 kcal mol<sup>-1</sup>). O fato de que os contra-íons são relevantes para este tipo de interação sugere que as medidas de afinidade devem ser realizadas em condições controladas de força iônica. Mutações sítio-dirigidas nos resíduos negativamente carregados estão sendo feitas pelo grupo do Prof. Paul Webb (Universidade da Califórnia em São Francisco). O objetivo é verificar experimentalmente se estas interações de longo alcance podem, de fato, influenciar na afinidade dos ligantes. Os experimentos, no entanto, estão sujeitos a dificuldades técnicas que têm impedido uma avaliação clara do fenômeno. Este mecanismo pode explicar, em parte, porque quase todos os ligantes  $\beta$ -seletivos conhecidos são negativamente carregados [64, 65].

Diferentemente do Triac, as interações diretas do ligante com o LBD estão de acordo com a seletividade observada. Isto nos leva a crer que o mecanismo da seletividade é, neste caso, entálpico. O efeito pode ser muito menor do que as interações diretas ligante-LBD sugerem porque o ambiente novamente afeta fortemente estas interações. Não há uma diferença significativa de mobilidade do ligante entre as duas estruturas, de acordo com as simulações.

### 5.2.3 Serina 277 vs. Asparagina 331

Ainda assim, resta explicar porque a conformação produtiva é mais favorável no TR $\beta$ . Uma explicação para esta diferença foi obtida pela análise das energias de interação entre os resíduos na cavidade de ligação e suas correlações com as



**Figura 5.11.** Energias de interação associadas aos modos de ligação do GC-1, obtidas em simulações de dinâmica molecular. A conformação produtiva do TR $\beta$  é estabilizada pela interação da Arg282 com a Asn331, o que não ocorre na estrutura do TR $\alpha$ .

estruturas cristalográficas.

A Figura 5.11 mostra de forma esquemática as principais interações envolvidas na região hidrofílica do sítio ativo. As interações com resíduos que são idênticas nas duas isoformas não estão representadas (por exemplo, as interações com as argininas 262/316 e 316/320). No TR $\alpha$  as conformações produtiva e não-produtiva foram consideradas separadamente. Na conformação produtiva a Arg228 interage fortemente com o carboxilato do GC-1 ( $-90 \text{ kcal mol}^{-1}$ ). Já na conformação não-produtiva esta interação é de  $-54 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Em ambas as conformações o GC-1 forma uma ligação de hidrogênio com a Ser277 através do éter da cadeia carboxílica (ver Figura 2.6). Na conformação produtiva a Arg228 possui uma interação moderada com a Ser277 ( $-8 \text{ kcal mol}^{-1}$ ), que aumenta ligeiramente na conformação não-produtiva ( $-13 \text{ kcal mol}^{-1}$ ).

Na estrutura do TR $\beta$ , por sua vez, a Arg282 encontra-se na conformação produtiva somente. Nesta conformação ela interage fortemente com o carboxilato do GC-1 ( $-90 \text{ kcal mol}^{-1}$ ). A interação do GC-1 com a Asn331 é fraca, não havendo uma ligação de hidrogênio como observado entre o ligante e a correspondente Ser277. No entanto, a Arg282 interage fortemente com a Asn331 ( $-19 \text{ kcal mol}^{-1}$ ).

Desta forma, duas diferenças fundamentais parecem existir entre os modos de ligação. Em primeiro lugar, o GC-1 forma uma ligação de hidrogênio com a Ser277 no TR $\alpha$ , e não forma a interação correspondente com a Asn331 no TR $\beta$ . Esta diferença também é observada de forma clara nas estruturas cristalográficas. Esta interação deveria, aparentemente, favorecer a ligação do GC-1 com a isoforma  $\alpha$ . Experimentalmente isto não é observado. Estudos da afinidade do GC-1 e de seu análogo que não possui o oxigênio do éter (que forma esta ligação de hidrogênio) mostram que a remoção do oxigênio *não* afeta a afinidade do GC-1 em relação ao TR $\alpha$ , mas diminui a afinidade do ligante em relação ao TR $\beta$  [65]. Do ponto de vista das estruturas cristalográficas e das simulações isto não pode ser explicado. O aumento da hidrofobicidade desta região dos ligantes, no entanto, costuma diminuir suas afinidades, como ocorre com a adição da amina no T3 ou no DIMIT [49, 65]. Isto provavelmente ocorre porque a adição de grupos hidrofílicos favorece a dissociação ao longo do Caminho III, discutido no Capítulo 4. É possível que a importância do oxigênio do éter seja maior pelo seu efeito sobre a distribuição eletrônica do ligante como um todo do que pelas interações locais no sítio ativo. Este tipo de análise ainda precisa ser feito, mas outros resultados experimentais apontam para sua importância. Por exemplo, o oxigênio que forma a ponte entre os anéis aromáticos do T3 (ver Figura 2.1) tem um efeito significativo sobre a afinidade dos ligantes [65], apesar de estar envolto por um ambiente totalmente hidrofóbico na cavidade de ligação.

No entanto, sabe-se que a troca dos aminoácidos Ser277 e Asn331 por uma asparagina e por uma serina, respectivamente, reverte a seletividade do GC-1 [52]. Isto é, se o resíduo Ser277 é substituído por uma asparagina no TR $\alpha$ , a afinidade passa a ser semelhante à afinidade do GC-1 pela isoforma  $\beta$ . A reversão ocorre de forma semelhante se o resíduo Asn331 no TR $\beta$  é substituído por uma serina. Como a interação direta do ligante com estes resíduos não é capaz de explicar este efeito, ele deve estar relacionado com a interação destes resíduos com a Arg228/282. De fato, no TR $\beta$  a cadeia lateral da Asn331 interage fortemente com a cadeia lateral da Arg282, favorecendo a conformação produtiva da arginina. No TR $\alpha$ , como a cadeia lateral da Ser277 é menor que a da asparagina, a Arg228 interage efetivamente *ou* com o carboxilato do ligante, *ou* com a Ser277. Além de favorecer a conformação produtiva por formar uma forte interação direta com a Arg282,

a Asn331 também dificulta a abertura do sítio ativo porque sua cadeia lateral ocupa a região que deve ser ocupada pela Arg282 na conformação não-produtiva. Desta forma, a conformação produtiva é favorecida diretamente pela interação das cadeias laterais, e também indiretamente pelo impedimento estéreo associado à maior cadeia da asparagina em relação à serina. O favorecimento da conformação produtiva no TR $\beta$  por este mecanismo parece ser a explicação mais razoável para a seletividade do ligante GC-1.

No caso do T3, novamente, a interação direta do ligante com os resíduos Ser277 e Asn331 faz com que os modos de ligação sejam muito distintos dos observados para o GC-1. Curiosamente, no caso do Triac o efeito da maior cadeia lateral da Asn331 em relação à Ser277 é o de aumentar a cavidade de ligação, permitindo a entrada de água. No Triac isto acaba sendo favorável porque a menor cadeia carboxílica do Triac dificulta sua interação direta com a Arg228, que é substituída pela interação com a Arg266 com um custo entrópico no TR $\alpha$ . O GC-1, que tem uma cadeia carboxílica com um carbono a mais que o Triac, interage diretamente com as argininas 228/282, sendo a estabilização desta interação o fator fundamental que explica sua seletividade.



## Capítulo 6

# Mecanismos de desnaturação

Neste capítulo, os mecanismos da desnaturação induzida pelo aumento da temperatura são estudados por simulações de dinâmica molecular, e os resultados são discutidos no contexto de novos resultados experimentais. Mostraremos que a desnaturação se inicia pela perda da estrutura secundária e dos contatos terciários nativos, mas conservando a compacidade da estrutura. Somente após uma perda significativa da estrutura secundária ocorre a expansão do LBD. Os elementos de estrutura mais estáveis são as hélices internas da proteína. Isto sugere um mecanismo de enovelamento que se inicia pelo colapso hidrofóbico da estrutura, seguido da formação das hélices internas. Estas, por sua vez, podem servir de modelos estruturais para uma formação rápida das hélices mais externas. O papel do ligante na estabilização da estrutura também será discutido.

### 6.1 Simulações de desnaturação

A descrição dos mecanismos de desnaturação de qualquer proteína é um grande desafio. A desnaturação é um processo intrinsecamente de não-equilíbrio, de forma que os mecanismos e os intermediários envolvidos não são facilmente acessíveis por métodos experimentais capazes de obter informações com resolução molecular. Além disso, a cinética do desenovelamento de proteínas estáveis costuma ser muito lenta para que simulações de dinâmica molecular convencionais sejam capazes de representá-la de forma realista. O desenovelamento ocorre normalmente em microssegundos, ou até segundos, mesmo em temperaturas ou concentrações de agentes químicos desnaturantes muito acima daquelas dos meios fisiológicos [114, 115]. Do

ponto de vista computacional, o estudo da desnaturação do LBD dos receptores nucleares é um desafio ainda maior, uma vez que estas são proteínas compactas e estáveis em temperaturas bastante acima das temperaturas fisiológicas.

Apesar da escala de tempo dos processos de desnaturação, vários estudos computacionais têm fornecido informações relevantes a respeito dos mecanismos envolvidos [114, 116]. Para que a desnaturação seja observada em uma escala de tempo acessível às simulações de dinâmica molecular (atualmente algumas dezenas ou centenas de nano-segundos), é necessário estudar a desnaturação em temperaturas, ou concentrações de desnaturantes químicos, muito acima daquelas necessárias para observar a desnaturação experimentalmente [114]. No entanto, as simulações têm demonstrado que os mecanismos observados em temperaturas altas não são qualitativamente diferentes dos mecanismos observados em temperaturas menores, apenas as taxas de desenovelamento são alteradas [114, 116]. Algumas poucas simulações de centenas de nanosegundos, realizadas usando condições termodinâmicas realistas, têm validado os mecanismos obtidos por simulações obtidas em condições extremas [115, 117, 118].

A maior parte dos estudos da desnaturação de proteínas usando simulações de dinâmica molecular mostraram um mecanismo de desnaturação no qual o primeiro estado de transição consiste em uma estrutura menos compacta, na qual a maior parte da estrutura secundária ainda está preservada. Estas estruturas observadas possuem desvios relativamente pequenos em relação à estrutura nativa, mas possuem um núcleo hidrofóbico expandido [114]. O reconhecimento do estado de transição se dá pela realização de duas simulações: uma simulação partindo de um estado inicial imediatamente posterior ao estado de transição, que evolui para uma estrutura fundamentalmente desnaturada. A segunda simulação parte de uma estrutura imediatamente anterior ao suposto estado de transição e deve, desta forma, evoluir para a estrutura nativa [114, 119]. Um estudo dos mecanismos de enovelamento de pequenas proteínas formadas por  $\alpha$ -hélices mostrou, também, que a estrutura secundária forma-se antes da estrutura terciária. Observou-se que a estrutura secundária formava-se antes do colapso hidrofóbico. Apenas em uma segunda etapa do enovelamento a estrutura colapsa levando à estrutura nativa [120]. Para outras proteínas, por outro lado, foi observado experimentalmente que o colapso hidrofóbico pode preceder a formação da estrutura secundária [121].

Praticamente todos estes estudos foram feitos sobre proteínas pequenas (geralmente com menos de 150 resíduos) e que possuem cinéticas rápidas de enovelamento e desnaturação [114]. Isto aumenta o desafio envolvido na obtenção de uma descrição molecular dos mecanismos de desnaturação dos LBDs dos receptores nucleares, uma vez que estas são proteínas de cerca de 260 resíduos. Além disso, os LBDs possuem algumas características que diferem da maioria das proteínas que foram previamente estudadas: há elementos de estrutura secundária nos LBDs que estão totalmente envolvidos pelo corpo da proteína e, portanto, não possuem interações diretas com o solvente na estrutura nativa. Outras proteínas estudadas por simulações de dinâmica molecular como a Barnase [122], a BPTI [123], a Engrailed Homeodomain [115], o subdomínio da Villin Headpiece [117] e outras [114], não possuem essa característica. Além disso, nenhuma delas liga-se a moléculas pequenas, como os hormônios.

O estudo dos mecanismos de desnaturação dos LBDs dos receptores nucleares é interessante por várias razões: Em primeiro lugar, o conhecimento destes mecanismos pode permitir a identificação de resíduos que são particularmente importantes para a estabilidade e para os processos de enovelamento destas proteínas. Existem centenas de mutações associadas a doenças humanas em LBDs que reconhecidamente afetam a estabilidade ou função do receptor, mas em muitos casos as razões estruturais por trás do defeito não são bem conhecidas. É provável que várias destas mutações envolvam resíduos particularmente importantes para a estabilidade ou para o enovelamento do LBD. Em segundo lugar, a maior parte dos estudos dos mecanismos de desnaturação estudados até hoje são de proteínas que não se ligam a pequenas moléculas. Neste trabalho mostraremos que os ligantes afetam fortemente a desnaturação dos LBDs e as simulações permitem uma interpretação mecanística deste fenômeno. Além disso, este é o primeiro estudo com resolução molecular dos mecanismos de desnaturação de receptor nucleares, e parte dos mecanismos observados podem ser gerais para toda a superfamília.

Em primeiro lugar, apresentaremos os resultados experimentais obtidos pelo grupo do Prof. Polikarpov sobre a desnaturação dos LBDs das isoformas do TR ligadas ao Triac e sem ligante. Discutiremos como estes experimentos implicam em um certo tipo de mecanismo, diferente do que é geralmente observado. Em seguida, apresentaremos os resultados das simulações de dinâmica molecular que sustentam

as conclusões obtidas pelo experimento e revelam detalhes dos mecanismos de desnaturação observados.

## 6.2 Metodologia

### 6.2.1 Dicroísmo Circular

Os experimentos de desnaturação por temperatura foram realizados pelo grupo do Prof. Polikarpov. As proteínas foram obtidas como descrito em outros trabalhos [22, 69]. As medidas de dicroísmo circular em diferentes temperaturas foram feitas a 222 nm, comprimento de onda no qual a absorção é proporcional ao conteúdo de  $\alpha$ -hélices da proteína [25]. O aquecimento foi feito de 293 até 363K e os dados foram coletados a cada 2K. A fração desnaturada foi calculada a partir das elipticidades,  $\theta$ , usando

$$\alpha = \frac{\theta_{folded} - \theta_{obs}}{\theta_{folded} - \theta_{un,folded}}$$

em que  $\theta_{folded}$  é a elipticidade média no intervalo 293-300K, em que a proteína não apresentou sinais de desnaturação. A temperatura de transição vítrea aparente,  $T_M$  foi obtida ajustando os dados de dicroísmo circular pela equação de van't Hoff, como descrito em [25].

### 6.2.2 Simulações de Dinâmica Molecular

A realização de um estudo de dinâmica molecular dos mecanismos de desnaturação do LBD dos receptores nucleares é um desafio interessante. A proteína contém cerca de 4500 átomos e, para obter uma solvatação apropriada que não resulte em efeitos de borda espúrios, cerca de 18500 moléculas de água são necessárias. Além do LBD, do ligante e das águas, o sistema ainda possui um íon para cada resíduo carregado na proteína, de forma que o sistema fique eletricamente neutro. Os sistemas simulados, completos, possuem cerca de 60 mil átomos. Foram necessários 1,6 dias por nanosegundo de simulação usando em média 12 nós do nosso cluster de Opterons 242 rodando NAMD (em Linux). O tempo total de simulação foi de 115 dias, aproximadamente. As simulações foram realizadas da seguinte forma:

De acordo com estudos anteriores da desnaturação de outras proteínas, foram realizadas simulações de 2 ns do LBD do TR $\alpha$  ligado ao Triac a 450, 500, 650, 700

e 800K. Estas simulações confirmaram que o LBD é bastante estável nas escalas de tempo acessíveis para as simulações: nenhum sinal visível de desnaturação foi observado nas simulações 450 e 500K. A desnaturação começou a ocorrer a 650K e a 700K. A 800K a proteína atingiu um estado fundamentalmente desnaturado em 2 ns de simulação. Os estudos de desnaturação de outras proteínas foram feitos a 450 ou 500K, mas geralmente para proteínas menos estáveis e menores [114]. Para que pudéssemos observar a desnaturação em uma escala de tempo acessível a nossa capacidade computacional, seriam necessárias taxas de desnaturação mais rápidas. Ou seja, precisaríamos atingir temperaturas superiores a 650K para obter um processo completo de desnaturação. Para não comprometer totalmente a percepção dos eventos moleculares envolvidos e a importância das diferentes partes da proteína no processo de desnaturação, decidimos simular a desnaturação aquecendo progressivamente o sistema (os experimentos também são de aquecimento, mas em uma escala de temperaturas diferente). O aquecimento foi feito de forma que as temperaturas necessárias para iniciar a desnaturação fossem atingidas prontamente, e que o aquecimento fosse mais lento à medida que a mobilidade do sistema aumenta e uma amostragem em um conformacional maior é necessária. Assim, iniciamos as simulações a 298,15K e a temperatura foi reescalada a cada 1,5 ps de acordo com a equação  $T(K) = 298,15 + 5t^{1/2}$ , em que  $t$  é o tempo, em unidades de passos de simulação. Nossa intenção foi perceber as suscetibilidades de diferentes partes da proteína à desnaturação e, ao mesmo tempo, explorar de forma parcial o *ensemble* de estruturas desnaturadas.

Quatro simulações foram realizadas com este protocolo: Simulações das isoformas  $\alpha$  e  $\beta$  dos LBDs dos receptores do hormônio tireoidiano na presença e na ausência do Triac. As simulações das estruturas *apo* foram realizadas a partir das estruturas com ligante, removendo o ligante. As estruturas sem ligante foram submetidas a simulações de 2 ns em condições ambiente de temperatura para que a estrutura sofresse algum grau de relaxação. Isto foi necessário porque não há estruturas dos receptores dos hormônios tireoidianos, sem ligante, disponíveis.

As configurações iniciais foram construídas com o pacote Packmol [76] e continham o LBD, um contra-íon para cada aminoácido carregado da proteína, e mais de 18 mil moléculas de água. Estes cerca de 60 mil átomos foram empacotados em uma caixa cúbica com 86 Å de lado. Todas as simulações foram feitas com o pro-

grama NAMD [80] com condições periódicas de contorno e parâmetros CHARMM [124]. Os parâmetros para os ligantes foram obtidos como descrito nos capítulos anteriores e nos trabalhos [70, 88]. Foi utilizado um passo de tempo de 1,5 fs, todas as ligações entre átomos de hidrogênio e átomos pesados foram mantidas rígidas, e o raio de corte para as interações de van der Waals e eletrostáticas foi 14 Å com uma suavização começando em 12 Å. Todos os sistemas foram termalizados a 298,15K mantendo todos os átomos da proteína rígidos por 100 ps. Em seguida, mais 100 ps de termalização foram realizados mantendo apenas os átomos da cadeia principal fixos e, por fim 100 ps de termalização sem nenhuma restrição foram realizados.

### Parâmetros estudados

A caracterização da desnaturação a partir das simulações foi feita usando os seguintes parâmetros: 1) Estrutura secundária: Foi calculada usando o programa STRIDE [125], para cada passo da simulação individualmente. O conteúdo total de  $\alpha$ -hélices foi calculado a partir da estrutura secundária de cada resíduo. 2) Compacidade: A compacidade da estrutura ao redor de cada carbono- $\alpha$  foi calculada através do parâmetro

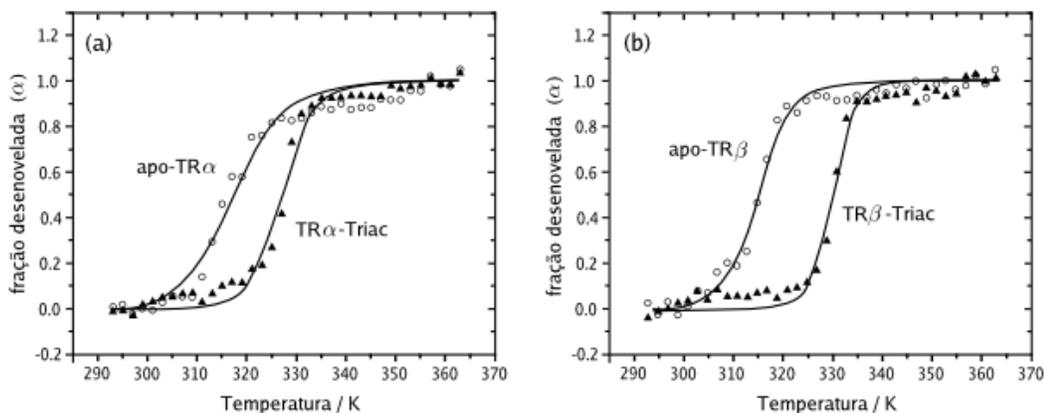
$$C_i = \sum_{j=1, |i-j|>4}^{N_{C\alpha}} \frac{1}{1 + d_{ij}^2}$$

em que  $d_{ij}$  é a distância entre dois  $C\alpha$ . Note que a soma é feita apenas sobre átomos que estão distantes mais que quatro átomos na seqüência, já que a distância entre estes átomos não é fundamentalmente dependente da compacidade. Este parâmetro é grande se há muitos átomos próximos do átomo de referência e, portanto, a estrutura é localmente compacta. Para uma avaliação da compacidade da estrutura como um todo, a soma da compacidade individual de todos os átomos foi obtida. 3) Desvio Quadrático Médio: foi calculado em relação à estrutura nativa. Para isso, a estrutura da proteína em cada passo da simulação foi alinhada com a estrutura inicial usando o algoritmo descrito em [126]. 4) Contatos nativos: um par de resíduos foi considerado *em contato* se a distância entre seus carbonos- $\alpha$  era menor que 7Å. A lista de contatos da estrutura nativa foi assim obtida, permitindo o cálculo da porcentagem destes contatos em cada passo da simulação. Este indicador é diferente da compacidade porque é sensível à reordenação interna da

estrutura. Ou seja, muito contatos nativos podem se perder e a estrutura pode continuar compacta. 6) Hidratação: foi calculada obtendo o número de moléculas de água em aproximadamente a primeira camada de solvatação em torno da proteína. Uma molécula de água foi considerada na primeira camada de solvatação se algum de seus átomos estava mais próximo que  $4\text{\AA}$  de algum átomo da proteína. Todos os parâmetros foram escalonados entre 0 e 1 de acordo com os valores máximos e mínimos obtidos de forma que pudessem ser comparados qualitativamente.

