



1150057291



T/UNICAMP M366e

Universidade Estadual de Campinas

Instituto de Química

Departamento de Físico-Química

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

**Leandro Martínez**

Dissertação de Mestrado

**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

Campinas, SP

2003

2004.05.016

UNIDADE ICQ  
Nº CHAMADA 10102010  
11266  
V \_\_\_\_\_ EX \_\_\_\_\_  
TOMBO BCI 57291  
PROC 16/112104  
C \_\_\_\_\_ D 2  
PREÇO 11,00  
DATA 13/03/04  
Nº CPD \_\_\_\_\_

bib- id 311521

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA  
UNICAMP

M366e

Martínez, Leandro.

Estudo computacional dos mecanismos de  
dissociação do hormônio tireoideano de seu  
receptor nuclear / Leandro Martínez. – Campinas,  
SP: [s.n], 2003.

Orientador: Munir S. Skaf

Co-orientador: Igor Polikarpov

Tese (Mestrado) - Universidade Estadual de  
Campinas, Instituto de Química.

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

# Agradecimentos

Este trabalho só foi possível devido ao imediato apoio que me foi dado no início da colaboração entre os grupos do Igor e do Munir. Além disso, nada teria sido feito sem as sugestões, a orientação, o entusiasmo e, sobretudo, a confiança que me foi depositada por eles, a quem agradeço fortemente.

Ao Igor agradeço especialmente pela minha iniciação na pesquisa de receptores nucleares em 2001, quando ainda estava no LNLS, e pela constante orientação com relação às motivações biológicas do trabalho.

O Munir merece também um agradecimento especial pela orientação próxima e constante aqui na UNICAMP e pelas infernais complicações burocráticas em que eu o coloquei. Com sua paciência infinita se livrou de todas com sucesso, o que me permitiu trabalhar com tranquilidade.

Dentro do meu grupo de trabalho, o Milton merece um agradecimento à parte pela importante colaboração na implementação da técnica DMAA. Ao Milton, à Lucimara, ao Ney e ao Frank também devo agradecer pelo companheirismo e pela resolução de incontáveis problemas, particularmente computacionais.

A John Baxter e Paul Webb por colaborar com a discussão dos resultados.

Agradeço ao meu pai, Mario, pela colaboração científica que gerou o programa *Packmol*, que é usado neste trabalho.

Por fim, agradeço aos meus pais, Ana e Mario, ao meu irmão, Julián, e à Camila, por tudo mais que não está diretamente relacionado ao trabalho, mas sem o que nada teria sentido.

# Curriculum Vitae

- **Informações Pessoais**

Nome: Leandro Martínez

Data de nascimento: 16/12/1979

- **Formação Universitária**

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

- **Mestrado**

*Estudo Computacional dos Mecanismos de Dissociação do Hormônio Tireoideano 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. Recebeu o *Prêmio Lavoisier*, concedido pelo Conselho Regional de Química IV Região, por melhor desempenho acadêmico entre os formandos da turma de 06/2002.
2. Primeiro colocado no exame de ingresso à pós-graduação do IQ-UNICAMP em 06/2002.

- **Artigos submetidos**

1. Leandro Martínez, Milton T. Sonoda, Paul Webb, John D. Baxter, Munir S. Skaf, Igor Polikarpov. "Molecular Dynamics Simulations Suggest Likely Pathways for T3 Dissociation from Thyroid Hormone Receptors."

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

1. 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*, aceito, 2003.
2. 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).
3. 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).
4. 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).
5. 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).
6. 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).
7. 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).

**• Trabalhos apresentados em congressos**

1. Leandro Martínez, Milton T. Sonoda, Munir S. Skaf, Igor Polikarpov, "Mecanismos de Dissociação do Hormônio Tireoideano 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.
2. Leandro Martínez, Munir S. Skaf, Igor Polikarpov, “Simulação por Dinâmica Molecular do Hormônio Tireoideano 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.
  3. 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 23ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas, 26 de Maio de 2000.
  4. Leandro Martínez, Robson F. de Farias, Claudio Airoidi, “Redução da distância interlamelar de sílica induzida por aplicação de pressão.” Apresentado na 23ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas, 26 de Maio de 2000.
  5. 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.
  6. 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 sem registro ou patente**