### 6.3 Resultados Experimentais

As Figuras 6.1(a) e (b) mostram os resultados dos experimentos de desnaturação acompanhados por dicroísmo circular para ambas as isoformas do TR ligadas e dissociadas do ligante Triac.



**Figura 6.1.** Desnaturação dos LBDs dos receptores (a) TR $\alpha$  e (b) TR $\beta$ , com e sem ligante, induzidas por temperatura e acompanhadas por medidas de dicroísmo circular. O ligante estabiliza ambas as estruturas, o TR $\beta$  em maior extensão.

Como vimos, o Triac é um ligante  $\beta$ -seletivo. A ligação do Triac no TR $\alpha$  provoca uma estabilização da estrutura que aumenta a temperatura de desenovelamento em 9,5K. Por outro lado, para o TR $\beta$ , a associação do Triac causa um aumento na estabilidade de 15K, aproximadamente. A desnaturação continua ocorrendo de forma fundamentalmente cooperativa, uma vez que apenas uma transição é observada (não há intermediários no processo de desnaturação). Desta

forma, a desnaturação do LBD ocorre à mesma temperatura para todo o receptor, na presença ou na ausência do ligante. A maior estabilização provocada pelo Triac na estrutura do TR $\beta$  aparentemente reflete sua maior afinidade em relação a este receptor [51].

Para proteínas menores, formadas por  $\alpha$ -hélices, foi sugerido que os elementos de estrutura secundária deveriam ser mais estáveis que a compacidade da estrutura [120]. Desta forma, em um processo de enovelamento deveria existir um intermediário no qual a estrutura secundária está presente, mas o colapso da proteína ainda não ocorreu [120] (ou, na desnaturação, a expansão deve preceder a desnaturação das hélices [114]). Este não parece ser o caso dos TRs. Se a desnaturação da proteína ocorresse pela expansão da estrutura conservando a estrutura secundária, o ligante deveria deixar de exercer seu efeito estabilizador antes de que o sinal de dicroísmo circular fosse afetado. Assim, o forte efeito estabilizador do ligante na estrutura não poderia ser observado por esta técnica.

Ou seja, suponha que as hélices sejam significativamente mais estáveis que os contatos terciários que mantém a estrutura compacta. Neste caso, a desnaturação ocorreria primeiro pela ruptura destes contatos, acompanhada da expansão da estrutura. O ligante deveria se dissociar nesta etapa da desnaturação, ou ao menos suas interações com a proteína seriam fortemente afetadas. No entanto, nesta etapa o sinal de dicroísmo circular ainda não teria sido capaz de detectar a desnaturação, uma vez que a estrutura secundária ainda estaria conservada. Assim, o efeito estabilizador do ligante sobre a estrutura não poderia ter sido detectado.

A observação de que o ligante estabiliza fortemente a estrutura dos LBDs mostra que as estruturas secundária e terciária estão conservadas até o momento da desnaturação. No momento em que a desnaturação é observada, na presença do ligante, há duas possibilidades: ou o ligante deixou a proteína e a desnaturação passou a ser rápida porque a temperatura é bastante maior do que a temperatura necessária para a desnaturação da estrutura *apo*, ou a estrutura secundária está se desfazendo na presença do ligante. Em ambos os casos fica claro que a estrutura deve permanecer compacta até o limiar da perda da estrutura secundária. Portanto, as  $\alpha$ -hélices não são fundamentalmente mais estáveis que a compacidade no caso dos LBDs, como foi observado para outras proteínas [120]. Esta observação é ainda um pouco mais forte. O grau de conservação da estrutura terciária deve

ser bastante alto, uma vez que as interações do Triac com as isoformas  $\alpha$  e  $\beta$  são diferentes apenas por alguns detalhes da estrutura do sítio ativo (ver Capítulo 5). Assim, se o ligante exerce um papel distinto na estabilização das estruturas, a estrutura terciária deve estar bem preservada.

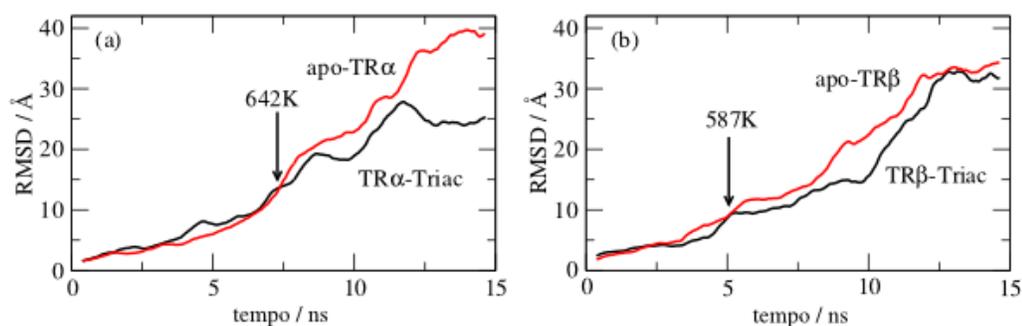
A ausência de intermediários na desnaturação dos LBDs com ligante é surpreendente. Ela implica em que o Triac estabiliza toda a proteína, independentemente de um elemento na estrutura formar ou não contatos diretos com ele. Observações similares foram feitas para o receptor do Estrógeno (ER) [25] e para os receptores ativados por proliferadores de peroxissomo (PPAR) [27].

As simulações vão mostrar que, de fato, a estrutura secundária não é mais estável que a compactidade da estrutura. A estrutura secundária se perde de forma simultânea à perda da estrutura terciária, mas o LBD continua sendo compacto. As simulações também sustentam a hipótese de que a desnaturação ocorre fundamentalmente antes da dissociação do ligante.

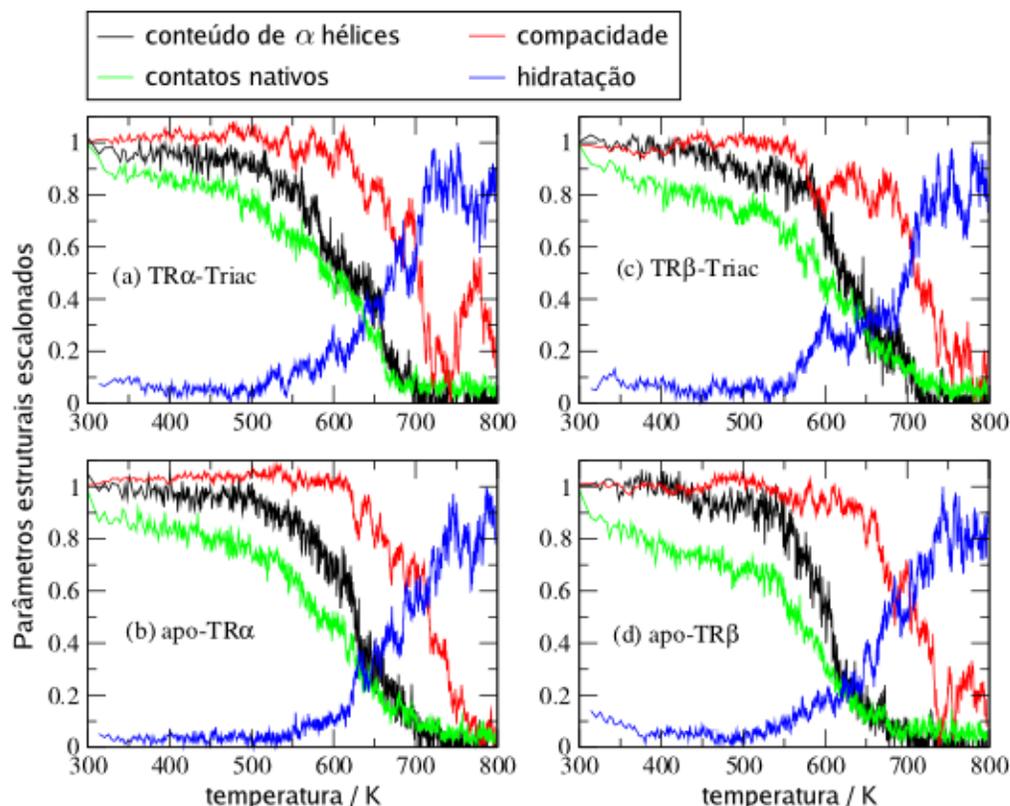
## 6.4 Simulações de dinâmica molecular

### 6.4.1 Visão global da desnaturação

O desvio quadrático médio (RMSD) dos carbonos- $\alpha$  dos receptores TR $\alpha$  e TR $\beta$  ligados ao Triac e sem ligante estão representados nas Figuras 6.2(a) e (b).



**Figura 6.2.** Desvios quadráticos médios em função do tempo de simulação nos processos de desnaturação das estruturas do (a) TR $\alpha$  e (b) TR $\beta$ , com e sem ligante. Os maiores desvios das estruturas sem ligante sugerem que as simulações captaram parte de seu efeito estabilizador.



**Figura 6.3.** Parâmetros estruturais da desnaturação. As  $\alpha$ -hélices e o os contatos nativos são perdidos antes da compacidade e do aumento da hidratação.

Como esperado, o RMSD aumenta com o tempo de simulação (a temperatura aumenta), para todos os modelos. O RMSD atinge um patamar aproximadamente constante em cerca de 12 ou 13 ns, indicando que as estruturas atingiram um estado completamente desnaturado (em torno de 750K). Após cerca de 5 ou 6 ns os RMSDs das estruturas *apo* ficam maiores que os RMSDs das estruturas com ligante, sugerindo que as simulações capturaram ao menos parte do efeito estabilizador do ligante sobre o LBD.

Os parâmetros de ordem usados para caracterizar a desnaturação estão representados na Figura 6.3. Os parâmetros usados foram o conteúdo de  $\alpha$ -hélices, a porcentagem de contatos nativos, a compacidade e o grau de hidratação (medida pelo número de moléculas de água na primeira camada de solvatação).

As primeiras etapas da desnaturação ocorrem após 500K, como indicado pelo

conteúdo de  $\alpha$ -hélices. Quando a temperatura atinge 650K a estrutura secundária está quase totalmente desnaturada. A perda dos contatos nativos e da estrutura secundária estão correlacionados, mas a fração de contatos nativos parece ser um limite inferior do conteúdo de  $\alpha$ -hélices. Isto indica que a mobilidade da proteína permite o rearranjo parcial das hélices na estrutura, ao mesmo tempo que as hélices permanecem estruturadas. À medida que a desnaturação da estrutura secundária continua, no entanto, a fração de  $\alpha$ -hélices e a de contatos nativos se assemelham cada vez mais.

Mais notável é que a perda da estrutura secundária (e dos contatos nativos) ocorre antes de que a estrutura perca sua compactidade. Em todas as simulações, o momento em que a compactidade ainda conserva 50% do valor da estrutura nativa, o conteúdo de  $\alpha$ -hélices já atingiu seu estado totalmente desnaturado. Finalmente, o grau de hidratação está fortemente correlacionado com a expansão da estrutura. A hidratação aumenta à medida que a proteína se expande e os resíduos mais internos ficam expostos ao solvente. Aparentemente, a hidratação se inicia ligeiramente antes da expansão da estrutura. Nas simulações de TR $\alpha$  e na simulação do TR $\beta$  sem ligante um aumento na hidratação em 600K é observado enquanto que a compactidade ainda não foi claramente afetada. Estas primeiras etapas da hidratação provavelmente envolvem resíduos que pertencem aos elementos de estrutura secundária que estão próximos do solvente e que já se desovelaram.

Várias outras proteínas foram estudadas usando simulações de dinâmica molecular. O mecanismo observado na maior parte dos casos envolvia primeiro a expansão da estrutura, seguida da desnaturação dos elementos de estrutura secundária [114]. Os mecanismos de enovelamento (supostamente o processo inverso da desnaturação) de proteínas formadas por  $\alpha$ -hélices também sugeriram que as hélices se formariam antes do colapso da estrutura [120]. No entanto, para a proteína Barstar, foi demonstrado experimentalmente que o colapso hidrofóbico precede a formação da estrutura secundária [121]. Os processos de desnaturação observados aqui para os LBDs dos TRs ocorrem primeiro pela perda da estrutura secundária. A expansão da estrutura ocorre apenas após esta desnaturação inicial das hélices. Desta forma, o mecanismo observado é mais coerente com o observado para a proteína Barstar.

Este resultado das simulações é coerente com os experimentos apresentados. Os

experimentos já haviam sugerido que para estas proteínas a estrutura secundária não poderia ser fundamentalmente mais estável que a compacidade, situação na qual o efeito estabilizador do ligante não poderia ser observado por dicroísmo circular. Se observarmos os resultados experimentais novamente, tendo em mente os resultados das simulações, veremos que antes da  $T_M$  há uma leve perda de estrutura secundária, que deve corresponder à desnaturação das hélices menos estáveis da estrutura. Este processo ocorre antes da dissociação do ligante e, portanto, antes da expansão da estrutura. Isto é o que se observa qualitativamente também nas simulações. Estas indicam que a estrutura terciária e secundária se perdem simultaneamente. A compacidade da estrutura, no entanto, é fundamentalmente preservada até temperaturas maiores.

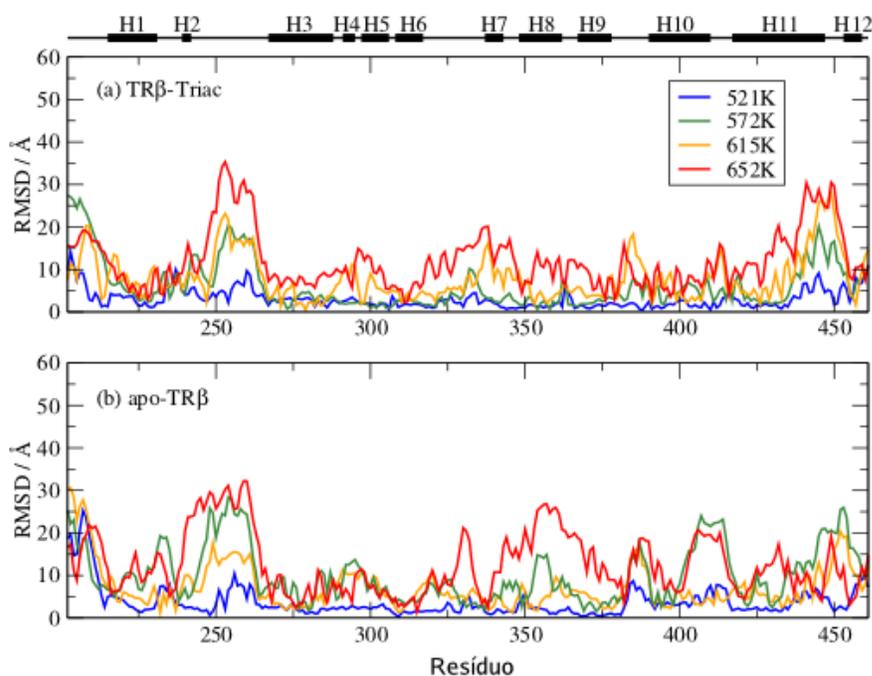
Desta forma, para os LBDs, grande parte da estrutura secundária é perdida antes da expansão do núcleo hidrofóbico da proteína. Esta expansão é acompanhada pela perda dos elementos de estrutura secundária mais estáveis, levando a um estado globular fundamentalmente desenovelado. O estado desnaturado expandido é formado principalmente por cadeias sem estrutura, e alguns poucos elementos residuais de estrutura secundária. Este modelo é diferente da maior parte dos processos de desnaturação estudados por dinâmica molecular. Estas diferenças se devem principalmente ao tamanho da proteína estudada e à hidrofobicidade do núcleo dos LBDs.

### 6.4.2 O papel do ligante na desnaturação

Como foi observado pelos parâmetros estruturais da Figura 6.3, os passos mais importantes da desnaturação ocorrem entre 500 e 650K. Desta forma, calculamos o RMSD por resíduo para quatro temperaturas neste intervalo, correspondendo a tempos de simulação de 3, 6, 7,5 e 9 ns.

Os RMSDs nestes instantes da simulação, para cada resíduo da estrutura do  $TR_\beta$  associado ao Triac estão representados na Figura 6.4(a). A 521K a maior parte da estrutura possui um RMSD menor que 10Å, e a estrutura é ainda similar à estrutura nativa. A desnaturação prossegue rapidamente e a 572K os resíduos da região N-terminal, próximos à H1, estão significativamente deslocados de suas posições iniciais. O mesmo ocorre com o loop entre as hélices 2 e 3 (o  $\Omega$ -loop),

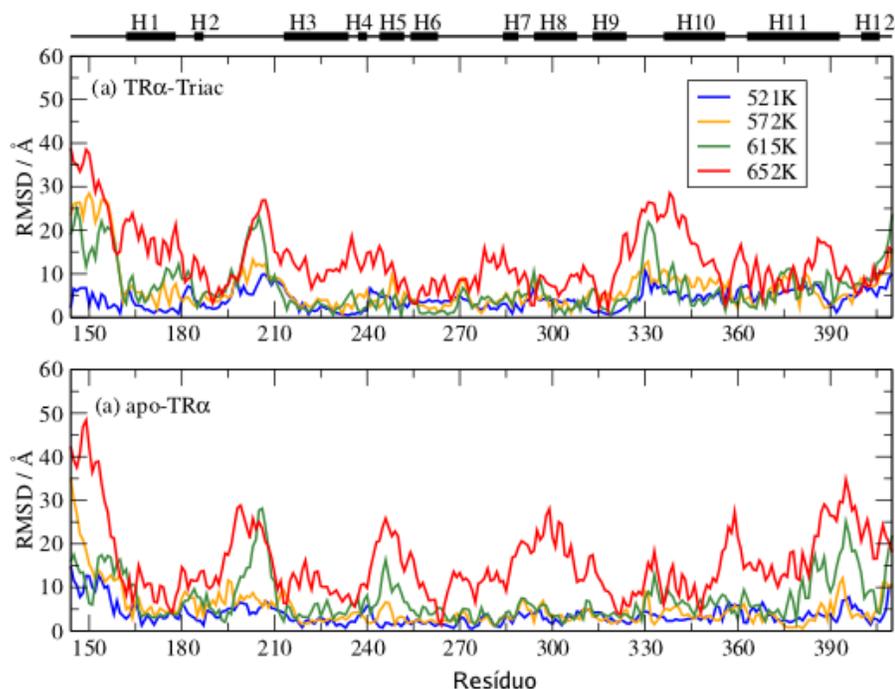
com alguns resíduos antes da H7 e entre as hélices 10 e 11. Um grande desvio pode ser observado na região C-terminal, em particular no final da H11 e na H12. Quando a temperatura atinge 615K alguns dos desvios se tornam mais importantes, particularmente os das hélices 4 e 5. O desvio da H7 fica mais aparente, os loops entre as hélices 9 e 10 e o loop entre as hélices 11 e 12 também são fortemente distorcidos. A 652K o  $\Omega$ -loop (entre as hélices 2 e 3) é muito móvel, a região que contém os loops entre as hélices 6 e 7 foi afetada e a mobilidade da hélice 11 se tornou um dos elementos importantes globalmente.



**Figura 6.4.** Desvio quadrático médio por resíduo da isoforma  $\beta$  do TR (a) ligado ao Triac e (b) sem ligante.

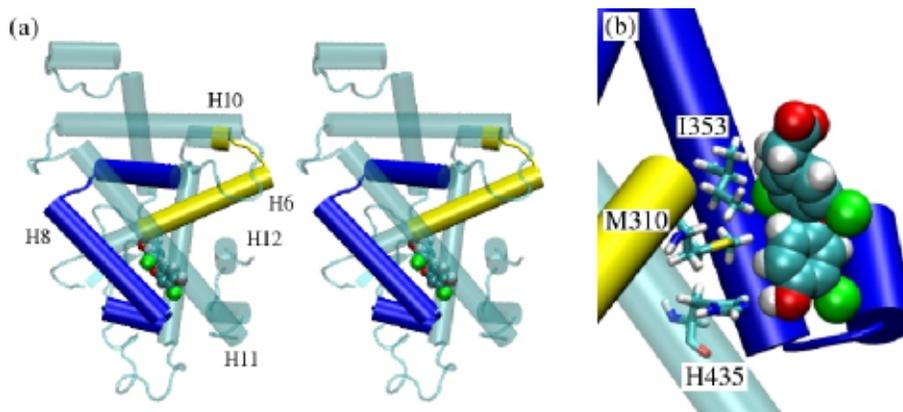
Na Figura 6.4(b) um gráfico similar está apresentado para o TR $\beta$  sem ligante. A diferença mais importante relativa à desnaturação do receptor ligado ao Triac é que o loop entre as hélices 6 e 7 não parece ser tão afetado como na estrutura *holo*, exceto por um pico de mobilidade entre os resíduos Glu325 e Ala335. No entanto, um significativo aumento na mobilidade é observado nas regiões que contém as hélices 7, 8 e 9 em relação à estrutura com ligante. O loop entre as hélices 10 e 11 parece ter sido desestabilizado na ausência do ligante, mas o loop entre as hélices

11 e 12 tem menores RMSDs nesta simulação que na *holo*. Os RMSDs maiores observados na Figura 6.2 para a estrutura sem ligante são, portanto, justificados pelo aumento da mobilidade principalmente dos resíduos das hélices 7 a 9.