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>

# Resumo

Os hormônios são fundamentais para a estabilidade do corpo hidrofóbico dos domínios de ligação com o ligante dos receptores nucleares hormonais. Isto sugere que rearranjos estruturais significativos devem permitir a entrada ou a saída dos ligantes, mas a natureza destes rearranjos e a dinâmica da proteína envolvidos não são conhecidos. Estas modificações têm sido deduzidas da análise e comparação das estruturas tri-dimensionais estáticas. Neste trabalho são usadas duas técnicas computacionais para obter os mecanismos de dissociação do Hormônio Tireoideano do seu respectivo receptor. Estas técnicas são conhecidas como Dinâmica Molecular com Amostragem Ampliada e Dinâmica Molecular com Caminho Induzido. Combinadas, suas características permitem obter tanto aspectos gerais como interações específicas dos mecanismos de dissociação. Três mecanismos foram obtidos com DMAA: o Caminho I envolve a dissociação da hélice 12 da hélice 3 e se assemelha ao modelo “ratoeira” geralmente proposto para os receptores do ácido retinóico; o Caminho II envolve a separação das hélices 8 e 11 e do  $\Omega$ -loop e gera uma explicação plausível para a grande afinidade de alguns ligantes sintéticos conhecidos; por fim, no Caminho III, o ligante escapa através de uma cavidade formada pelo grampo- $\beta$ , a hélice 3 e o loop entre as hélices 1 e 2. Este caminho tinha sido previamente proposto pela análise da mobilidade da proteína, obtida dos fatores de temperatura das estruturas cristalográficas. Estes mecanismos foram estudados detalhadamente com DMCI, mostrando que aminoácidos estão envolvidos e qual a importância de cada uma das interações. A correlação destes caminhos com dados experimentais e biológicos é discutida, oferecendo bases racionais para uma futura verificação experimental e design de ligantes sintéticos seletivos.

# Abstract

Nuclear hormone receptor ligands form an integral part of the hydrophobic core of nuclear receptor ligand binding domain. This suggests that there must be significant structural rearrangements to permit ligand binding and release, but the nature of these alterations and of the protein dynamics involved is not known and has only been inferred from comparisons of static three dimensional structures. In this work, we use two computational methodologies to address the mechanisms of dissociation of the Thyroid Hormone from thyroid hormone receptors. The techniques are known as Enhanced Sampling Molecular Dynamics and Steered Molecular Dynamics. Combined, their features permit obtaining both general aspects and specific interactions of the dissociation pathways. Three paths were found using ESMD: Path I involves de dissociation of the H12 from H3 and resembles the “mouse trap” model proposed for retinoic acid receptors; Path II involves the separation of H8, H11 and the  $\Omega$ -loop and provides a possible explanation for the high affinity of known synthetic ligands; Finally, in Path III the ligand escapes through a cavity formed by the  $\beta$ -hairpin, H3 and the H1 to H2 loop. This path was previously proposed by the analysis of the mobility of the protein obtained from temperature factors in crystallographic structures. These mechanisms were studied in detail with SMD. These simulations have shown which aminoacid residues are involved and details on their interaction energies with the hormone. The correlation of the paths found with biological and experimental data is discussed, offering a rational basis for future experimental verification and design of selective synthetic ligands.

# Índice

Lista de Abreviaturas	xvii	
Lista de Figuras	xix	
Lista de Tabelas	xxiii	
<b>1</b>	<b>Receptores Nucleares: Função e Estrutura</b>	<b>1</b>
1.1	Função biológica . . . . .	1
1.2	Domínios estruturais e suas funções . . . . .	2
1.3	Mecanismos de ação . . . . .	3
1.4	Estrutura dos Receptores Nucleares . . . . .	7
<b>2</b>	<b>A Família dos Receptores do Hormônio Tireoideano</b>	<b>13</b>
2.1	Membros da família dos receptores do hormônio tireoideano . . . . .	13
2.2	Hormônios tireoideanos naturais . . . . .	14
2.3	Domínios de Ligação com o Hormônio . . . . .	15
2.3.1	O desenvolvimento de ligantes seletivos . . . . .	18
2.3.2	O ligante GC-1 . . . . .	19
2.3.3	Os ligantes 5'-substituídos . . . . .	21
<b>3</b>	<b>Dinâmica Molecular dos Receptores Nucleares</b>	<b>25</b>
3.1	Simulações computacionais de dinâmica molecular . . . . .	26
3.2	Dinâmica Molecular com Caminho Induzido . . . . .	27
3.3	Dinâmica Molecular com Amostragem Ampliada . . . . .	28
3.4	Estudos da dissociação do Ácido Retinóico de seu receptor . . . . .	30
3.5	Conclusões e perspectivas . . . . .	32