**Figura 6.5.** Desvio quadrático médio por resíduo da isoforma  $\alpha$  do TR (a) ligado ao Triac e (b) sem ligante.

Os processos de desnaturação das estruturas *holo* e *apo* do TR $\alpha$  têm em comum com a desnaturação do TR $\beta$  os grandes desvios observados nas regiões N-terminal e no  $\Omega$ -loop entre as hélices 2 e 3, como mostram as Figuras 6.5(a) e (b). Em todos os modelos há um pico de mobilidade entre as hélices 9 e 10, que está relacionada com a grande mobilidade de toda hélice 10 na estrutura *holo*-TR $\alpha$  em 652K. O maior RMSD observado para o modelo *apo* em relação ao *holo* nas simulações de TR $\alpha$  (ver Figura 6.2(a)) parecem ser consequência da maior mobilidade das hélices 5 e 6. Estas hélices não são especialmente móveis em nenhuma das estruturas do TR $\beta$ . Além disso, uma maior mobilidade para a estrutura sem ligante é observada no TR $\alpha$  nas hélices 7, 8 e 9, que também foram importantes para explicar a maior mobilidade das estruturas *apo* no TR $\beta$ .



**Figura 6.6.** (a) Regiões estabilizadas pela presença do ligante em todas as estruturas (em azul) e no TR $\alpha$  (em amarelo). (b) Contatos do ligante com as hélices 6, 8 e 11 que podem explicar parte do efeito estabilizador do ligante na estrutura.

A Figura 6.6 mostra a estrutura do TR $\beta$  ligada ao Triac e destaca as regiões que aparentemente são estabilizadas pela ligação do Triac. Em azul vemos a região que inclui as hélices 7 a 9, que são estabilizadas pelo Triac em ambas as isoformas. Em amarelo, por sua vez, vemos as hélices 5 e 6, que possuem menores desvios na estrutura do TR $\alpha$  com ligante. A estabilização da hélice 8 nos permite sugerir um mecanismo pelo qual o ligante pode estabilizar os LBDs. Um passo importante para a desnaturação parece ser a abertura da interface entre as hélices 8 e 11, com a conseqüente exposição do sítio de ligação, hidrofóbico. O ligante interage tanto com a hélice 8 (com a Ile353 no TR $\beta$ ) quanto com a hélice 11 (formado a interação hidrofílica importante com a His435), como mostra a Figura 6.6(b). Desta forma, o ligante exerce um efeito estabilizador da interface entre estas duas hélices. Na ausência do ligante a hélice 8 tem maior mobilidade, o que resulta também em maiores mobilidades para as hélices 7 e 9.

A hélice 6 parece ser um dos elementos de estrutura secundária mais estáveis em todas as estruturas, mas o deslocamento da H5 resultou em uma maior mobilidade da H6 na estrutura do TR $\alpha$  sem ligante. Nesta região o ligante forma uma interação hidrofóbica com a Met310 (numeração do TR $\beta$ ), e a perda desta interação deve ser a razão pela qual a H6 tem maior mobilidade na estrutura sem ligante. No

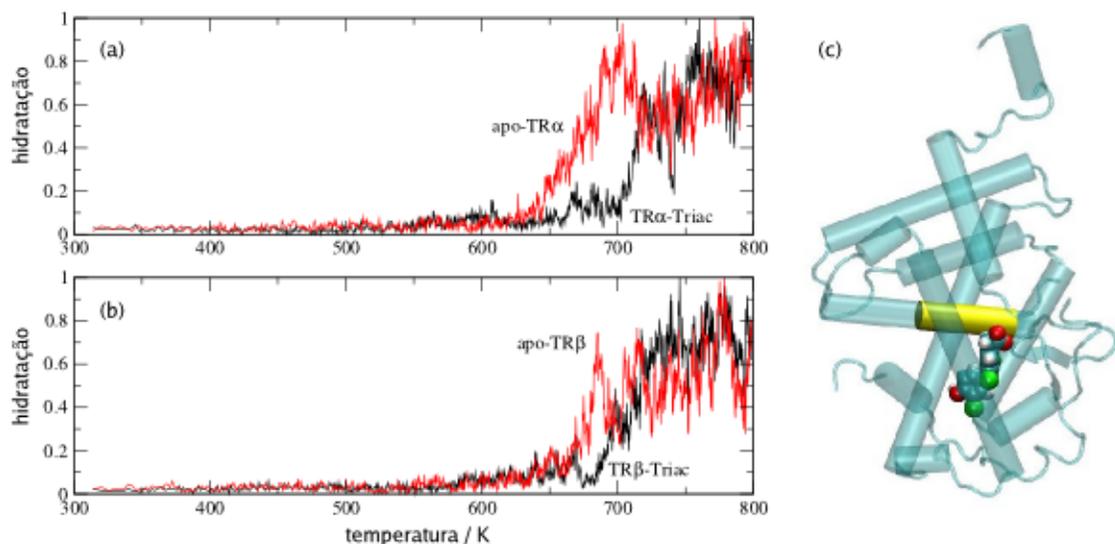
entanto, este efeito não foi observado para as estruturas do TR $\beta$ .

As razões pelas quais o ligante estabiliza o TR $\beta$  preferencialmente ao TR $\alpha$  não são claras. Os dados experimentais mostram que o TR $\alpha$ , na ausência do ligante, é ligeiramente mais estável que o TR $\beta$ . No entanto, a associação do ligante faz com que a  $T_M$  do TR $\beta$  se torne 15 graus maior do que a do TR $\alpha$ . Algumas regiões do TR $\beta$  possuem, de acordo com os fatores de temperatura dos modelos cristalográficos, maior mobilidade na estrutura do TR $\beta$  que na do TR $\alpha$ . Em particular, o  $\Omega$ -loop e a região entre as hélices 1 e 3 (contendo o grampo- $\beta$ ), têm essa característica [7, 52]. Alguns estudos a respeito da desnaturação mostraram que regiões de grande mobilidade funcionam como gatilhos para a desnaturação do restante da proteína [122, 123], de forma que a maior mobilidade da isoforma  $\beta$  pode explicar a razão pela qual ela é menos estável que a  $\alpha$  na ausência do ligante.

Nossa primeira hipótese a respeito dos mecanismos pelos quais o ligante estabiliza os LBDs está relacionado com as interações do ligante com as hélices 8 e 11. No TR $\alpha$ , esta interação é favorecida pelo forte empacotamento do  $\Omega$ -loop sobre a estrutura, que forma contato com as duas hélices. No TR $\beta$ , por outro lado, o  $\Omega$ -loop é mais móvel e desordenado, e aparentemente não faz interações fortes com as hélices 8 e 11. Desta forma, se o ligante tem a função de estabilizar a interface entre essas hélices, este efeito deve ser mais importante na estrutura  $\beta$  que na  $\alpha$ . De qualquer forma, este mecanismo ainda implicaria que a estabilidade da estrutura do TR $\alpha$  deveria ser, em termos absolutos, maior, mesmo na presença do ligante.

A abertura das hélices 8 e 11 e a grande mobilidade da região C-terminal do LBD pode fornecer novas pistas a respeito do papel do ligante na estabilização da estrutura. Como pode ser observado na Figura 6.7, o ligante protege a hélice 6 da solvatação, provavelmente bloqueando a entrada da água no sítio de ligação pelas aberturas formadas na separação das hélices 8, 11 e 12. A proteção do núcleo hidrofóbico da proteína também deve proporcionar uma maior estabilidade para ambas as isoformas de forma parecida.

A segunda região de grande mobilidade, de acordo com os fatores de temperatura dos modelos cristalográficos, se encontra entre as hélices 1 e 3, porém antes do  $\Omega$ -loop. Os diferentes modos de ligação do Triac em relação às isoformas  $\alpha$  e  $\beta$  devem resultar em um efeito mais importante sobre esta região do que sobre



**Figura 6.7.** O ligante blinda a hélice 6 do solvente no (a) TR $\alpha$  e no (b) TR $\beta$ . A hidratação das estruturas *apo* aumenta mais rapidamente do que a das estruturas com ligante. Os resíduos considerados em (a) e (b) estão em amarelo em (c).

qualquer outra região da proteína. Isto porque é próximo a ela que se encontra a substituição Asn277Ser, que é responsável pela seletividade do Triac em relação à isoforma  $\beta$ . Esta única mutação no sítio de ligação é responsável por afetar indiretamente a afinidade do ligante alterando a estrutura e a dinâmica da cavidade que contém sua extremidade hidrofílica (ver Capítulo 5 e [52]). A maior afinidade do Triac em relação à isoforma  $\beta$  parece estar relacionada com uma maior estabilidade termodinâmica da região do loop entre as hélices 1 e 2 e do grampo- $\beta$ . As simulações aqui apresentadas mostram um certo grau de estabilização promovida pela associação do Triac entre as hélices 1 e 2 no TR $\beta$  (ver Figuras 6.4(a) e (b)). No entanto, o mais notável é que a mobilidade da H1 é um dos passos importantes que levam à desnaturação em todos os casos. A estabilização da interação da H1 com o corpo da proteína promovida pela associação do ligante pode explicar porque o TR $\beta$  acaba por ter uma maior estabilidade como um todo.

Curiosamente, um estudo sobre a estabilidade do PPAR $\gamma$  mostrou que as interações da H1 com a H8 (H9 nos TRs) são críticas para a estabilidade do receptor

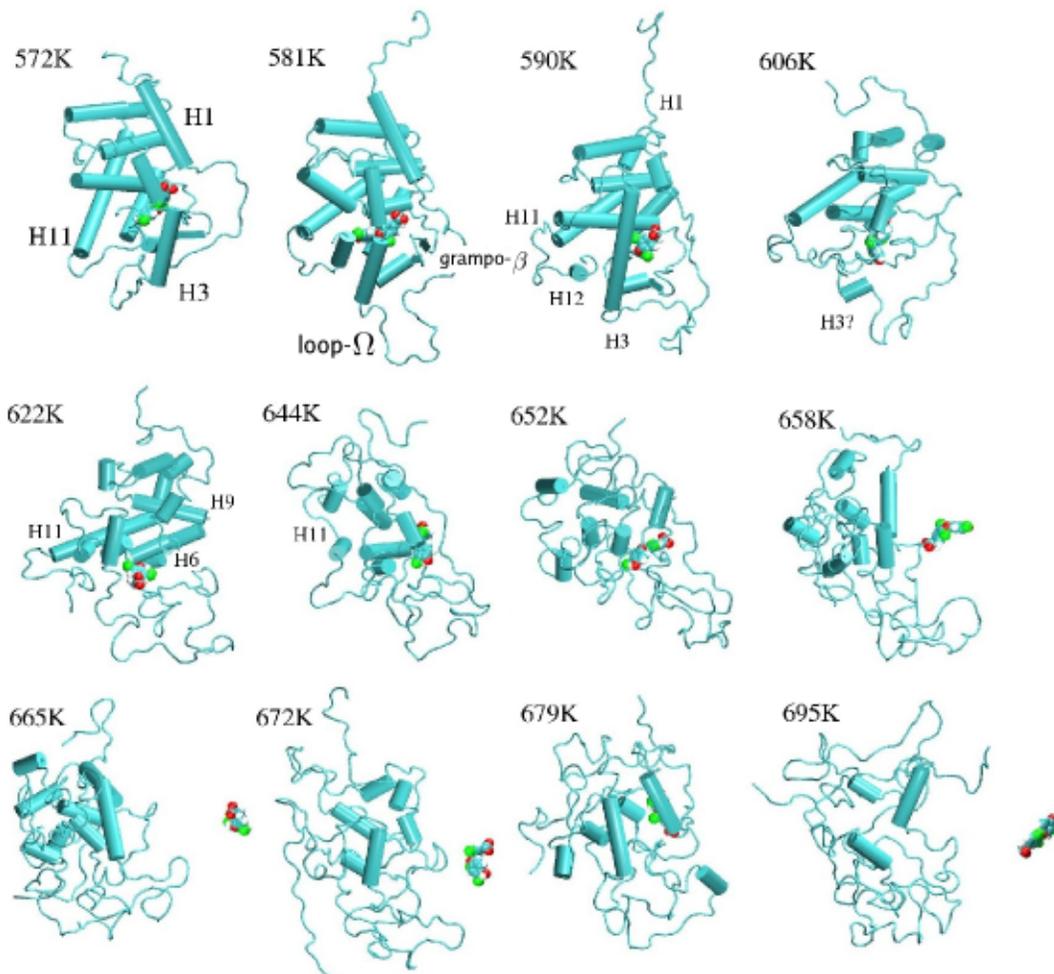
[27]. Estes experimentos reforçaram a imagem de um LBD altamente cooperativo, no qual a estabilidade de elementos distantes do sítio de ligação é afetada pela ligação dos hormônios. Uma destas regiões (a H8 no PPAR $\gamma$ , H9 nos TRs) mostrou ter mobilidades diferentes na presença e na ausência do Triac. Apesar de que não foram observadas variações substanciais na mobilidade da H1 resultantes da ligação do Triac, parte da H1 é uma das regiões de maior mobilidade em todas as simulações. O estudo [27] sustenta, portanto, a sugestão de que a região entre as hélices 1 e 3 e sua estabilização pela associação do ligante são relevantes para a estabilidade do receptor como um todo. No entanto, uma completa elucidação dos mecanismos pelos quais os ligantes afetam de forma diferente as estruturas das isoformas  $\alpha$  e  $\beta$  dos TRs requer outros estudos experimentais ou teóricos.

### 6.4.3 Detalhes dos mecanismos de desnaturação

A Figura 6.8 representa diversas etapas do processo de desnaturação do receptor TR $\beta$  ligado ao Triac. A Figura 6.9 mostra os fatores de compactidade e a estrutura secundária de cada resíduo, individualmente.

Como pode ser visto na Figura 6.8, o primeiro passo perceptível da desnaturação, observado quando a temperatura passa de 572 para 581K, é o movimento do  $\Omega$ -loop. Este movimento é rapidamente acompanhado pela desnaturação do grampo- $\beta$ . Quando a temperatura atinge 590K, partes das hélices 1, 8, 11 e 12 perdem sua estrutura secundária. As hélices 8 e 11 já foram afastadas uma da outra e a região C-terminal da hélice 11 está claramente desnaturada.

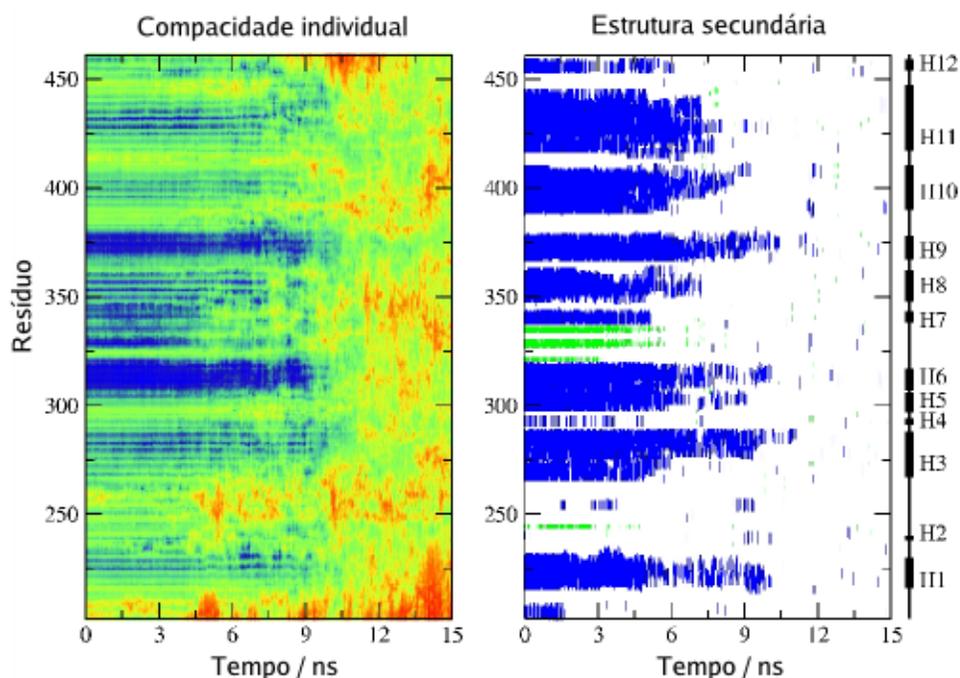
Quando a temperatura atinge 606K, a H3 perdeu a maior parte de sua estrutura. A parte inferior da proteína, incluindo a H12, está quase que totalmente desestruturada. O ligante ainda não deixou a estrutura e, apesar de que seus contatos nativos foram significativamente afetados, sua orientação na estrutura ainda é semelhante à orientação na estrutura nativa. Quando a temperatura passa de 622 para 658K ocorre uma progressiva desnaturação de outros elementos de estrutura secundária. Em 622K há ainda elementos de estrutura secundária preservados nas hélices 6, 9 e 11, mas a H10 já se perdeu. A 644K a hélice 11 perde totalmente sua estrutura. Apenas elementos residuais de estrutura secundária das hélices 6 e 9 podem ser observados. O Triac acaba sendo deslocado do sítio de ligação e sai



**Figura 6.8.** Imagens da desnaturação do TR $\beta$  ligado ao Triac. Apenas nas últimas imagens a estrutura começa a se expandir.

do LBD a 658K. Algumas partes do receptor continuam tendo alguma estrutura secundária residual a 695K. A estrutura como um todo é, ainda a esta temperatura, globular, apesar de desestruturada. A expansão da estrutura ocorre apenas em temperaturas maiores.

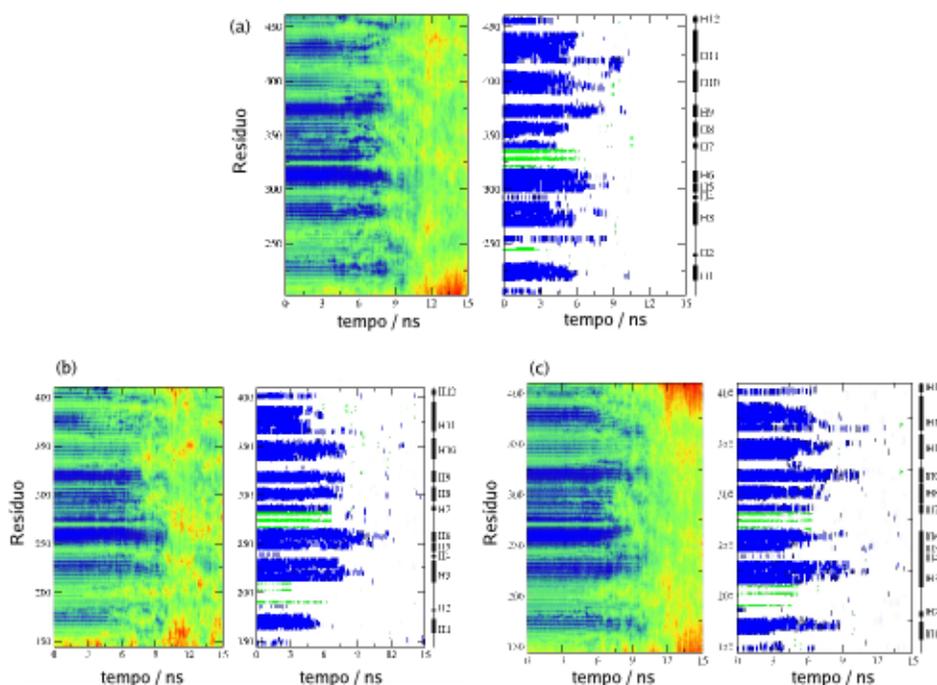
O processo detalhado da desnaturação, representado pela compacidade de cada resíduo e pela perda da estrutura secundária, está representado na Figura 6.9 para a estrutura do TR $\beta$  com ligante. Imagens similares para os outros sistemas estão apresentadas na Figura 6.10. Na Figura 6.9 vemos que duas regiões são afetadas



**Figura 6.9.** Fator de compacidade individual e estrutura secundária de cada resíduo, no processo de desnaturação do TR $\beta$  ligado ao Triac. Em (a) a compacidade diminui de azul a vermelho. Em (b) o azul indica presença de  $\alpha$ -hélices e o verde estruturas do tipo folhas- $\beta$ .

rapidamente nas simulações: a região N-terminal, antes da H1, e a região entre as hélices 2 e 3, que inclui o  $\Omega$ -loop. As regiões que permanecem compactas a maior parte do tempo são a H1, o fim da hélice 3, as hélices 6 e 9, e algumas partes da hélice 11. As hélices que melhor conservam a estrutura secundária são a H1, o fim da H3, e as hélices 6 e 9.

Na simulação do TR $\beta$  sem ligante, a maior parte dos elementos de estrutura secundária se desnaturam mais rápido. Em particular a H1 é perdida em menos de 6 ns de simulação (Figura 6.10(a)). A hélice 9 e a região C-terminal da hélice 11 aparecem como os elementos mais estáveis de estrutura secundária. Para o TR $\alpha$ , por sua vez, a associação do ligante parece estabilizar fortemente a H6, mas a estabilização da H1 não é observada na mesma extensão, como mostram as Figuras 6.10(c) e (d). A hélice 9 parece que é menos estável na presença do ligante



**Figura 6.10.** Fatores de compacidade individuais (à direita) e estrutura secundária de cada resíduo (à esquerda) para as simulações de desnaturação de: (a)  $TR\beta$  sem ligante, (b)  $TR\alpha$  com Triac e (c)  $TR\alpha$  sem ligante.

no  $TR\alpha$ , compensando uma maior estabilidade da hélice 6.

Os elementos que são expostos ao solvente em primeiro lugar (de acordo com os fatores de compacidade individuais) são a região N-terminal e as regiões entre as hélices 1 e 3, em particular as regiões contendo o  $\Omega$ -loop e o grampo- $\beta$ . A estrutura secundária se perde rápido nas hélices 4, 7 e 12, seguidas da região N-terminal da hélice 3, e das hélices 5, 8 e de algumas partes da hélice 10. No  $TR\alpha$  a hélice 8 parece ser tão estável como a hélice 9, ao contrário do que foi observado nas estruturas do  $TR\beta$ , nas quais a hélice 9 era mais estável. Uma visão mais completa do papel do ligante sobre as estruturas poderia ser obtida somente se estruturas cristalográficas dos receptores sem ligante estivessem disponíveis. Apesar de que as estruturas sem ligante foram equilibradas por 2 ns antes das simulações, parte dos eventos observados podem ainda ser rearranjos que decorrem da dissociação do ligante, e não do processo de desnaturação.

Assim, as regiões que conservam a estrutura secundária e a compacidade de forma mais coerente entre as simulações são as hélices 3, 6, 9 e a região N-terminal da hélice 11. A associação do ligante parece estabilizar as hélices 1 e 9 no TR $\beta$  e a hélice 6 no TR $\alpha$ . A aparição recorrente das hélices 6 e 9 como elementos de grande estabilidade vêm do fato de que estas hélices pertencem ao núcleo da proteína e, portanto, estão protegidas do solvente. Estes resultados têm implicações para um suposto mecanismo de enovelamento, como será discutido.

## 6.5 Idéias sobre o mecanismo de enovelamento dos LBDs

O princípio da reversibilidade microscópica implica que os mecanismos de desnaturação observados devem corresponder também a possíveis mecanismos de enovelamento [114]. Um dos grandes desafios da biologia estrutural foi a compreensão de como as proteínas conseguem atingir suas estruturas funcionais em solução em vista do grande número de conformações possíveis. Este paradoxo (conhecido como paradoxo de Levinthal) foi resolvido pela percepção de que, evidentemente, as proteínas não passam por todos os estados possíveis e, na verdade, se movem em um espaço conformacional muito menor [127]. Em particular, foi proposto que partes da proteína se enovelam rapidamente formando subestruturas. Estas subestruturas se arranjam entre si para, finalmente, formar a estrutura nativa. Evidentemente, a estrutura secundária, em particular as  $\alpha$ -hélices, são grandes candidatos para serem estas subestruturas que se formam nas primeiras etapas do enovelamento. De fato, o estudo de Zhou e Karplus [120] mostrou que pequenas proteínas formadas por  $\alpha$ -hélices se enovelam primeiro pela formação das hélices e, em seguida, pelo rearranjo das hélices em suas conformações nativas. Este modelo é coerente com o mecanismo de desnaturação (processo inverso) em que a expansão da estrutura precede a perda da estrutura secundária.

No entanto, este modelo parece não levar em conta algumas particularidades de outras proteínas. Por exemplo, alguns elementos de estrutura secundária, formados principalmente por resíduos hidrofóbicos, podem não se formar enquanto hidratados, e podem necessitar um ambiente hidrofóbico para um enovelamento correto. Neste sentido, a desnaturação do LBD dos TRs indica uma seqüência de eventos para o enovelamento que pode ser importante para estruturas maiores que

contém núcleos fortemente hidrofóbicos.

O enovelamento do LBD dos TRs deve ocorrer primeiro por um colapso que forma uma estrutura globular, desestruturada, com um núcleo hidrofóbico. O colapso hidrofóbico que precede a formação da estrutura secundária se assemelha ao mecanismo observado para a proteína Barstar experimentalmente [121]. As simulações de 1  $\mu$ s do subdomínio Villin headpiece também são coerentes com este mecanismo [117]. Estas simulações mostraram que o colapso hidrofóbico e a formação da estrutura secundária podem ocorrer simultaneamente, mesmo considerando que esta proteína é bastante menor que os LBDs. Outros estudos têm mostrado que proteínas globulares podem se condensar formando topologias semelhantes às das estruturas nativas, gerando contatos que favorecem a formação da estrutura secundária [128]. Este é o tipo de mecanismo observado para os TRs. O colapso hidrofóbico gera um ambiente adequado para a formação das hélices mais internas, em particular das hélices 6 e 9. Estas hélices podem servir de modelos estruturais (*templates*) para que as hélices externas se formem. Desta forma, é possível que as hélices externas se estruturem interagindo com as hélices internas e, portanto, já em posições semelhantes às posições observadas na estrutura nativa.

## 6.6 Conclusões

Há poucos estudos que tratam dos mecanismos de enovelamento e desnaturação em receptores nucleares [25, 27, 129]. Há evidências para o PPAR $\gamma$  e para o ER que a estrutura do LBD é altamente cooperativa, no sentido de que a estabilidade de cada elemento da estrutura é dependente da estabilidade da estrutura como um todo [25, 27]. Alguns estudos de mutações no LBD têm fornecido dicas de quais são as regiões mais estáveis e menos estáveis dos LBDs, mas os papéis funcionais de cada aminoácido e suas relações com a dinâmica do receptor permanecem fundamentalmente desconhecidos.

Neste capítulo descrevemos experimentos que mostram que o Triac tem um papel importante na estabilidade do LBD dos TRs. Os resultados destes experimentos implicam que a desnaturação da estrutura secundária ocorre antes da, ou simultaneamente à expansão da estrutura. As simulações apresentadas são o primeiro estudo da desnaturação dos receptores do hormônio tireoidiano. Apesar de

que as escalas de temperatura podem impedir um estudo detalhado dos mecanismos, estas simulações são de qualquer forma o primeiro estudo em escala molecular dos mecanismos de desnaturação de receptores nucleares em geral. As simulações estão de acordo com os experimentos, já que a compacidade da estrutura não se perde antes da estrutura secundária, e que o ligante permanece dentro da estrutura até que uma perturbação significativa da estrutura secundária tenha ocorrido.

As  $\alpha$ -hélices mais internas, que são principalmente hidrofóbicas, são os elementos de estrutura secundária mais estáveis. O ligante afeta a desnaturação provavelmente estabilizando a interface entre as hélices 8 e 11 e impedindo a entrada de água no sítio de ligação. A estabilização preferencial do TR $\beta$  pode ocorrer pela estabilização dos contatos da hélice 11 com o corpo da proteína, como foi observado experimentalmente para o PPAR $\gamma$  [27].

Do ponto de vista dos processo de enovelamento de proteínas em geral, aqui apresentamos um estudo dos mecanismos de desnaturação de uma proteína relativamente grande, compacta e formada por  $\alpha$ -hélices. Este é também o primeiro estudo da desnaturação de uma proteína que se liga a moléculas pequenas, e os mecanismos de desnaturação são fortemente dependentes da presença do ligante. O enovelamento do LBD deve ocorrer primeiro pelo colapso hidrofóbico e, em seguida, pela formação das hélices mais internas. Estas podem servir como modelos estruturais para formação das hélices externas já em posições nativas.

Finalmente, este estudo apresenta uma visão molecular que permitirá o estudo da desnaturação de receptores nucleares por outros métodos computacionais ou experimentais. Este trabalho pode ser continuado pelo estudo das estruturas encontradas em temperaturas mais realistas, de forma que o papel de resíduos individuais possa ser elucidado. Esta informação é relevante para a atribuição da função de vários resíduos envolvidos em mutações associadas a doenças humanas.

## Capítulo 7

# Mecanismos de difusão térmica

Este capítulo apresenta um estudo dos mecanismos de difusão térmica nos LBDs dos receptores do Hormônio Tireoidiano. A técnica de difusão térmica anisotrópica foi utilizada de forma sistemática para o estudo da difusão de calor a partir de cada aminoácido da proteína. Mostraremos que a difusão de calor, ou, equivalentemente, a transferência de energia vibracional, em proteínas, ocorre basicamente por três mecanismos: a difusão ao longo da cadeia, a difusão através de contatos próximos não-covalentes, e a difusão indireta através da cadeia dos resíduos aquecidos indiretamente. A importância de cada um destes mecanismos está relacionada com a posição do resíduo aquecido na cadeia e na estrutura protéicas. No entanto, há resíduos que, independentemente de sua posição na cadeia, são particularmente importantes para a difusão térmica. No caso dos TRs, as argininas são os resíduos mais importantes para difusão de calor, aparentemente porque são os resíduos carregados que interagem mais fortemente com o interior da proteína. Os resíduos que têm papéis destacados na difusão de calor são funcionalmente importantes, sendo em sua maioria associados à Síndrome da Resistência ao Hormônio Tireoidiano e a outras defeitos funcionais. Os mecanismos aqui propostos para a difusão de calor podem ter uma importância geral para a estabilidade de proteínas ou para a sinalização intramolecular. Como mencionamos anteriormente, a transmissão de sinais moleculares é de importância fundamental para os processos de recrutamento de cofatores, para a dimerização e para mecanismos alostéricos de controle da transcrição.

## 7.1 Dissipação da energia cinética em proteínas

Os mecanismos pelos quais as proteínas dissipam perturbações cinéticas são importantes para sua estabilidade e para a sinalização. Em alguns sistemas, como nas proteínas com cofatores *heme*, existe uma motivação bastante clara para o estudo da dissipação da energia cinética, uma vez que a funcionalidade destas proteínas está associada à absorção de luz e, assim, à dissipação da energia cinética em excesso contida no cromóforo. Há vários estudos que procuram entender como a energia cinética é dissipada, a partir do cromóforo, para o restante da proteína [130–134]. Nestes sistemas foi observado que as vias mais rápidas para a dissipação da energia cinética do cromóforo envolvem resíduos carregados. Além disso, mecanismos anisotrópicos de dissipação que envolvem contatos muito específicos promovem a dissipação da energia cinética em direção ao solvente [131, 132]. O estudo mais completo dos mecanismos de relaxação da energia cinética [131] mostrou que os mecanismos principais envolvidos são: a dissipação da energia através da cadeia protéica (ligações covalentes), seguida das interações do grupo excitado com aminoácidos carregados e, em seguida, pelos aminoácidos alifáticos e finalmente pelos resíduos aromáticos. Neste trabalho é proposto que a relaxação da Mioglobina após a fotólise ocorre através do contato do grupo *heme* com o solvente através dos grupos isopropionato, carregados, e que a cadeia protéica poderia servir como um “condutor térmico” efetivo para a dissipação da energia cinética em excesso [131].

### 7.1.1 Difusão térmica anisotrópica

Recentemente Ota e Agard propuseram um técnica diferente para o estudo da difusão térmica em proteínas que eles chamaram de Difusão Térmica Anisotrópica (ATD) [135]. Sua motivação foi procurar uma razão cinética e estrutural para as correlações evolutivas entre aminoácidos encontradas por Ranganathan e colaboradores em estudos anteriores [136, 137]. Estas correlações foram obtidas através do estudo de seqüências de aminoácidos de várias proteínas de uma mesma família, usando métodos estatísticos. No entanto, não foi possível obter uma explicação estrutural dos mecanismos envolvidos. Vários dos aminoácidos correlacionados são, inclusive, distantes na estrutura. Ota e Agard suspeitaram que as correlações poderiam ser dinâmicas e, portanto, deveriam poder ser estudadas por simulações

de dinâmica molecular. No entanto, as correlações dinâmicas pareciam ser muito fracas para que seu estudo fosse possível usando técnicas de simulação convencionais: as oscilações na estrutura provocadas pela agitação térmica dificultavam sua observação. Desta forma propuseram congelar a estrutura da proteína e aquecer apenas um aminoácido, para que a propagação do calor, na estrutura quase-estática, fosse mais claramente observável. Em seu trabalho, Ota e Agard relatam que os mecanismos de difusão térmica indicavam correlações que correspondiam às correlações observadas pelos estudos evolutivos [135].

Como vimos, há muitas mutações na estrutura dos LBDs que provocam doenças humanas ou outros tipos de problemas funcionais. Muitas destas mutações ocorrem em resíduos para os quais não é possível compreender as razões estruturais dos defeitos funcionais pela simples observação da estrutura. Os problemas funcionais provavelmente estão relacionados com processo dinâmicos, como a estabilidade do receptor como um todo ou com mecanismos de sinalização intramolecular. Além disso, como os LBDs são estruturas compactas e globulares, são alvos interessantes para o estudo da difusão térmica usando a técnica de Ota e Agard.

## 7.2 Metodologia

Na técnica ATD, o sistema (geralmente a proteína e o ligante apenas) é termalizado a uma temperatura muito baixa (no nosso caso 10K). Em seguida, um único resíduo é instantaneamente aquecido a 300K e mantido a essa temperatura durante toda a simulação com o uso de alguma técnica de acoplamento térmico [135]. O calor naturalmente se difunde do aminoácido aquecido para o restante da proteína. A temperatura é então monitorada para todos os resíduos, individualmente, de forma que os caminhos envolvidos na difusão térmica possam ser identificados.

As estruturas utilizadas foram as estrutura do  $TR\alpha$  e do  $TR\beta$  ligadas ao T3 determinadas pelo grupo do Prof. Polikarpov [22, 69] e têm resoluções de 1,87 e 2.4Å respectivamente. Para o estudo da difusão térmica a partir de ligantes distintos foram usadas as estruturas do receptor  $TR\beta$  associado ao GC-24 [64], as estruturas de ambas as isformas ligadas ao KB-141 [49], ao Triac e ao GC-1 (ver Capítulo 5). Todas as estruturas foram solvatadas por uma camada de ao menos 15Å de água e íons (um para cada resíduo carregado do LBD) usando o programa

Packmol [76]. As simulações foram feitas com NAMD [80, 138]. Foi usado um passo de tempo de 2 fs. As estruturas, depois de solvatadas, foram equilibradas da seguinte forma: a energia do sistema foi minimizada usando 1000 passos de gradientes conjugados. Em seguida, 100 ps de simulação com escalonamento de temperatura a 300K a cada 1 ps foram feitos, porém mantendo a estrutura da proteína fixa. Mais 100 ps de termalização foram realizados mantendo apenas os carbonos- $\alpha$  da proteína fixos e, finalmente, 100 ps de termalização foram feitos sem nenhuma restrição sobre os átomos. Desta forma, uma estrutura equilibrada a 300K foi obtida. Os parâmetros utilizados foram os mesmos que os dos estudos anteriores [70, 88].

De acordo com a técnica ATD, as águas e os íons foram removidos. Restrições harmônicas leves ( $0,5 \text{ kcal mol}^{-1}$ ) foram aplicadas a todos os carbonos- $\alpha$  das estruturas para que a ausência do solvente não levasse a distorções importantes em relação à estrutura equilibrada. Em seguida, velocidades foram atribuídas a todos os átomos de acordo com uma temperatura de 10K e simulações de 100 ps com escalonamento de velocidades a 10K a cada picosegundo foram realizadas. Estruturas equilibradas a temperaturas de 10K foram obtidas. Como a temperatura é muito baixa, os desvios em relação à estrutura inicial são pequenos. As simulações de difusão térmica foram então realizadas através do aquecimento de cada resíduo da proteína, individualmente, ou do ligante, a 300K. O aquecimento foi feito pela aplicação de forças aleatórias de acordo com o método de Langevin [80]. Uma constante de acoplamento de  $100 \text{ ps}^{-1}$  foi usada. Desta forma, o resíduo aquecido é mantido a 300K durante toda a simulação. Os outros resíduos têm velocidades iniciais correspondentes a 10K. Cada simulação de difusão térmica dura 30 ps e as velocidades (não as coordenadas) são salvas a cada 50 fs para que as temperaturas de cada resíduo possam ser monitoradas. Simulações independentes foram realizadas para o aquecimento de cada resíduo da estrutura, de forma que o estudo como um todo envolveu cerca de 800 simulações que totalizam cerca de 24 ns. Os resultados serão apresentados com base na simulações do  $\text{TR}\beta$  e são válidos para ambas as isoformas a não ser quando a diferença for explicitamente destacada.

Simulações foram feitas para o receptor  $\text{TR}\beta$  com cada um de seus resíduos, individualmente, mutados para glicinas. As mutações foram feitas removendo a cadeia lateral do aminoácido original e permitindo que o programa *psfgen* [138]

construísse a cadeia lateral da glicina (um hidrogênio) na posição correspondente.

O estudo da difusão térmica a partir dos ligantes foi feito pelo aquecimento dos ligantes a 300K seguindo o protocolo descrito acima.

### Difusão térmica isotrópica

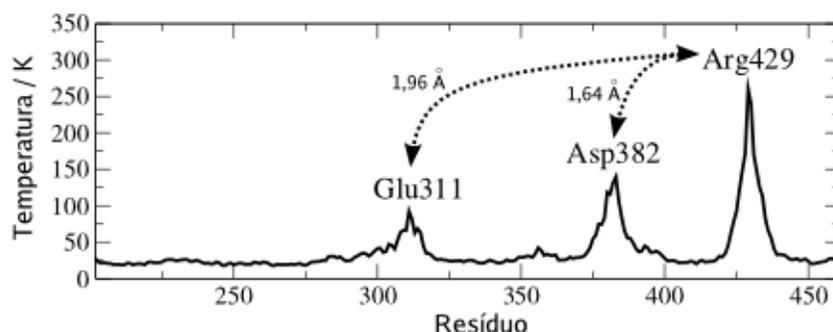
A expectativa isotrópica da difusão térmica a partir dos ligantes foi calculada da seguinte forma: Para um meio isotrópico a temperatura esperada em qualquer ponto do espaço depende da distância da fonte de calor,  $d$ , de acordo com uma equação da forma  $T = Ae^{-B(d-d_0)} + C$  (solução da equação da difusão para um meio isotrópico em três dimensões) [139]. Desta forma, dada a distância de cada resíduo ao resíduo aquecido, e conhecendo os valores das constantes  $A$ ,  $B$  e  $d_0$ , é possível obter a expectativa isotrópica da temperatura daquele resíduo.

As distâncias consideradas foram as distâncias do átomo mais próximo de cada resíduo ao resíduo aquecido. Assim, ajustamos a expectativa isotrópica da temperatura aos dados de temperatura em função da distância, de forma a obter os parâmetros  $A$ ,  $B$  e  $d_0$ . No entanto, nossa expectativa é que algumas das respostas sejam *anisotrópicas*. Estas serão, então, *outliers* no ajuste, e nosso interesse consiste exatamente na identificação destes *outliers*. Assim, o ajuste não pode ser feito para todos os dados obtidos.

O ajuste foi feito de forma a identificar os parâmetros que melhor ajustam a expectativa isotrópica a 70% dos valores da simulação. Desta forma, 30% dos pontos foram considerados *outliers*. Estes foram identificados automaticamente usando a técnica de Minimização do Menor Valor Ordenado [140] e a otimização foi realizada com o pacote GENCAN [141]. 5000 pontos iniciais (valores de parâmetros) diferentes foram usados para cada ajuste, de forma a garantir que o ajuste e identificação de *outliers* ótimos fossem obtidos.

### Mapas de difusão térmica

Os mapas de difusão térmica representam a temperatura média de cada resíduo no decorrer da simulação, em função do resíduo aquecido. Na abcissa do mapa encontra-se o índice do resíduo aquecido, e na ordenada o índice de cada resíduo da proteína. As cores do mapa indicam a temperatura média atingida pelo resíduo



**Figura 7.1.** Resposta típica ao aquecimento de um resíduo. Neste caso, a temperatura média dos resíduos da proteína obtidas como resposta ao aquecimento da Arginina 429 após 30 ps de simulação. A Arg429 é mantida a 300K enquanto o restante da proteína estava inicialmente a 10K.

na simulação, sendo que a escala representa temperaturas baixas em azul e temperaturas altas em vermelho. Todos os gráficos foram feitos com *xmgrace*.

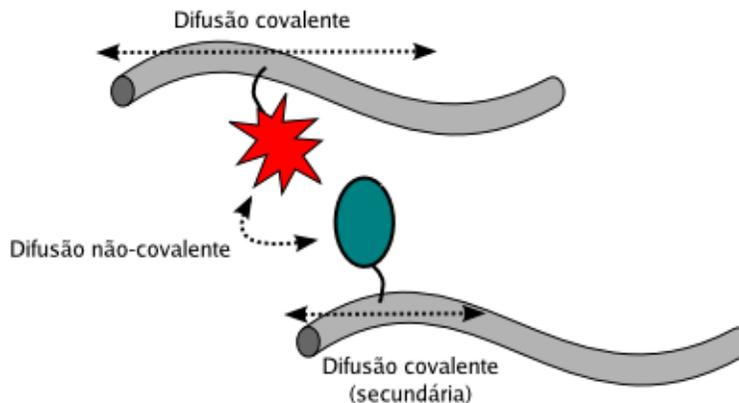
### Difusão térmica covalente e não-covalente

A resposta dos resíduos ao aquecimento de cada aminoácido foi classificada como covalente (C) ou não-covalente (NC), de acordo com a distância entre os resíduos na seqüência de aminoácidos da proteína. O aquecimento de resíduos que estão a uma distância menor que 25 resíduos (na seqüência primária) do aminoácido aquecido foi considerado covalente. O aquecimento de resíduos a maiores distâncias em termos da cadeia protéica foi considerado não-covalente. Esta definição foi usada na construção das Figuras 7.4(a) e (b) para difusão térmica C e NC, respectivamente.

## 7.3 Resultados

### 7.3.1 Visão geral da difusão térmica nos LBDs

A Figura 7.1 mostra um perfil típico da temperatura média de cada resíduo da proteína resultante do aquecimento de um dos resíduos. O gráfico mostra a temperatura de todos os resíduos do TR $\beta$  em uma simulação em que a Arginina 429 foi aquecida. Desta forma, a temperatura da Arg429 é 300K.