---

<b>4</b>	<b>Objetivos e Metodologia</b>	<b>35</b>
4.1	Objetivos . . . . .	35
4.2	Dinâmica Molecular com Amostragem Ampliada . . . . .	37
4.2.1	Simulações da dissociação do ácido retinóico de seu receptor . . . . .	37
4.2.2	Simulações da dissociação do T3 de seu receptor . . . . .	39
4.3	Dinâmica Molecular com Caminho Induzido . . . . .	45
<b>5</b>	<b>Dissociação do T3 usando DMAA</b>	<b>51</b>
5.1	Testes preliminares . . . . .	51
5.1.1	Reprodução do resultados de Blondel e Karplus . . . . .	51
5.1.2	Efeito das águas estruturais sobre a dinâmica . . . . .	52
5.2	Caminhos de dissociação para o receptor TR $\alpha$ . . . . .	54
5.2.1	Dissociação ao longo do Caminho I . . . . .	54
5.2.2	Dissociação ao longo do Caminho II . . . . .	55
5.2.3	Dissociação ao longo do Caminho III . . . . .	59
5.3	Caminhos de dissociação para o receptor TR $\beta$ . . . . .	60
5.4	Conclusões . . . . .	62
<b>6</b>	<b>Estudo da Dissociação do T3 usando DMCI</b>	<b>63</b>
6.1	Metodologia de análise dos resultados . . . . .	63
6.2	Caminhos de dissociação para o receptor TR $\alpha$ . . . . .	66
6.2.1	Dissociação ao longo do Caminho I . . . . .	66
6.2.2	Dissociação ao longo do Caminho II . . . . .	75
6.2.3	Dissociação ao longo do Caminho III . . . . .	82
<b>7</b>	<b>Conclusão</b>	<b>91</b>
<b>A</b>	<b>Outras interações do T3 observadas com DMCI</b>	<b>99</b>
<b>B</b>	<b>Packmol</b>	<b>107</b>
<b>C</b>	<b>Nomenclatura e estrutura dos aminoácidos</b>	<b>109</b>

## Lista de Abreviaturas

DBD	Domínio estrutural dos Receptores Nucleares que se liga ao DNA ( <i>DNA Binding Domain</i> ).
DMAA	Dinâmica Molecular com Amostragem Ampliada.
DMCI	Dinâmica Molecular com Caminho Induzido.
GC-1	Ligante Artificial TR $\beta$ -seletivo.
HRE	Seqüências de DNA às quais os receptores nucleares se associam ( <i>Hormone Response Elements</i> ).
HSP	Proteína de Choque Térmico ( <i>Heat Shock Protein</i> ).
LBD	Domínio estrutural dos Receptores Nucleares que se associa ao ligante ( <i>Ligand Binding Domain</i> ).
NR	Receptor Nuclear
RAR	Receptor do Ácido Retinóico.
RTH	Síndrome de Resistência ao Hormônio Tireoideano ( <i>Resistance to Thyroid Hormone syndrome</i> ).
RXR	Receptor X Retinóico.
T3	Ligante Natural dos Receptores do Hormônio Tireoideano (3,3',5'-triiodo-L-tironina).

- T4      Ligante natural dos receptores do Hormônio Tireoideano (3,5,3',5'-tetra-iodo-L-tironina).
- TR      Receptor do Hormônio Tireoideano (*Thyroid Hormone Receptor*).

# Lista de Figuras

1.1	Domínios estruturais dos receptores nucleares e suas funções. . . .	3
1.2	Mecanismo geral da ação dos receptores nucleares. HSP: Proteína de Choque Térmico. . . . .	5
1.3	Domínio de ligação com o DNA do Receptor X Retinóico. . . . .	8
1.4	Domínios de ligação com os hormônios: (a) Receptor do Hormônio Tireoideano; (b) Receptor X Retinóico; (c) Receptor da Progesterona. . . . .	9
1.5	Estrutura do (a) Receptor do Ácido Retinóico (RAR $\gamma$ ) livre e (b) do Receptor X Retinóico (RXR $\alpha$ ) associado ao seu ligante natural. . . . .	10
2.1	Hormônios naturais mais importantes para atividade dos hormônios tireoideanos: (a) tiroxina, T4; (b) tri-iodotironina, T3. . . . .	14
2.2	Comparação entre as seqüências primárias dos receptores TR $\alpha$ 1 e TR $\beta$ 1 humanos. . . . .	16
2.3	Três imagens do LBD do receptor TR $\alpha$ 1 e a posição de cada elemento de estrutura secundária. . . . .	17
2.4	Estruturas dos ligantes artificiais (a) GC-1 e (b) Triac. . . . .	19
2.5	Comparação das estruturas do receptor TR $\beta$ associado aos ligantes (a) Triac e (b) GC-1. . . . .	20
2.6	Estrutura de dois antagonistas 5'-substituídos: (a) MIBRT, (b) NH-3. . . . .	22
2.7	Estrutura de dois agonistas 5'-substituídos: (a) NH-2, (b) GC-17. . . . .	23
4.1	Ácido retinóico e a numeração de seus átomos. . . . .	38
4.2	3, 3', 5'-triiodo-L-tironina (T3) e a numeração de seus átomos. . . . .	41