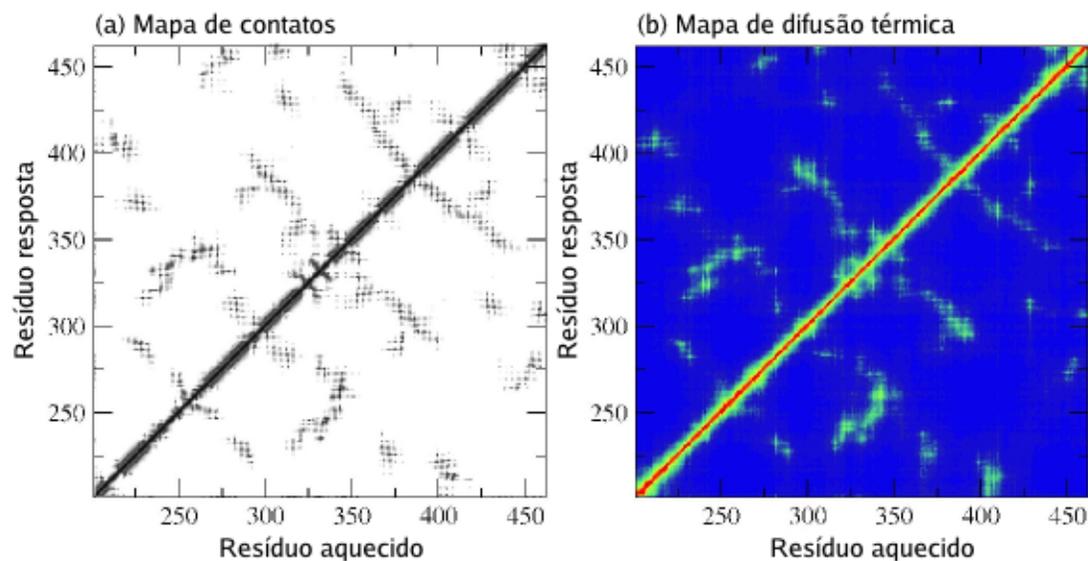


**Figura 7.2.** A difusão do calor ocorre através da cadeia covalente e através de contatos próximos.

A partir desta figura é possível definir três mecanismos fundamentais de difusão térmica em proteínas:

1. Os resíduos que estão próximos do resíduo aquecido do ponto de vista da cadeia protéica respondem fortemente ao aquecimento. Esta resposta será chamada resposta “covalente”. A difusão do calor através das ligações covalentes da cadeia é, claramente, o mecanismo mais importante.
2. Os resíduos que formam contatos próximos com o resíduo aquecido também respondem fortemente ao aquecimento. Neste caso, os aminoácidos Glu311 e Asp382, que possuem contatos a  $1,96\text{\AA}$  e  $1,64\text{\AA}$ , respectivamente, aquecem devido à transferência de energia da Arginina 429.
3. Por fim, os resíduos próximos, do ponto de vista da cadeia protéica, dos resíduos Glu311 e Asp382 são aquecidos. Esta difusão ocorre através da cadeia de ligações covalentes a partir destes resíduos.

A Figura 7.2 representa esquematicamente os três mecanismos de difusão térmica observados. A difusão covalente ocorre através da cadeia protéica próxima do resíduo que é diretamente perturbado. A difusão não-covalente ocorre pela transferência de calor do resíduo aquecido para outros resíduos que formam contatos próximos. Por fim, uma difusão também covalente, mas secundária, ocorre através

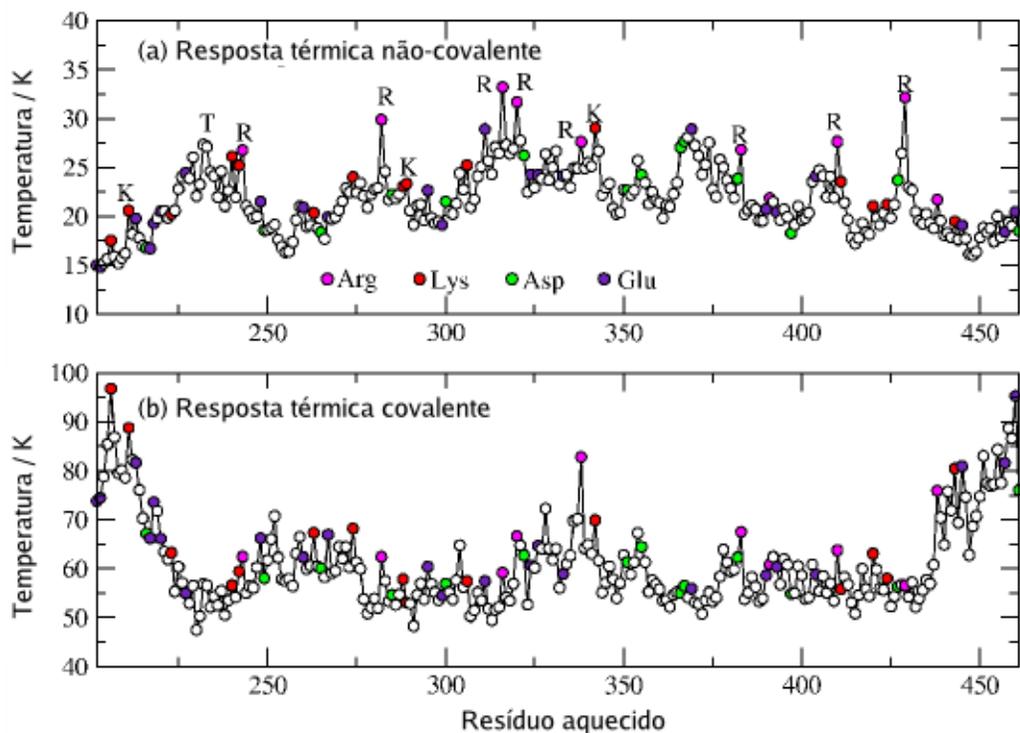


**Figura 7.3.** (a) Mapa de contatos do  $TR_{\beta}$ . (b) Mapa de difusão térmica. Há uma boa correlação entre os dois mapas, indicando que a energia cinética é difundida preferencialmente para resíduos próximos na estrutura.

dos resíduos próximos na cadeia dos resíduos aquecidos indiretamente. A resposta térmica associada ao primeiro mecanismo será chamada resposta covalente. Os outros dois mecanismos serão definidos como mecanismos não-covalentes, por sua relação com o resíduo originalmente aquecido. O aquecimento pela cadeia covalente secundária não será chamado covalente, apesar de ocorrer através da cadeia protéica.

Repetindo o experimento da Figura 7.1 para o aquecimento de cada resíduo da proteína, individualmente, é possível construir um mapa da difusão térmica da proteína. Este mapa contém a temperatura atingida por cada resíduo como resposta ao aquecimento de cada resíduo da proteína. O mapa de contatos e o mapa de difusão térmica para o LBD do receptor  $TR_{\beta}$  estão representados nas Figuras 7.3(a) e (b), respectivamente.

Como esperado pela análise da Figura 7.1, a resposta térmica mais intensa está associada aos resíduos que estão próximos na cadeia protéica ao resíduo aquecido. Esta é a razão da intensa linha vermelha na diagonal da Figura 7.3(b). Se comparamos o mapa de difusão térmica com o mapa de contatos, observamos uma



**Figura 7.4.** Resposta do  $TR\beta$  ao aquecimento de cada resíduo: (a) Aquecimento não-covalente. (b) Aquecimento covalente. Várias Argininas se destacam no perfil de aquecimento não-covalente.

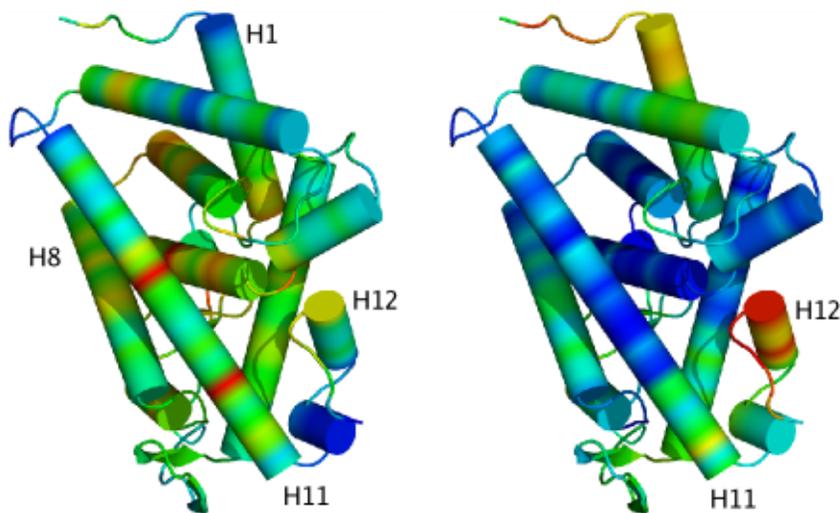
razoável correlação. Esta correlação está associada ao segundo mecanismo de difusão observado, que envolve contatos próximos e não-covalentes. No entanto, o mapa de difusão térmica é mais difuso (parece ter menor resolução) que o mapa de contatos, e isto se deve à condução do calor através das cadeias protéicas secundárias.

A comparação do mapa de contatos com o mapa de difusão térmica confirma a validade dos mecanismos gerais definidos na Figura 7.2. Os resíduos que estão próximos uns dos outros estão termicamente conectados, mas o calor é em seguida difundido através da cadeia protéica. Desta forma, resíduos que não estão necessariamente próximos na estrutura podem estar conectados termicamente de forma eficiente.

### 7.3.2 A importância de cada resíduo

Para avaliar a importância de cada resíduo para a difusão térmica como um todo, as contribuições dos mecanismos covalente e não-covalente foram medidas de forma separada. Estas contribuições foram obtidas calculando-se: 1) A temperatura média dos resíduos que estão mais próximos que 25 resíduos do resíduo originalmente aquecido em termos da cadeia protéica, o que está associado aos mecanismos de difusão térmica covalentes e 2) a temperatura média dos resíduos que estão a mais de 25 resíduos do aminoácido originalmente aquecido, sendo esta a resposta não-covalente do LBD.

A Figura 7.4 representa estas duas medidas de difusão térmica. Na Figura 7.4(a) vemos que a difusão térmica não-covalente é caracterizada por uma temperatura média aproximadamente independente do resíduo, que varia levemente em torno de 23K. No entanto, há vários *outliers* que podem ser claramente identificados, e estes são, em sua maioria, Argininas.



**Figura 7.5.** Resposta do TR $\beta$  ao aquecimento de cada resíduo: à esquerda, a resposta não-covalente; à direita, a resposta covalente. Cores avermelhadas indicam resíduos que transferem calor efetivamente para o restante da proteína de acordo com cada mecanismo.

A difusão térmica covalente, representada na Figura 7.4(b) é, por sua vez, bastante mais forte. A temperatura média dos resíduos oscila em torno de 60K.

No entanto, há menos resíduos que podem ser identificados de forma clara como *outliers*. As respostas mais fortes ocorrem nas extremidades da proteína, uma vez que apenas um caminho de propagação térmica covalente pode ocorrer.

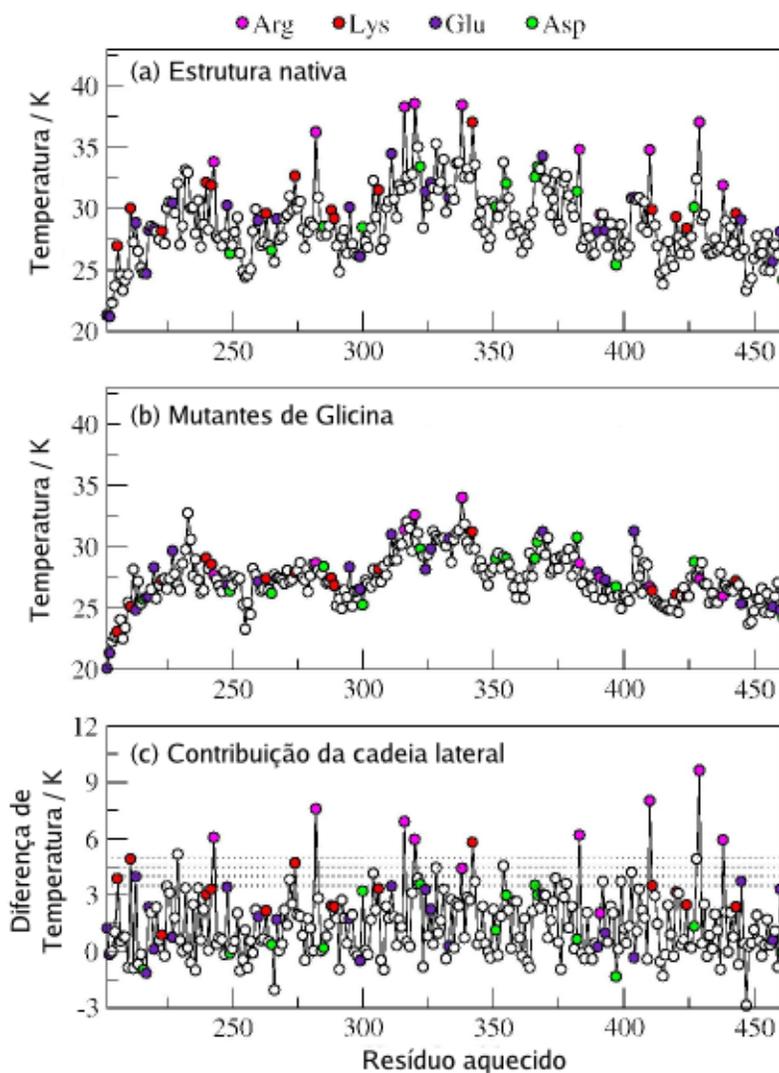
Os mesmos dados da Figura 7.4 estão representados sobre a estrutura do LBD na Figura 7.5. A representação das respostas térmicas desta forma revela a razão estrutural para as oscilações mais globais na difusividade térmica: No painel da esquerda vemos a resposta não-covalente. O núcleo da proteína tem a coloração mais intensamente verde, indicando que os resíduos nesta região transmitem relativamente mais calor através deste mecanismo. Isto é esperado, uma vez que os resíduos mais internos estão mais densamente empacotados por ligações não-covalentes e, portanto, tendem a difundir calor através destes contatos. No entanto, há várias exceções, como será discutido.

Por outro lado, no painel da direita da Figura 7.5 vemos a resposta média dos resíduos aquecidos através da cadeia protéica. Neste caso, as hélices do núcleo da proteína propagam calor relativamente mal. Há alguma correlação no sentido de que os resíduos da superfície propagam calor de forma mais eficiente, mas há muitas exceções. Por exemplo, no meio da H11, que está na superfície da proteína, o calor se propaga mal através do mecanismo covalente. Neste caso, isto se deve à presença de dois resíduos que propagam calor pelo mecanismo não-covalente de forma muito eficiente (R429 e R438, os resíduos vermelhos na H11 na estrutura da esquerda da Figura 7.5).

### 7.3.3 Contribuições das cadeias laterais

As Figuras 7.4 e 7.5 sugerem que resíduos de natureza diferente possuem diferentes contribuições para a difusão térmica total da proteína. No entanto, estas figuras mesclam duas contribuições: a contribuição da cadeia lateral do próprio aminoácido e as contribuições das cadeias laterais dos aminoácidos próximos, que são aquecidos de forma importante através do mecanismo covalente, como mostra a Figura 7.1. É interessante separar estas duas contribuições e obter a contribuição pura das cadeias laterais de cada resíduo, de forma a identificar as correlações entre a difusão térmica e a natureza química de cada aminoácido.

Para fazer esta separação, as cadeias laterais de todos os aminoácidos do TR $\beta$



**Figura 7.6.** Contribuições das cadeias laterais: (a) Resposta térmica do receptor nativo. (b) Resposta térmica do receptor com cadeias laterais de Glicina. (c) Contribuição das cadeias laterais (diferença entre (a) e (b)).

foram modificadas, individualmente, de forma a transformá-los em resíduos de Glicina. Desta forma, 261 simulações independentes foram feitas para o aquecimento de cada um dos mutantes. Estas simulações permitem a determinação da contribuição da cadeia lateral para a difusão térmica como um todo, porque para cada aquecimento teremos a contribuição do aquecimento covalente mais a contribuição

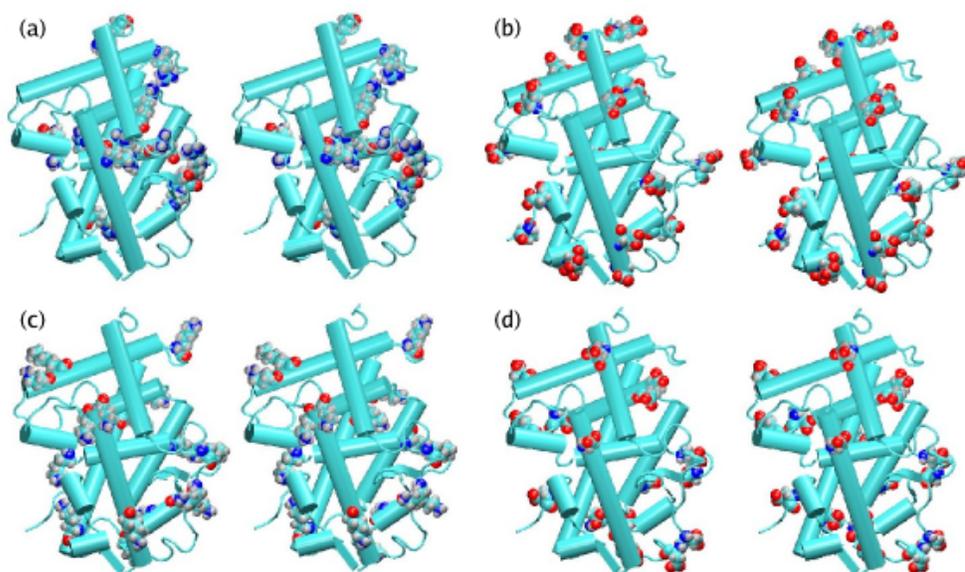
das cadeias laterais dos aminoácidos vizinhos, aquecidos de forma indireta. Os resultados destas simulações estão resumidos na Figura 7.6.

Na Figura 7.4(a) vimos que as Argininas pareciam ter uma importância particular para os mecanismos de difusão térmica. No entanto, não era possível afirmar se esta contribuição provinha de sua cadeia lateral ou de alguma particularidade na posição destes aminoácidos na seqüência. A importância das cadeias laterais de Arginina é confirmada nas simulações dos mutantes. Na Figura 7.6(a) vemos a temperatura média de todos os resíduos da proteína como resposta ao aquecimento de cada um dos resíduos do receptor nativo. Há vários *outliers*, sendo em sua maioria Argininas. Na Figura 7.6(b) vemos a resposta térmica da proteína ao aquecimento de cada um dos resíduos após terem sido mutados para Glicinas. O único *outlier* que permanece é a Arg338. Todos os outros aminoácidos (mutados) parecem ter contribuições semelhantes para a difusão térmica, e a curva se torna mais suave, dependente principalmente da posição de cada resíduo na cadeia. Desta forma, a diferença entre os resíduos se deve à natureza de suas cadeias laterais.

A contribuição das cadeias laterais pode ser calculada computando a diferença das respostas térmicas das Figuras 7.6(a) e 7.6(b). Estas diferenças estão representadas na Figura 7.6(c), e a importância das Argininas na difusão térmica como um todo torna-se evidente: há dez resíduos que possuem contribuições de cadeia lateral (CCL) maiores que 5K. Destes dez resíduos, 8 são argininas (o receptor tem um total de 10 argininas), como mostra a Tabela 7.1. A lista dos 10 resíduos mais importantes é completada pela His229 e pela Lys342. Considerando os resíduos com CCL maiores que 4,5, mais quatro resíduos entram na lista: Glu211, Lys274, Phe354 e Leu428. Estes dois últimos são os primeiros resíduos apolares da lista. Mais quatro resíduos aparecem na lista se o corte é feito em 4K: Lys304, Leu328, Arg338 e Phe403. Esta lista contém 18 resíduos, dos quais 11 são argininas, 15 são carregados e apenas 3 são neutros. É clara, portanto, importância dos resíduos carregados, em particular as argininas, para a difusão térmica nos TRs.

Como as argininas possuem um papel particularmente importante na difusão térmica através do mecanismo não-covalente, é interessante observar se, estruturalmente, possuem alguma peculiaridade. A disposição dos aminoácidos carregados dos TRs está representada na Figura 7.7.

No LBD dos TRs as argininas possuem ambientes estruturais diferentes dos



**Figura 7.7.** Disposição dos aminoácidos carregados na estrutura da proteína: (a) Argininas. (b) Ácidos glutâmicos. (c) Lisinas. (d) Ácidos aspárticos. As Argininas parecem estar dobradas em direção ao interior da proteína, enquanto que outros resíduos carregados interagem preferencialmente com o solvente.

outros resíduos carregados. Em sua maioria, pertencem ao núcleo da proteína ou formam contatos com resíduos do núcleo (Figura 7.7(a)). Por outro lado, os outros resíduos carregados, em particular os negativos, possuem cadeias laterais que apontam para o exterior da proteína, de forma que não formam interações fortes com resíduos no seu interior. Isto explica porque as argininas são tão importantes para a propagação do calor nos TRs: elas são carregadas, portanto formam interações fortes, e interagem com resíduos no interior da proteína, algumas delas com o ligante, inclusive. A importância dos resíduos carregados para a dissipação da energia cinética já tinha sido relatada para proteínas com grupos *heme* e pode, assim, ser relevante para proteínas em geral [131]. Aqui mostramos, no entanto, que esta importância depende da posição dos resíduos na estrutura e da orientação de suas cadeias laterais. A existência de resíduos que dissipam calor de forma particularmente eficiente pode ser um mecanismo relevante para a estabilidade de proteínas.

CCL > 5K	5K > CCL > 4.5K	4.5K > CCL > 4K
H229 <sup>1[a,b]</sup>	E211	L304
R243 <sup>1,2[c,d,e]</sup>	K274	L328
R282 <sup>1,2[d,f]</sup>	F354	R338 <sup>2,4[a,h,i,j,w]</sup>
R316 <sup>1[a,g]</sup>	L428 <sup>1,2,3[a,d,n,v]</sup>	F403
R320 <sup>2[h,i,j]</sup>		
K342 <sup>2[k]</sup>		
R383 <sup>1,2[d,l,m]</sup>		
R410 <sup>1[a]</sup>		
R429 <sup>1,2,3[a,n,o,p,q,r]</sup>		
R438 <sup>1,2[j,h,s,t,u]</sup>		

As mutações nestes resíduos estão relacionadas com: 1) Deficiência no recrutamento de correpressores. 2) Síndrome da resistência ao hormônio tireoídiano. 3) Dimerização prejudicada. 4) Afinidade reduzida em relação ao hormônio *in vitro*. Referências: *a*: [142]; *b*: [143]; *c*: [144]; *d*: [53]; *e*: [145]; *f*: [146]; *g*: [147]; *h*: [148]; *i*: [149]; *j*: [150]; *k*: [151]; *l*: [152]; *m*: [153]; *n*: [19]; *o*: [154]; *p*: [155]; *q*: [156]; *r*: [157]; *s*: [158]; *t*: [61]; *u*: [159]; *v*: [14]; *w*: [160].

**Tabela 7.1.** Cadeias laterais com contribuições mais importantes.

### 7.3.4 A importância funcional dos resíduos difusores

Existem muitos dados funcionais relacionados com mutações em resíduos dos LBDs dos TRs, em particular do LBD do TR $\beta$ . A maior parte está relacionada com mutações que causam a Síndrome da Resistência ao Hormônio Tireoídiano (THR). Muitas prejudicam a associação de cofatores e a formação da superfície de dimerização. Se os resíduos que têm papéis importantes para a difusão térmica têm relevância funcional, estes devem poder ser correlacionados com os dados funcionais existentes.

Comparando os dados da Tabela 7.1 com os dados experimentais disponíveis, observamos que os 10 resíduos da primeira coluna possuem importâncias funcionais identificadas. Existem problemas funcionais identificados para cerca de 50% dos resíduos do LBD. Desta forma, a probabilidade de que esta correlação seja uma

coincidência é menor que 0,1%.<sup>2</sup> Assim, os resíduos que são importantes propagadores de calor são, necessariamente, importantes do ponto de vista funcional. Considerando os 14 resíduos mais importantes, 11 deles têm importância funcional identificada. Para os 18 resíduos da Tabela 7.1, 12 estão associados a mutações conhecidas. Considerando contribuições menores que 4K, a probabilidade de encontrar um resíduo funcional é igual à probabilidade de que qualquer resíduo seja associado a uma mutação conhecida.

As correlações estão provavelmente associadas ao fato de que os resíduos formam interações fortes com outros resíduos do LBD e participam em complexas redes de conectividade. As funções prejudicadas pela mutação destes resíduos podem estar associadas à estabilidade do enovelamento do LBD. Os mecanismos de difusão térmica podem ser importantes para a dissipação de perturbações cinéticas que desestabilizam o enovelamento nativo. Em todo caso, o estudo da difusão térmica parece ser uma ferramenta capaz de identificar um conjunto de resíduos funcionalmente importantes.

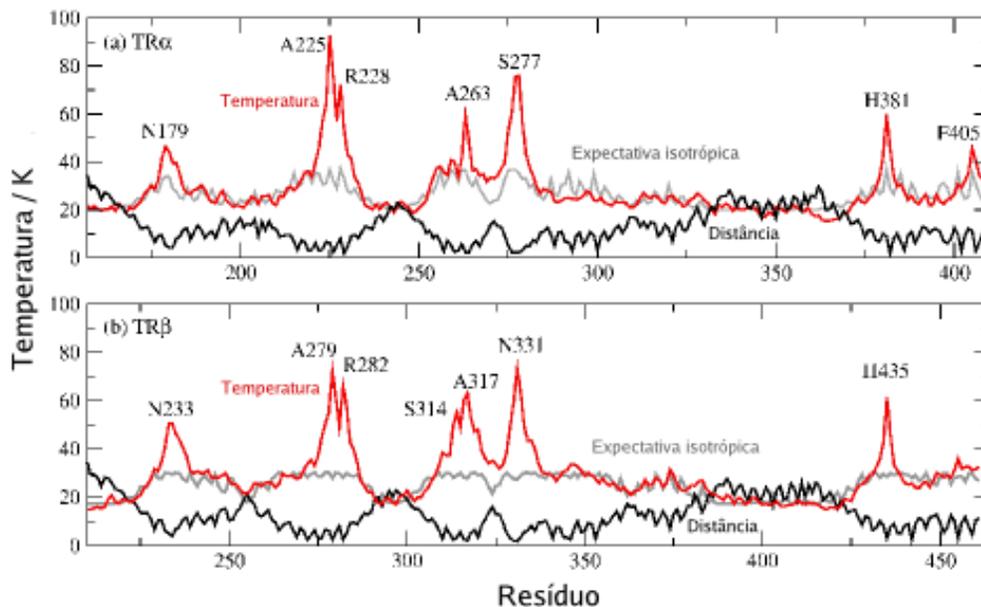
### 7.3.5 O aquecimento dos ligantes

O aquecimento dos ligantes é particularmente interessante, uma vez que os ligantes participam apenas de contatos não-covalentes com a proteína. As Figuras 7.8(a) e (b) mostram a resposta dos LBDs das isoformas  $\alpha$  e  $\beta$  ao aquecimento do T3. As linhas vermelhas representam a temperatura média observada para cada resíduo. As linhas pretas representam a distância de cada resíduo ao ligante e as linhas cinzas representam a expectativa isotrópica de aquecimento (ver Metodologia).

Claramente alguns resíduos possuem respostas que são muito maiores que as expectativas isotrópicas. Os resíduos são, no TR $\alpha$ : N179, A225, R228, A263, S277, H381 e F405. No TR $\beta$ , os resíduos com respostas anisotrópicas são: N233, A279, R282, S314, A317, N331 e H435. O aquecimento do T3, portanto, provoca um efeito similar sobre as estruturas do TR $\alpha$  e do TR $\beta$ , com exceção do aquecimento da F405 no TR $\alpha$  e da S314 no TR $\beta$ .

---

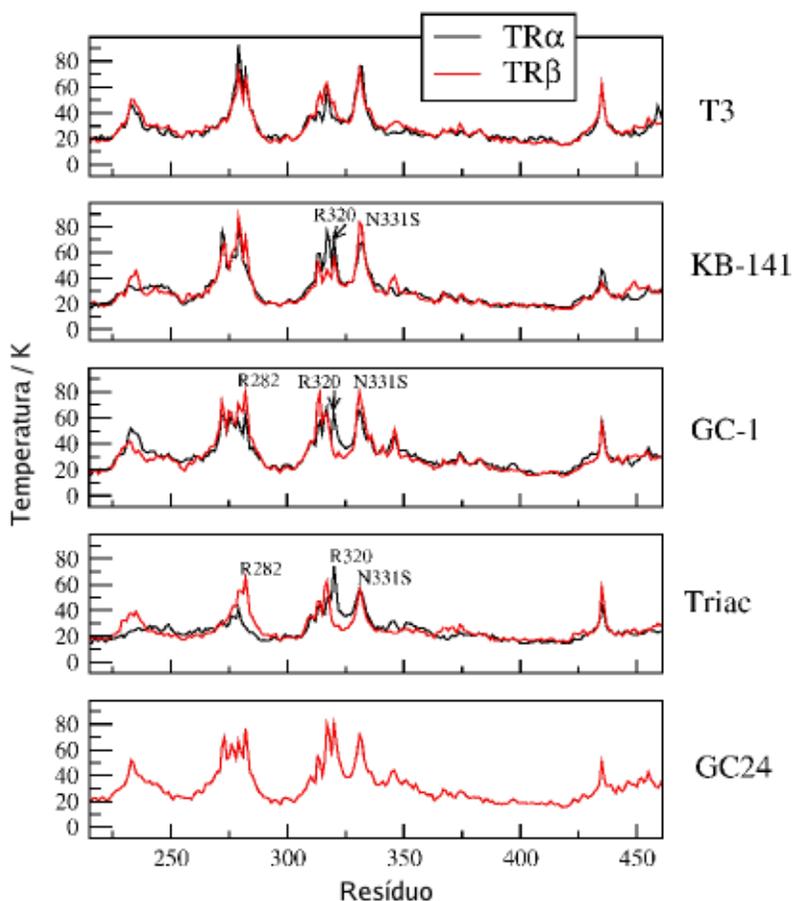
<sup>2</sup>A probabilidade de um resíduo escolhido aleatoriamente no LBD ter uma função identificada é de aproximadamente 0,5. A probabilidade de que 10 resíduos tenham essa propriedade é, portanto,  $0,5^{10}$ .



**Figura 7.8.** Resposta dos LBDs ao aquecimento do T3: (a) TR $\alpha$  e (b) TR $\beta$ . A transferência de energia não é apenas dependente da distância, como pode ser observado pela diferença da temperatura observada com relação à expectativa isotrópica.

Como vimos, são conhecidos vários ligante  $\beta$ -seletivos, e as estruturas cristalográficas para vários deles estão disponíveis. Fizemos as simulações da propagação do calor a partir de cada um destes ligantes. As respostas dos receptores estão representadas na Figura 7.9.

Um inspeção cuidadosa da Figura 7.9 mostra que a resposta das isoformas  $\alpha$  e  $\beta$  ao aquecimento são mais semelhantes para o T3 que para os ligantes  $\beta$ -seletivos KB-141, GC1 e Triac (não há estrutura cristalográfica do GC-24 ligado ao TR $\alpha$  disponível). Há diferenças diretamente relacionadas com a posição 331 do TR $\beta$  para os aquecimentos do GC-1 e do KB-141. A substituição N331S é a única diferença entre aminoácidos próximos do sítio ativo entre as duas isoformas. A diferença de afinidade dos ligantes costuma estar fortemente associada a esta mutação, em particular para o GC-1 e para o Triac [52]. Esta substituição muitas vezes parece afetar a afinidade dos ligantes alterando a forma como eles interagem com as argininas 282 e 320, e estas também apresentam respostas térmicas distintas



**Figura 7.9.** Resposta dos LBDs ao aquecimento de ligantes  $\beta$ -seletivos. As temperaturas resultantes em cada isoforma são mais semelhantes para o aquecimento do T3 do que para o aquecimento de ligantes seletivos.

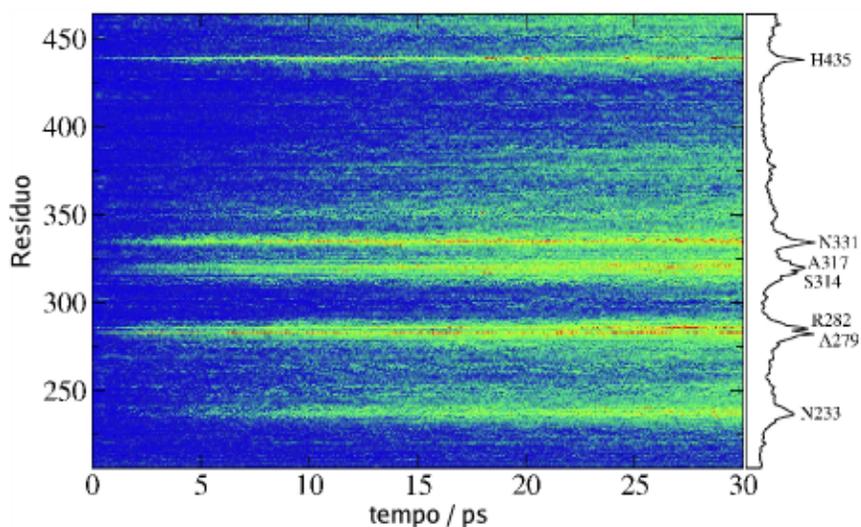
ao aquecimento destes ligantes.

Os resíduos que respondem de forma diferente nas duas isoformas estão listados na Tabela 7.2. Alguns destes resíduos já eram conhecidos por afetar a seletividade de ligantes, e outros estão relacionados com a Síndrome da Resistência ao Hormônio Tireoideano. Em particular a Leu450 não interage diretamente com o ligante, mas a mutação L450H provoca THR [161]. Os resíduos do final da hélice 1 (próximos ao resíduo N233 do TR $\beta$ ) também foram afetados de forma diferente em cada isoforma. Para o KB-141 e para o Triac a resposta térmica do TR $\beta$  é mais forte

Ligante	Resíduos
KB-141	Q235, R282, S314, A317, R320, N331, L346 e L450
GC-1	A279, R282, S314, R320 e N331
Triac	Q235, A279, R282, A317 e R320

**Tabela 7.2.** Resíduos que respondem ao aquecimento dos ligantes  $\beta$ -seletivos de forma diferente nos receptores  $\alpha$  e  $\beta$  (Numeração de acordo com o TR $\beta$ ).

do que a resposta térmica do TR $\alpha$  nesta região. Para o GC-1, na mesma região, a resposta do TR $\alpha$  é mais forte. Estas características podem estar ligadas com a capacidade de cada ligante de transmitir sinais para a H1 e, portanto, para o DBD. O mecanismo de dissipação de calor para a H1 é relativamente lento, como veremos.

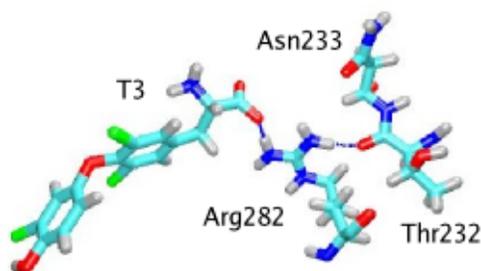


**Figura 7.10.** Dependência temporal da resposta de cada resíduo do TR $\beta$  ao aquecimento do ligante T3. A passagem de azul a vermelho indica o aquecimento de cada resíduo.

### 7.3.6 Variação temporal da propagação do calor

A Figura 7.10 mostra a dependência temporal da difusão térmica como resposta ao aquecimento do T3 na isoforma TR $\beta$ . Os picos relativos às respostas dos resíduos H435, N331, A317/S314 e R282/A279 começam a aparecer em menos de 2 ps. Por outro lado, o importante processo difusivo que leva ao aquecimento da N233 começa apenas após 5 ps de simulação.

O aquecimento da Asn233 é particularmente interessante porque este resíduo pertence ao fim da hélice 1 e não forma interações diretas com o ligante. O mecanismo pelo qual a energia se propaga para a Asn233 envolve primeiro o aquecimento da Arg282, que forma uma ligação de hidrogênio com a Thr232, como mostra a Figura 7.11. O calor se propaga primeiro para a Arg282, em seguida para a Thr232 e finalmente para a Asn233, explicando porque o sinal da Asn233 parece retardado em relação aos outros aquecimentos importantes. O mesmo mecanismo pode ser observado para o TR $\alpha$ . Esta rede de conectividade pode estar relacionada com processos de sinalização que correlacionam o ligante com a H1, e é a única resposta térmica importante ao aquecimento do ligante que não está relacionada com contatos diretos deste no sítio ativo.



**Figura 7.11.** Mecanismo de difusão térmica a partir do ligante que leva ao aquecimento da Asn233, passando pela Arg282 e pela Thr232. Este mecanismo pode estar associado à transmissão de sinal para o DBD.

## 7.4 Conclusões

Neste estudo da difusão térmica em proteínas foi demonstrado que o calor se difunde através da estrutura dos LBDs dos TRs por basicamente três caminhos: a propagação através da cadeia covalente diretamente ligada ao resíduo aquecido, a transmissão de energia para resíduos próximos que formam interações não covalentes e, por fim, a difusão do calor através da cadeia covalente próxima aos resíduos aquecidos indiretamente. A difusão covalente parece não estar relacionada com a natureza química dos resíduos e é principalmente dependente da posição do resíduo na seqüência primária da proteína.

A difusão térmica que ocorre pelo mecanismo não-covalente está relacionada com natureza da cadeia lateral do resíduo envolvido. Os resíduos carregados, com notável destaque para as argininas, são os difusores de calor mais importantes nos TRs. Esta importância parece estar relacionada com a orientação de suas cadeias laterais. Curiosamente, várias argininas formam pontes salinas com carboxilatos de ácidos aspárticos ou glutâmicos, mas a importância destes no processo de difusão térmica não é tão clara como a das argininas correspondentes.

Os resíduos mais importantes para a difusão térmica nos TRs tinham sido previamente identificados como resíduos funcionais, e participam de vários processos biofísicos importantes. Mutações nestes resíduos geralmente causam a Síndrome da Resistência ao Hormônio Tireoidiano. Aparentemente, portanto, a conectividade destes resíduos e a difusão térmica associada estão correlacionados com sua importância funcional. A única arginina que não foi identificada como um resíduo particularmente importante para a difusão térmica também é a única arginina para qual um papel funcional ainda não foi identificado.

Os mecanismos de difusão térmica a partir dos ligantes mostram que há caminhos que os conectam à hélice 1 dos LBDs e, desta forma, ao DBD. A difusão térmica é importante mas é lenta, em vista de que envolve a transmissão do calor por uma cadeia de ligações de hidrogênio e covalentes. A resposta térmica do receptor ao aquecimento de ligantes  $\beta$ -seletivos é diferente para cada isoforma, e está correlacionada com a importância dos resíduos para a afinidade dos ligantes.

Resumindo, este estudo descreve a aplicação da técnica ATD aos receptores nucleares. A técnica foi explorada de forma que uma visão completa dos mecanismos

de difusão térmica em proteínas fosse possível. A maior parte dos resultados apresentados aqui provavelmente são válidos para outros receptores nucleares e para outras proteínas. Em particular, fizemos também um estudo da difusão térmica com os mesmos princípios para um subdomínio da PDZ, e observamos resultados equivalentes. Esta foi a proteína estudada originalmente por Ota e Agard [135] quando a técnica ATD foi introduzida, mas no trabalho original apenas o aquecimento de alguns poucos resíduos foi considerado. As representações da difusão térmica propostas neste trabalho dão uma visão nova e complementar dos processos de relaxação da energia cinética em proteínas, dão novas indicações a respeito dos mecanismos de sinalização em receptores nucleares, e podem ser usadas como novas ferramentas para a identificação de resíduos funcionalmente importantes.

## Capítulo 8

# Conclusões

Os receptores nucleares são proteínas que controlam a transcrição gênica em eucariotos. São proteínas formadas por três domínios, sendo o domínio C-terminal, o LBD, responsável pela sua ligação com pequenas moléculas, os hormônios. Os hormônios, na maioria dos receptores, controlam sua atividade, induzindo a transcrição dos genes alvo. O controle da transcrição por moléculas pequenas têm grande importância farmacológica: hormônios sexuais, corticóides, o hormônio tireoidiano e a Vitamina A, por exemplo, atuam sobre receptores nucleares. Desta forma, os mecanismos moleculares envolvidos na regulação gênica por parte dos receptores são de grande interesse científico.

Apenas em meados da década de 90 foram obtidas as primeiras estruturas cristalográficas de LBDs de receptores nucleares. Estas estruturas forneceram claros fundamentos moleculares para o reconhecimento dos ligantes. No entanto, à medida que novos dados funcionais foram obtidos, as estruturas cristalográficas têm se mostrado insuficientes para uma completa elucidação das relações entre estrutura e atividade dos receptores. Em particular, existem inúmeras mutações que causam doenças humanas cujos efeitos nos receptores não são evidentes pela observação da estrutura. Além disso, muitas moléculas de interesse farmacológico têm propriedades interessantes que não são imediatamente compreendidas através da análise dos modelos cristalográficos.

Apesar disso, poucos estudos foram feitos procurando entender o papel da dinâmica molecular na função dos receptores. Nesta tese, vários aspectos da dinâmica dos LBDs dos receptores do hormônio tireoidiano foram abordados. Os

principais resultados obtidos foram:

### **Mecanismos de dissociação**

Três mecanismos de dissociação foram propostos usando simulações de Dinâmica Molecular com Amostragem Ampliada. Dois destes mecanismos não envolvem o movimento da hélice 12 e, portanto, não são contraditórios com a associação de correpressores e coativadores. Estudos de Dinâmica Molecular com Caminho Induzido mostram que um destes mecanismos é o mais favorável. A dissociação é favorecida porque as interações hidrofílicas do ligante com o LBD são substituídas por interações com moléculas de água. Estes resultados explicam, por exemplo, por que o aumento da hidrofobicidade das extremidades polares do ligante geralmente provocam uma diminuição em suas afinidades. Estratégias racionais para o desenvolvimento de ligantes com grande afinidade foram propostas.

### **Mecanismos de associação**

O estudo da associação dos ligantes aos LBDs dos TRs foi feito usando uma generalização da técnica DMCI. Esta generalização foi desenvolvida para que caminhos curvos pudessem ser estudados. A técnica se mostrou satisfatória, uma vez que trajetórias de associação bem sucedidas foram obtidas. Não há uma preferência clara em relação a um dos caminhos de associação, como ocorre para a dissociação. Desta forma, as simulações indicam que a associação pode ocorrer por vários mecanismos, provavelmente favorecidos em um ou outro contexto biofísico de acordo com a mobilidade da estrutura sem ligante.

### **A seletividade do Triac**

As estruturas cristalográficas do Triac ligado ao LBD dos TRs são aparentemente contraditórias com a seletividade observada para este ligante. Estas estruturas sugerem que o Triac interage mais fortemente com o LBD do TR $\alpha$  do que com o LBD do TR $\beta$ , apesar de ele ser  $\beta$ -seletivo. As simulações mostram que, de fato, a interação ligante-LBD é mais forte no TR $\alpha$ . No entanto, a inclusão das moléculas de água minimiza estas diferenças, levando a modos de ligação energeticamente semelhantes entre as duas isoformas. O Triac é mais fortemente solvatado na

---

estrutura do TR $\beta$ . Esta solvatação preferencial se deve a uma maior cavidade de ligação, que se forma pela interação da cadeia lateral da Asn331 com a Arg228. A entrada de água na cavidade aumenta a mobilidade do ligante. A maior mobilidade do ligante na estrutura do TR $\beta$  sugere que fatores entrópicos levam à  $\beta$ -seletividade do Triac.

### **A seletividade do ligante GC-1**

Diferentemente do que ocorre com o Triac, as estruturas do ligante GC-1 ligado aos TRs são coerentes com a seletividade observada. O GC-1 é  $\beta$ -seletivo, e interações fortes entre o carboxilato deste ligante e a Arg282 podem ser observadas na estrutura do TR $\beta$ . Nas estruturas do TR $\alpha$  estas interações parecem ser mais fracas, de acordo com uma variedade de conformações da cadeia lateral da Arg228. As simulações mostram que, de fato, a energia de interação do GC-1 com o LBD na estrutura do TR $\beta$  é mais favorável do que no TR $\alpha$ . As contribuições para esta diferença de energia vêm das conformações da Arg282, mas também de interações eletrostáticas com aminoácidos carregados distantes do sítio ativo. Estas diferenças são, no entanto, minimizadas pela presença da água e dos contra-íons, sugerindo que as medidas de afinidade experimentais devem ser feitas controlando-se a força iônica do meio. A maior estabilidade da conformação produtiva da Arg282 no TR $\beta$  vêm da capacidade deste resíduo de interagir simultaneamente com o carboxilato do ligante e com a carbonila da Asn331. No TR $\alpha$  a asparagina é substituída por uma serina, com uma cadeia lateral menor, e as interações da Arg228 com o carboxilato ou com a serina competem entre si, diminuindo a estabilidade da conformação produtiva.

### **Mecanismos de desnaturação**

Os experimentos mostram que os LBDs dos TRs são fortemente estabilizados pela ligação do Triac e de outros ligantes. Como estes experimentos foram feitos usando medidas de dicróismo circular, o ligante têm que estabilizar fortemente a estrutura secundária da proteína. Isto só pode ocorrer se a estrutura terciária também for preservada, de forma que o ligante permaneça no interior da estrutura. Simulações de dinâmica molecular de desnaturação dos LBDs induzida por temperatura con-

firmam esta interpretação. As simulações mostram que a estrutura secundária se perde antes da expansão da estrutura. O ligante sai do LBD após um desenvolvimento significativo das hélices. A estabilização do LBD pela associação do Triac parece estar associada ao fortalecimento das interações entre as hélices 8 e 11 e à proteção da hélice 6 do solvente. O mecanismo de desnaturação observado sugere que o enovelamento do LBD se inicia pelo colapso hidrofóbico, seguido do enovelamento das hélices internas e, finalmente, das hélices externas.

### **Mecanismos de difusão térmica**

O estudo sistemático da difusão térmica a partir do aquecimento de cada resíduo dos LBDs dos TRs, individualmente, mostrou que existem três mecanismos envolvidos na propagação do calor: a transmissão do calor através da cadeia covalente, a transmissão através de contatos próximos e a dissipação de calor através da cadeia próxima a resíduos aquecidos indiretamente. Curiosamente, há resíduos que são particularmente importantes para a difusão térmica. Nos TRs, estes resíduos são praticamente todos argininas. Todos os dez resíduos mais importantes para a difusão térmica estão relacionados com mutações que causam problemas funcionais nos LBDs. É possível que várias proteínas possuam resíduos particularmente importantes para a difusão térmica. Estes podem ser responsáveis por favorecer a estabilidade do enovelamento pela dissipação de perturbações cinéticas. A difusão térmica a partir dos ligantes parece estar relacionada com suas seletividades. Além disso, mecanismos de difusão que associam a dinâmica do ligante com a dinâmica da hélice 1 foram identificados. Estes mecanismos são particularmente interessantes porque são retardados no tempo em relação à difusão térmica para resíduos próximos.

## **8.1 Perspectivas**

Além dos estudos de dissociação aqui apresentados, há estudos feitos para a dissociação do ácido retinóico do RAR apenas. A extensão destes trabalhos para outros receptores deve fornecer resultados interessantes do ponto de vista da generalidade dos mecanismos observados, ou das especificidades envolvidas em cada ligante ou LBD. Os mecanismos de associação, por sua vez, têm que ser estudados com mais

detalhes e, possivelmente, complementados pela simulação da entrada de ligantes em receptores para os quais as estruturas *apo* estejam disponíveis. Estudos tanto da associação como da dissociação dos ligante na presença dos cofatores podem também fornecer resultados interessantes.

Existem vários desafios para a compreensão da afinidade e da seletividade dos ligantes dos TRs. Estudos similares aos apresentados para o Triac e para o GC-1 podem ser feitos para outros ligantes  $\beta$ -seletivos, importantes, como o KB-141 e o GC-24. De forma geral, os detalhes dos mecanismos envolvidos na seletividade destes ligantes não são bem compreendidos. Por exemplo, a seletividade do GC-24 está parcialmente associada à sua extensão na posição 5', mas não se sabe qual a razão estrutural do TR $\beta$  ser capaz de acomodar estas extensões melhor que o TR $\alpha$ . Outros desafios, como a compreensão do papel da conjugação na distribuição de carga de ligantes que possuem oxigênios como substituintes aromáticos podem revelar aspectos novos da interação do hormônios com os LBDs.

Os mecanismos de desnaturação obtidos aqui foram bastante aproximados, devido à metodologia empregada. Outras técnicas experimentais e de simulação devem ser empregadas para que uma elucidação completa dos detalhes, em particular do papel estabilizador dos ligantes, seja obtida. Possíveis estudos envolvem a determinação dos estados de transição a partir das simulações feitas [114].

Por fim, os mecanismos de difusão térmica parecem estar relacionados com aspectos fundamentais da estrutura dos LBDs. A identificação dos resíduos relevantes para a difusão do calor em outros receptores e em outras proteínas pode revelar se os resultados observados para os TRs são gerais ou não. A grande correlação da importância de alguns resíduos com sua funcionalidade indica que, pelo menos, a técnica é capaz de identificar resíduos funcionalmente importantes. É possível, ainda, que várias proteínas possuam mecanismos de difusão térmica que estabilizam seu enovelamento. Experimentos de mutagênese estão sendo feitos nos TRs para avaliar esta hipótese. Além disso, estudos da transferência de energia realizados por Milton T. Sonoda têm sugerido mecanismos para a comunicação alostérica dos ligantes em heterodímeros.



## Referências Bibliográficas

- [1] R. T. Nolte, G. B. Wisely, S. Westin, J. E. Cobb, M. H. Lambert, R. Kurokawa, M. G. Rosenfeld, T. M. Wilson, C. K. Glass, and M. V. Milburn. Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Nature*, 395:137–143, 1998.
- [2] L. Wang, W. J. Zuercher, T. G. Consler, M. H. Lambert, A. B. Miller, L. A. Orband-Miller, D. D. McKee, T. M. Willson, and R. T. Nolte. X-ray crystal structures of the estrogen-related receptor-gamma ligand binding domain in three functional states reveal the molecular basis of small molecule regulation. *J. Biol. Chem.*, 281:37773–37781, 2006.
- [3] H. Greschik, R. Flaig, J. P. Renaud, and D. Moras. Structural basis for the deactivation of the estrogen-related receptor gamma by diethylstilbestrol or 4-hydrotamoxifen and determinants of selectivity. *J. Biol. Chem.*, 279:33639–33646, 2004.
- [4] J. Kallen, J. M. Schlaeppli, F. Bitsch, I. Filipuzzi, A. Schlib, V. Riou, A. Graham, A. Strauss, M. Geiser, and B. Fournier. Evidence for ligand-independent transcriptional activation of the human estrogen-related receptor alpha (ERR alpha) - Crystal structure of ERR alpha ligand binding domain in complex with peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1 alpha. *J. Biol. Chem.*, 279:49330–49337, 2004.
- [5] J. R. Min, A. Schuetz, P. Loppnau, J. Weigelt, M. Sundstrom, C. H. Arrowsmith, A. M. Edwards, A. Bochkarev, and A. N. Plotnikov. Crystal structure of human NR4A1 Ligand Bindind Domain. *To be published*, 2007.

- 
- [6] K. D. Baker, L. M. Shewchuk, T. Kozlova, M. Makishima, A. Hassell, B. Wisely, J. A. Caravella, M. H. Lambert, J. L. Reinking, H. Krause, C. S. Thummel, T. M. Wilson, and D. J. Mangelsdorf. The *Drosophila* orphan nuclear receptor DHR38 mediates an atypical ecdysteroid signaling pathway. *Cell*, 113:731–742, 2003.
- [7] R. L. Wagner et al. A structural role for hormone in the thyroid hormone receptor. *Nature*, 378:690–697, 1995.
- [8] K. W. Nettles and G. L. Greene. Ligand control to coregulator recruitment to nuclear receptors. *Ann. Rev. Physiol.*, 67:309–333, 2005.
- [9] D. Voet, J. G. Voet, and C. W. Pratt. *Fundamentals of Biochemistry*. John Wiley & Sons, Inc., 1999.
- [10] R. C. J. Ribeiro et al. The nuclear hormone receptor gene superfamily. *Ann. Rev. Med.*, 46:443–453, 1995.
- [11] Z. Wang et al. Structure and function of Nurr1 identifies a class of ligand-independent nuclear receptors. *Nature*, 423:555–560, 2003.
- [12] W. Bourguet, P. Germain, and H. Gronemeyer. Nuclear receptor ligand-binding domains: three-dimensional structures, molecular interactions and pharmacological implications. *Trends Pharmacol. Sci.*, 21:381–388, 2000.
- [13] J. W. R. Schwabe et al. The crystal structure of the estrogen receptor DNA binding domain bound to DNA: how receptors discriminate between their response elements. *Cell*, 75:567–568, 1993.
- [14] T. Nagaya and J. L. Jameson. Thyroid hormone receptor dimerization is required for dominant negative inhibition by mutations that cause thyroid hormone resistance. *J. Biol. Chem.*, 268:15766–15771, 1993.
- [15] R. T. Gampe et al. Asymmetry in the PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$  Crystal Structure Reveals the Molecular Basis of Heterodimerization among Nuclear Receptors. *Mol. Cell.*, 5:545–555, 2000.

- [16] J. P. Renaud et al. Crystal structure of the RAR- $\gamma$  ligand binding domain bound to all-trans retinoic acid. *Nature*, 378:681–689, 1995.
- [17] A. M. Brzozowski et al. Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature*, 389:753–758, 1997.
- [18] R. K. Bledsoe et al. Crystal structure of the glucocorticoid receptor ligand binding domain reveals a novel mode of receptor dimerization and coactivator recognition. *Cell*, 110:93–105, 2002.
- [19] R. C. Ribeiro, W. Feng, R. L. Wagner, C. H. Costa, A. C. Pereira, J. W. Apriletti, R. J. Fletterick, and J. D. Baxter. Definition of the surface in the thyroid hormone receptor ligand binding domain for association as homodimers and heterodimers with retinoid X receptor. *J. Biol. Chem.*, 4:14987–14995, 2001.
- [20] H. Gronemeyer, J. A. Gustafsson, and V. Laudet. Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nat. Rev. Drug Disc.*, 2:950–964, 2004.
- [21] H. Fisher et al. Low resolution structures of the retinoid X receptor DNA-binding and ligand-binding domains revealed by synchrotron x-ray solution scattering. *J. Biol. Chem.*, 278:16030–16038, 2003.
- [22] A. S. Nascimento, S. M. Dias, F. M. Nunes, A. L. B. Ambrósio R. Aparício, L. Bleicher, A. C. M. Figueira, M. D. Neto M. A. M. Santos, H. Fischer, M. Togashi, A. F. Craievich, R. C. Garrat, J. D. Baxter, P. Webb, and I. Polikarpov. Structural rearrangements in the thyroid hormone receptor hinge domain and their putative role in receptor function. *J. Mol. Biol.*, 360:586–598, 2004.
- [23] J. P. Renaud et al. Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR- $\alpha$ . *Nature*, 375:377–382, 1995.
- [24] K. E. Carlson A. Tamrazi and J. A. Katzenellenbogen. Molecular sensors of estrogen receptor conformations and dynamics. *Mol. Endocrinol.*, 17:2593–2602, 2003.

- [25] N. Greenfield, V. Vijayanathan, T. J. Thomas, M. A. Gallo, and T. Thomas. Increase in the Stability and Helical Content of Estrogen Receptor  $\alpha$  in the Presence of the Estrogen Response Element: Analysis by Circular Dichroism Spectroscopy. *Biochemistry*, 40:6646–6652, 2001.
- [26] S. K. Nair, T. J. Thomas, N. J. Greenfield, A. Chen, H. He, and T. Thomas. Conformatinal dynamics of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  as revealed by intrinsic tryptophan fluorescence and circular dichroism. *J. Mol. Endocrinol.*, 35:211–223, 2005.
- [27] J. A. Holt, T. G. Consler, S. P. Williams, A. H. Ayscue, L. M. Leesnitzer, G. B. Wisely, and A. N. Billin. Helix 1/8 Interactions Influence the Activity of Nuclear Receptor Ligand-Binding Domains. *Mol. Endocrinol.*, 17:1704–1714, 2003.
- [28] B. C. Kallenberger et al. A dynamic mechanism of nuclear receptor activation and its perturbation in a human disease. *Nat. Struct. Biol.*, 10:136–140, 2003.
- [29] Y. A. Elhaji, I. Stoica, S. Dennis, E. O. Purisima, and M. A. Trifiro. Impaired helix 12 dynamics due to proline 892 substitutions in the androgen receptor are associated with complete androgen insensitivity. *Hum. Molec. Genet.*, 15:921–931, 2006.
- [30] R. Métivier et al. A Dynamic Structural Model for Estrogen Receptor- $\alpha$  Activation by Ligands, Emphasizing the Role of Interactions between Distant A and E Domains. *Mol. Cell*, 10:1019–1032, 2002.
- [31] B. R. Huber, B. L. Desclozeaux, B. L. West, S. T. C. Lima, H. T. Nguyen, J. D. Baxter, H. A. Ingraham, and R. J. Fletterick. Thyroid hormone receptor-beta mutations conferring hormone resistance and reduced corepressor release exhibit decreased stability in the N-terminal ligand-binding domain. *Mol. Endocrinol.*, 17:107–116, 2003.
- [32] B. R. Huber, M. Desclozeaux, B. L. West, S. T. C. Lima, H. T. Nguyen, J. W. Apriletti, J. D. Baxter, and R. Fletterick. Two RTH mutants with impaired hormone binding. *Mol. Endocrinol.*, 17:643–652, 2003.

- [33] F. Molnar, M. Perakyla, and C. Carlberg. Vitamin D Receptor Agonists Specifically Modulate the Volume of the Ligand-binding Pocket. *J. Biol. Chem.*, 281:10516–10526, 2006.
- [34] C. Carlberg and F. Molnar. Detailed Molecular Understanding of the Agonistic and Antagonistic Vitamin D Receptor Ligands. *Curr. Top. Med. Chem.*, 6:1243–1253, 2006.
- [35] P. F. Egea et al. Crystal structure of the human RXR $\alpha$  ligand-binding domain bound to its natural ligand: 9-*cis* retinoic acid. *EMBO J.*, 19:2592–2601, 2000.
- [36] B. D. Darimont, R. L. Wagner, J. W. Apriletti, M. R. Stallcup, P. J. Kushner, J. D. Baxter, R. J. Fletterick, and K. R. Yamamoto. Structure and specificity of nuclear receptor-coactivator interactions. *Genes Dev.*, 12:3343–3356, 1998.
- [37] A. K. Shiau et al. The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by Tamoxifen. *Cell*, 95:927–937, 1998.
- [38] L. Frego and W. Davidson. Conformational changes of the glucocorticoid receptor ligand binding domain induced by ligand and cofactor binding, and the location of cofactor binding sites determined by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *Prot. Sci.*, 15:722–730, 2006.
- [39] K. E. Carlson, I. Choi, A. Gee, B. S. Katzenellenbogen, and J. A. Katzenellenbogen. Altered ligand binding properties and enhances stability of a constitutively active estrogen receptor: evidence that an open pocket conformation is required for ligand interaction. *Biochemistry*, 36:14897–14905, 1997.
- [40] L. Celik, J. D. D. Lund, and B. Schiott. Conformational dynamics of the estrogen receptor  $\alpha$ : Molecular dynamics simulations of the influence of binding site structure on protein dynamics. *Biochemistry*, 46:1743–1758, 2007.

- [41] A. Blondel et al. Retinoic Acid Receptor: a simulation analysis of Retinoic Acid binding and the resulting conformational changes. *J. Mol. Biol.*, 291:101–115, 1999.
- [42] P. Carlsson, S. Burendahl, and L. Nilsson. Unbinding of retinoic acid from the retinoic acid receptor by random expulsion molecular dynamics. *Biophys. J.*, 9:3151–3161, 2006.
- [43] B. Windshugel, J. Jyrkkarinne, A. Poso, P. Honkakoski, and W. Sippl. Molecular dynamics simulations of the human CAR ligand-binding domain: deciphering the molecular basis for constitutive activity. *J. Mol. Model.*, 11:69–79, 2005.
- [44] D. Kosztin, S. Izrailev, and K. Schulten. Unbinding of retinoic acid from its receptor studied by steered molecular dynamics. *Biophys. J.*, 76:188–197, 1999.
- [45] A. C. Gee and J. A. Katzenellenbogen. Probing conformational changes in the estrogen receptor: Evidence for a partially unfolded intermediate facilitating ligand binding and release. *Mol. Endocrinol.*, 15:421–428, 2001.
- [46] P. Webb. Selective activators of thyroid hormone receptors. *Expert. Opin. Investig. Drugs*, 13:489–500, 2004.
- [47] J. W. Apriletti et al. Molecular and structural biology of thyroid hormone receptors. *Clinic. Exper. Pharm. Phys.*, 25:S2–S11, 1998.
- [48] B. Sandler et al. Thyroxine-thyroid hormone receptor interactions. *J. Biol. Chem.*, 279:55801–55808, 2004.
- [49] L. Ye et al. Thyroid receptor ligands. 1. Agonist ligands selective for the thyroid receptor  $\beta 1$ . *J. Med. Chem.*, 46:1580–1588, 2003.
- [50] S. Y. Wu et al. Alternate pathways of thyroid hormone metabolism. *Thyroid*, 15:943–958, 2005.
- [51] P. A. Schueler, H. L. Schwartz, K. A. Strait, C. N. Mariash, and J. H. Oppenheimer. Binding of 3,5,3'-Triiodothyronine (T3) and its analogs to

- the invitro translational products of c-erba protooncogenes - differences in the affinity of the  $\alpha$ -forms and  $\beta$ -forms for the acetic-acid analog and failure of the human testis and kidney  $\alpha$ -2-products to bind T3. *Mol. Endocrinol.*, 4:227–234, 1990.
- [52] R. L. Wagner et al. Hormone selectivity in thyroid hormone receptors. *Mol. Endocrinol.*, 15:398–410, 2001.
- [53] T. N. Collingwood et al. A role for helix 3 of the TRbeta ligand-binding domain in coactivator recruitment identified by characterization of a third cluster of mutations in resistance to thyroid hormone. *EMBO J.*, 17:4760–4770, 1998.
- [54] P. Webb et al. Design of thyroid hormone receptor antagonists from first principles. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 83:59–73, 2002.
- [55] G. Chiellini et al. A high-affinity subtype-selective agonist ligand for the thyroid hormone receptor. *Chemistry & Biology*, 5:299–306, 1998.
- [56] S. U. Trost et al. The thyroid hormone receptor-beta-selective agonist GC-1 differentially affects plasma lipids and cardiac activity. *Endocrinology*, 141:3057–3064, 2000.
- [57] G. J. Grover, D. M. Egan, P. G. Sleph, B. C. Beehler, G. Chiellini, N. H. Nguyen, J. D. Baxter, and T. S. Scanlan. Effects of the thyroid hormone receptor GC-1 on metabolic rate and cholesterol in rats and primates: selective actions relative to 3,5,3'-triiodo-L-thyronine. *Endocrinology*, 145:1656–1661, 2004.
- [58] A. Columbano et al. The thyroid hormone receptor- $\beta$  agonist gc-1 induces cell proliferation in rat liver and pancreas. *Endocrinology*, 147:3211–3218, 2006.
- [59] M. A. Lazar. Editorial: A sweetheart deal for thyroid hormone. *Endocrinology*, 141:3055–3056, 2000.

- [60] J. J. Hangeland et al. Thyroid receptor ligands. Part 2. Thyromimetics with improved selectivity for the thyroid hormone receptor  $\beta$ . *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 14:3549–3553, 2004.
- [61] T. Tagami, W. X. Gu, P. T. Peairs, B. L. West, and J. L. Jameson. A novel natural mutation in the thyroid hormone receptor defines a dual functional domain that exchanges nuclear receptor corepressors and coactivators. *Mol. Endocrinol.*, 12:1888–1902, 1998.
- [62] A. C. Gee, K. E. Carlson, P. G. Martini, B. S. Katzenellenbogen, and J. A. Katzenellenbogen. Coactivator peptides have differential stabilizing effects on the binding of estrogens and antiestrogens with the estrogen receptor. *Mol. Endocrinol.*, 13:1912–1923, 1999.
- [63] K. Koheler et al. Thyroid receptor ligands. 6. A high affinity ‘direct antagonist’ selective for the thyroid hormone receptor. *J. Med. Chem.*, 49:6635–6637, 2006.
- [64] S. Borngraeber, M. J. Budny, G. Chiellini, S. T. C. Lima, M. Togashi, P. Webb, J. D. Baxter, T. S. Scanlan, and R. J. Fletterick. Ligand selectivity by seeking hydrophobicity in thyroid hormone receptors. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 100:15358–15363, 2003.
- [65] H. A. I. Yoshihara, J. W. Aprilletti, J. D. Baxter, and T. S. Scanlan. Structural Determinants of Selective Thyromimetics. *J. Med. Chem.*, 46:3152–3161, 2003.
- [66] A. Hedfors et al. Thyroid receptor ligands. 3. Design and synthesis of 3,5-dihalo-4-alkoxyphenylalkanoic acids as indirect antagonists of the thyroid hormone receptor. *J. Med. Chem.*, 48:3114–3117, 2005.
- [67] Y. Li et al. Thyroid receptor ligands. Part 4: 4'-amido bioisosteric ligands selective for the thyroid hormone receptor beta. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 16:884–886, 2006.

- [68] A. G. Collazo et al. Thyroid receptor ligands. Part 5: Novel bicyclic agonist ligands selective for the thyroid hormone receptor  $\beta$ . *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 16:1240–1244, 2006.
- [69] F. M. Nunes, R. Aparício, M. A. M. Santos, R. V. Portugal, S. M. G. Dias, F. A. R. Neves, L. A. Simeoni, P. Webb J. D. Baxter, and I. Polikarpov. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of isoform  $\alpha 1$  of the human thyroid hormone receptor ligand-binding domain. *Act. Cryst. D*, 10:1867–1870, 2004.
- [70] L. Martínez, P. Webb, M. S. Skaf, and I. Polikarpov. 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.*, 49:23–26, 2006.
- [71] A. Q. Hassan and J. T. Koh. A functionally orthogonal ligand-receptor pair created by targeting the allosteric mechanism of the thyroid hormone receptor. *J. Am. Chem. Soc.*, 128:8868–8874, 2006.
- [72] A. Szabo and N. S. Ostlung. *Modern Quantum Chemistry - Introduction to Advanced Electronic Structure Theory*. Dover Publications, New York, 1996.
- [73] R. S. Berry, S. A. Rice, and J. Ross. *Physical Chemistry*. Oxford University Press, 2000.
- [74] J.-P. Hansen and I. R. McDonald. *Theory of Simple Liquids*. Academic Press, San Diego, CA, 1986.
- [75] B. M. Ladanyi and M. S. Skaf. Computer Simulation of Hydrogen-Bonding Liquids. *Ann. Rev. Phys. Chem.*, 44:335–368, 1993.
- [76] J. M. Martínez and L. Martínez. Packing optimization for automated generation of complex system’s initial configurations for molecular dynamics and docking. *J. Comput. Chem.*, 24:819–825, 2003.
- [77] L. Verlet. Computer experiments on classical fluids. I. Thermodynamical properties of Lennard-Jones molecules. *Phys. Rev.*, 159:98–103, 1967.

- [78] R. P. Feynman, R. B. Leighton, and M. Sands. *The Feynman Lectures on Physics*, volume 1. Addison-Wesley, 1963.
- [79] W. C. Swope, H. C. Andersen, P. H. Berens, and K. R. Wilson. A computer-simulation method for the calculation of equilibrium constants for the formation of physical clusters of molecules - application to small water clusters. *J. Chem. Phys.*, 76:637–649, 1982.
- [80] J. C. Phillips, R. Braun, W. Wang, J. Gumbart, E. Tajkhorshid, E. Villa, C. Chipot, R. D. Skeel, L. Kale, and K. Schulten. Scalable molecular dynamics with NAMD. *J. Comp. Chem.*, 26:1781–1802, 2005.
- [81] L. Martínez. Estudo computacional dos mecanismos de dissociação do seu receptor nuclear. *Dissertação de Mestrado*, 2003.
- [82] R. Elber and M. Karplus. Enhanced sampling in molecular dynamics: use of the time-dependent Hartree approximation for a simulation of carbon monoxide diffusion through myoglobin. *J. Am. Chem. Soc.*, 112:9161–9175, 1990.
- [83] B. Isralewitz, M. Gao, and K. Schulten. Steered molecular dynamics and mechanical functions of proteins. *Curr. Op. Struct. Biol.*, 11:224–230, 2001.
- [84] B. A. Johnson, E. M. Wilson, Y. Li, D. E. Moller, R. G. Smith, and G. Zhou. Ligand-induced stabilization of PPAR $\gamma$  monitored by NMR spectroscopy: implications for nuclear receptor activation. *J. Mol. Biol.*, 298:187–194, 2000.
- [85] P. Pissios, I. Tzamelis, P. J. Kushner, and D. Moore. Dynamic Stabilization of Nuclear Receptor Ligand Binding Domains by Hormone or Corepressor Binding. *Mol. Cell*, 6:245–253, 2000.
- [86] R. V. Weatherman, R. J. Fletterick, and T. S. Scanlan. Nuclear-receptor ligands and ligand-binding domains. *Annu. Rev. Biochem.*, 68:559–581, 1999.
- [87] A. S. Budhu and N. Noy. On the role of the carboxyl-terminal helix of RXR in the interactions of the receptor with ligand. *Biochemistry*, 39:4090–4095, 2000.

- [88] L. Martínez, M. T. Sonoda, P. Webb, M. S. Skaf, and I. Polikarpov. Molecular Dynamics Simulations Reveal Multiple Pathways of Ligand Dissociation from Thyroid Hormone Receptors. *Biophys. J.*, 89:2011–2023, 2005.
- [89] Q. H. Gibson, R. Regan, R. Elber, J. S. Olson, and T. E. Carver. Distal pocket residues affect picosecond ligand recombination in myoglobin—an experimental and molecular dynamics study of position 29 mutants. *J. Biol. Chem.*, 267:22022–22034, 1992.
- [90] E. E. Scott, Q. H. Gibson, and J. S. Olson. Mapping the pathways for O<sub>2</sub> entry into and exit from myoglobin. *J. Biol. Chem.*, 267:5177–5188, 2001.
- [91] M. Brunori and Q. H. Gibson. Cavities and packing defects in the structural dynamics of myoglobin. *EMBO Rep.*, 2:674–679, 2001.
- [92] A. Ulitsky and R. Elber. The thermal equilibrium aspects of the time dependent Hartree and the locally enhanced sampling approximations: formal properties, a correction, and computational examples for rare gas clusters. *J. Chem. Phys.*, 98:3380–3388, 1993.
- [93] J. W. Ponder. *TINKER Software Tools for Molecular Design*. Version 3.8, Oct., 2000.
- [94] G. A. Kaminski et al. Evaluation and reparametrization of the OPLS-AA force field for proteins via comparison with accurate quantum chemical calculations on peptides. *J. Phys. Chem. B*, 105:6474–6487, 2001.
- [95] R. C. Rizzo and W. L. Jorgensen. OPLS all-atom model for amines: Resolution of the amine hydration problem. *J. Am. Chem. Soc.*, 121:4827–4836, 1999.
- [96] W. L. Jorgensen, D. S. Maxwell, and J. Tirado-Rives. Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids. *J. Am. Chem. Soc.*, 117:11225–11236, 1996.
- [97] M. J. Frisch et al. *Gaussian 98 (Revision A.10)*. Gaussian Inc., Pittsburgh, PA, 2001.

- [98] M. T. Sonoda, N. H. Moreira, L. Martínez, F. W. Fávero, S. M. Vechi, L. R. Martins, and M. S. Skaf. A review on the dynamics of water. *Braz. J. Phys.*, 34:3–16, 2004.
- [99] A. D. MacKerell et al. All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *J. Phys. Chem. B*, 102:3586–3616, 1998.
- [100] R. Fletterick. <http://www.msg.ucsf.edu/flett/>. Technical report, UCSF, 2002.
- [101] J. S. Fetrow. Omega loops: nonregular secondary structures significant in protein function and stability. *FASEB J.*, 9:708–717, 1995.
- [102] B. Kauppi et al. The three-dimensional structures of antagonistic and agonistic forms of the glucocorticoid receptor ligand-binding domain: RU-486 induces a transformation that lead to active antagonism. *J. Biol. Chem.*, 278:22748–22754, 2003.
- [103] M. Downes et al. A chemical, genetic, and structural analysis of the nuclear bile acid receptor FXR. *Mol. Cell*, 11:1079–1092, 2003.
- [104] J. S. Sack et al. Crystallographic structures of the ligand-binding domains of the androgen receptor and its T877A mutant complexed with the natural agonist dihydrotestosterone. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 98:4904–4909, 2001.
- [105] R. E. Watkins, J. M. Maglich, L. B. Moore, G. B. Wisely, S. M. Noble, P. R. Davis-Searles, M. H. Lambert, S. A. Kliewer, and M. R. Redinbo. A crystal structure of human PXR in complex with the St. John’s wort compound hyperforin. *Biochemistry*, 42:1430–1438, 2003.
- [106] M. Togashi, S. Borngraeber, B. Sandler, R. J. Fletterick, P. Webb, and J. D. Baxter. Conformational adaptation of nuclear receptor ligand binding domains to agonists: Potential for novel approaches to ligand design. *J. Steroid. Biochem.*, 93:127–137, 2005.
- [107] R. L. Dow et al. Discovery of a Novel Series of 6-Azauracil-Based Thyroid Hormone Receptor Ligands: Potent TR $\beta$  Subtype Selective Thyromimetics. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 13:379–382, 2003.

- [108] S. Izrailev, A. R. Crofts, E. A. Berry, and K. Schulten. Steered molecular dynamics simulations of the Rieske subunit motion in the cytochrome bc(1) complex. *Biophys. J.*, 77:1753–1768, 1999.
- [109] J. Manzano, B. Morte, T. S. Scanlan, and J. Bernal. Differential effects of triiodothyronine and the thyroid hormone receptor beta-specific agonist GC-1 on thyroid hormone target genes in the brain. *Endocrinology*, 144:5480–5487, 2003.
- [110] J. D. Baxter, W. H. Dillmann, B. L. West, R. Huber, J. D. Furlow, R. J. Fletterick, P. Webb, J. W. Apriletti, and T. S. Scanlan. Selective modulation of thyroid hormone receptor action. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 76:31–42, 2001.
- [111] J. D. Baxter, P. Webb, G. Grover, and T. S. Scanlan. Selective activation of thyroid hormone signaling pathways by GC-1: a new approach for controlling cholesterol and body weight. *Trends Endocrinol. Metab.*, 15:154–157, 2004.
- [112] L. Johansson, M. Rudling, T. S. Scanlan, T. Lundasen, P. Webb, J. Baxter, B. Angelin, and P. Parini. Selective thyroid receptor modulation by GC-1 reduces serum lipids and stimulates steps of reverse cholesterol transport in euthyroid mice. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 102:10297–10302, 2005.
- [113] W. Lim et al. A thyroid hormone antagonist that inhibits thyroid hormone action *in vivo*. *J. Biol. Chem.*, 277:35664–35670, 2002.
- [114] V. Daggett. Protein Folding-Simulation. *Chem. Rev.*, 106:1898–1916, 2006.
- [115] U. Mayor, N. R. Guydosh, C. M. Johnson, J. G. Grossmann, S. Sato, G. S. Jas, S. M. V. Freund, D. O. V. Alonso, V. Dagget, and A. R. Fersht. The complete folding pathway of a protein from nanoseconds to microseconds. *Nature*, 421:863–867, 2003.
- [116] V. Daggett. Molecular Dynamics Simulations of the Protein Unfolding/Folding Reaction. *Acc. Chem. Res.*, 35:422–429, 2002.

- [117] Y. Duan and P. A. Kollman. Pathways to a Protein Folding Intermediate Observed in a 1-Microsecond Simulation in Aqueous Solution. *Science*, 282:740–744, 1998.
- [118] C. D. Snow, N. Nguyen, V. S. Pande, and M. Gruebele. Absolute comparison of simulated and experimental protein-folding dynamics. *Nature*, 420:102–106, 200.
- [119] A. J. Li and V. Daggett. Identification and characterization of the unfolding transition state of chymotrypsin inhibitor 2 by molecular dynamics simulations. *J. Mol. Biol.*, 257:412–429, 1996.
- [120] Y. Zhou and M. Karplus. Interpreting the folding kinetics of helical proteins. *Nature*, 401:400–403, 1999.
- [121] V. R. Agashe, M. C. R. Shastry, and J. B. Udgaonkar. Initial hydrophobic collapse in the folding of Barstar. *Nature*, 377:754–757, 1995.
- [122] A. Caffisch and M. Karplus. Acid and Thermal Denaturation of Barnase Investigated by Molecular Dynamics Simulations. *J. Mol. Biol.*, 252:672–708, 1995.
- [123] V. Daggett and M. Levitt. Protein Unfolding Pathways Explored Through Molecular Dynamics Simulations. *J. Mol. Biol.*, 232:600–619, 1993.
- [124] A. D. MacKerrell et al. All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *J. Phys. Chem. B*, 102:3586–3616, 1998.
- [125] M. Heinig and D. Frishman. STRIDE: a web server for secondary structure assignment from known atomic coordinates of proteins. *Nucl. Acid Res.*, 32:W500–W502, Supl. 2, 1998.
- [126] S. K. Kearsley. On the orthogonal transformation used for structural comparisons. *Acta Cryst. A*, 45:208–210, 1989.
- [127] A. Sali, E. Shakhnovich, and M. Karplus. How does a protein fold. *Nature*, 369:248–251, 1994.

- [128] S. W. Englander. Protein Folding Intermediates and Pathways Studied by Hydrogen Exchange. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 29:213–238, 2000.
- [129] S. H. McLaughlin and S. E. Jackson. Folding and stability of the ligand-binding domain of the glucocorticoid receptor. *Prot. Sci.*, 11:1926–1936, 2002.
- [130] D. E. Sagnella, J. E. Straub, T. A. Jackson, M. Lim, and P. A. Anfinrud. Vibrational population relaxation of carbon monoxide in the heme pocket of photolyzed carbonmonoxy myoglobin: Comparison of time-resolved mid-IR absorbance experiments and molecular dynamics simulations. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:14324–14329, 1999.
- [131] D. E. Sagnella, J. E. Straub, and D. Thirumalai. Time scales and pathways for kinetic energy relaxation in solvated proteins: Application to carbonmonoxy myoglobin. *J. Chem. Phys.*, 113:7702–7711, 2000.
- [132] D. E. Sagnella and J. E. Straub. Direct Energy ‘Funneling’ Mechanism for Heme Cooling Following Ligand Photolysis or Direct Excitation in Solvated Carbonmonoxy Myoglobin. *J. Phys. Chem. B*, 105:7057–7063, 2001.
- [133] X. Yu and D. M. Leitner. Vibrational Energy Transfer and Heat Conduction in a Protein. *J. Phys. Chem. B*, 107:1698–1707, 2003.
- [134] H. Fujisaki and J. E. Straub. Vibrational Energy Relaxation in Proteins. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 19:6726–6731, 2005.
- [135] N. Ota and D. Agard. Intramolecular signaling pathways revealed by modeling anisotropic thermal diffusion. *J. Mol. Biol.*, 351:345–354, 2005.
- [136] S. W. Lockless and R. Ranganathan. Evolutionary conserved pathways of energetic connectivity in protein families. *Science*, 286:295–299, 1999.
- [137] M. Socolich, S. W. Lockless, W. P. Russ, H. Lee, K. H. Gardner, and R. Ranganathan. Evolutionary information for specifying a protein fold. *Nature*, 437:512–518, 2005.

- [138] L. Kale et al. NAMD2: Greater Scalability for Parallel Molecular Dynamics. *J. Comp. Phys.*, 151:283–312, 1999.
- [139] M. D. Mikhailov and M. N. Ozisik. *Unified Analysis and Solutions of Heat and Mass Diffusion*. Dover Publications, 1994.
- [140] R. Andreani, J. M. Martínez, L. Martínez, and F. Yano. Low Order Value Optimization and applications. *To be published*, 2006.
- [141] E. G. Birgin and J. M. Martínez. Large-scale active-set box constrained optimization method with spectral projected gradients. *Comp. Optim. App.*, 23:101–125, 2002.
- [142] Marimuthu, W. Feng, T. Tagami, H. Nguyen, J. L. Jameson, R. J. Fletterick, J. D. Baxter, and B. L. West. TR surfaces and conformations required to bind nuclear receptor corepressor. *Mol. Endocrinol.*, 16:271–286, 2002.
- [143] A. J. Horlein, A. M. Naar, T. Heinzl, J. Torchia, B. Gloss, R. Kurokawa, A. Ryan, Y. Kamei, M. Soderstrom, C. K. Glass, and M. G. Rosenfeld. Ligand-dependent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature*, 377:397–404, 1995.
- [144] H. Yagi, J. Phlenz, Y. Hayashi, A. Sakurai, and S. Refetoff. Resistance to thyroid hormone caused by two mutant thyroid hormone receptors beta, R243Q and R243W, with marked impairment of function that cannot be explained by altered in vitro 3,5,3'-triiodothyronine binding affinity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 82:1608–1614, 1997.
- [145] J. Anselmo and S. Rfetoff. Regression of a large goiter in a patient with resistance to hyroid hormone by every other day treatment with triiodothyronine. *Thyroid*, 14:71–74, 2004.
- [146] J. D. Safer, R. N. Cohen, A. N. Hollenberg, and F. E. Wondisford. Defective release of corepressor by hinge mutants of the thyroid hormone receptor found in patients with resistance to thyroid hormone. *J. Biol. Chem.*, 273:30175–30182, 1998.

- [147] M. E. Geffner et al. An arginine to histidine mutation in codon 311 of the C-erbA beta gene results in a mutant thyroid hormone receptor that does not mediate a dominant negative phenotype. *J. Clin. Invest.*, 91:538–546, 1993.
- [148] R. E. Weiss, M. Weinberg, and S. Refetoff. Identical mutations in unrelated families with generalized resistance to thyroid hormone occur in cytosine-guanine-rich areas of the thyroid hormone receptor beta gene. Analysis of 15 families. *J. Clin. Invest.*, 91:2408–2415, 1993.
- [149] M. Adams, C. Matthews, T. N. Collingwood, Y. Tone, P. Beck-Peccoz, and K. K. Chatterjee. Genetic analysis of 29 kindreds with generalized and pituitary resistance to thyroid hormone. Identification of thirteen novel mutations in the thyroid hormone receptor beta gene. *J. Clin. Invest.*, 94:506–515, 1994.
- [150] S. M. Yoh, V. K. Chatterjee, and M. L. Privalsky. Thyroid hormone resistance syndrome manifests as an aberrant interaction between mutant T3 receptors and transcriptional corepressors. *Mol. Endocrinol.*, 11:470–480, 1997.
- [151] D. Seto and B. D. Weintraub. Rapid molecular diagnosis of mutations associated with generalized thyroid hormone resistance by PCR-coupled automated direct sequencing of genomic DNA: detection of two novel mutations. *Hum. Mutat.*, 8:247–257, 1996.
- [152] R. J. Clifton-Blight, F. de Zegher, R. L. Wagner, T. N. Collingwood, M. Van Heivoirt I. Francois, R. J. Fletterick, and V. K. Chatterjee. A novel TR beta mutation (R383H) in resistance to thyroid hormone syndrome predominantly impairs corepressor release and negative transcriptional regulation. *Mol. Endocrinol.*, 12:609–621, 1998.
- [153] J. D. Safer, M. G. O'Connor, S. D. Colan, S. Srinivasan, S. R. Tollin, and F. E. Wondisford. The thyroid hormone receptor-beta gene mutation R383H is associated with isolated central resistance to thyroid hormone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 84:3099–3109, 1999.

- [154] C. T. Baumann, P. Maruvada, G. L. Hager, and P. M. Yen. Nuclear cytoplasmic shuttling by thyroid hormone receptors. multiple protein interactions are required for nuclear retention. *J. Biol. Chem.*, 276:11237–11245, 2001.
- [155] R. N. Cohen, A. Putney, F. E. Wondisford, and A. N. Hollenberg. The nuclear corepressors recognize distinct nuclear receptor complexes. *Mol. Endocrinol.*, 14:900–914, 2000.
- [156] B. Catargi et al. A novel thyroid hormone receptor-beta mutation, not anticipated to occur in resistance to thyroid hormone, causes variable phenotypes. *Horm. Res.*, 57:137–142, 2002.
- [157] M. Taniyama, N. Ishikawa, N. Momotani, K. Ito, and Y. Ban. Toxic multinodular goitre in a patient with generalized resistance to thyroid hormone who harbours the R429Q mutation in the thyroid hormone receptor beta gene. *Clin. Endocrinol.*, 54:121–124, 2001.
- [158] C. V. Boothroyd, B. T. Teh, N. K. Hayward, P. E. Hickman, G. J. Ward, and D. P. Cameron. Single base mutation in the hormone binding domain of the thyroid hormone receptor beta gene in generalised thyroid hormone resistance demonstrated by single stranded conformation polymorphism analysis. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 178:606–612, 1991.
- [159] J. D. Safer, S. D. Colan, L. M. Fraser, and F. E. Wondisford. A pituitary tumor in a patient with thyroid hormone resistance: a diagnostic dilemma. *Thyroid*, 3:281–291, 2001.
- [160] M. Taniyama, Y. Ban, N. Momotani, F. Makino, K. Ito, and Y. Ban. Three Japanese patients from two families with generalized resistance to thyroid hormone with mutations in exon 9 of the thyroid hormone receptor beta gene. *Intern. Med.*, 40:756–758, 2001.
- [161] A. J. Mixson, R. Parrilla, S. C. Ransom, E. A. Wiggs, J. H. McClaskey, P. Hauser, and B. D. Weintraub. Correlations of language abnormalities with localization of mutations in the beta-thyroid hormone receptor in 13 kindreds with generalized resistance to thyroid hormone: identification of four new mutations. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 75:1039–1045, 1992.