4.3	Átomos a cujas posições foram aplicadas restrições, representados como esferas. (a) Caminho I, (b) Caminho II, (c) Caminho III. . . . .	48
5.1	Mecanismo de dissociação do ácido retinóico de seu receptor estudado com DMAA. . . . .	52
5.2	Estabilização da estrutura pela formação de redes de ligações de hidrogênio. . . . .	53
5.3	A simulação com 50 cópias do ácido retinóico e água mostrou o mesmo mecanismo de dissociação que as simulações anteriores. . . . .	53
5.4	Imagem geral dos caminhos de dissociação do T3 ao longo das trajetórias obtidas por DMAA. . . . .	56
5.5	Formação das primeiras cavidades nos mecanismos de dissociação de acordo com as simulações usando DMAA. . . . .	57
5.6	(a) Movimentação do $\Omega$ -loop no Caminho II. (b) Posição relativa do sítio 5' em relação à proteína neste caminho. . . . .	59
5.7	Visão global dos caminhos encontrados para a dissociação do T3 do LBD do receptor TR $\beta$ . (a) Caminho similar ao Caminho II. (b) Caminho similar ao Caminho III. . . . .	61
6.1	Comparação dos perfís das forças com velocidades diferentes nos três caminhos: (a) Caminho I; (b) Caminho II; (c) Caminho III. . . . .	64
6.2	Visão global da dissociação ao longo do Caminho I obtida usando DMCI. . . . .	67
6.3	Força em função do tempo de simulação ao longo do Caminho I. . . . .	68
6.4	Varição da energia das interações hidrofóbicas mais importantes ao longo do Caminho I. . . . .	69
6.5	Energia de interação e mecanismos moleculares associados à primeira barreira ao longo do Caminho I: Arg 228, Arg 262 e W639. . . . .	70
6.6	Energia de interação e mecanismos moleculares associados à primeira barreira ao longo do Caminho I: Arg 228, Ser 277, W260 e W317. . . . .	71
6.7	Energia de interação e mecanismos moleculares associados à segunda barreira ao longo do Caminho I: Thr 219, Arg 228 e Ser 277. . . . .	72

---

6.8	Variação da energia das interações de importância secundária ao longo do Caminho I. . . . .	73
6.9	Visão global da dissociação ao longo do Caminho II obtida usando DMCI. . . . .	76
6.10	Força em função do tempo de simulação ao longo do Caminho II.	77
6.11	Energia de interação e mecanismos moleculares associados à primeira barreira ao longo do Caminho II: Arg 228, Arg 262, Ser 277 e W639. . . . .	78
6.12	Variação da energia da interação T3-R266 ao longo do Caminho II.	79
6.13	Energia de interação e mecanismos moleculares associados à primeira barreira ao longo do Caminho II: Phe 218, Met 259, Thr 275 e Leu 276. . . . .	80
6.14	Energia de interação e mecanismos moleculares associados à segunda barreira ao longo do Caminho II: Thr 219, His 381, Arg 384, Phe 218 e Asp 206. . . . .	81
6.15	Força em função do tempo de simulação ao longo do Caminho III.	83
6.16	Visão global da dissociação ao longo do Caminho III obtida usando DMCI. . . . .	84
6.17	Energia de interação e mecanismos moleculares associados à primeira barreira ao longo do Caminho III: Phe 218, Arg 262 e Arg 266. . . . .	85
6.18	Energia de interação e mecanismos moleculares associados à primeira barreira ao longo do Caminho III: Arg 228. . . . .	86
6.19	Energia de interação e mecanismos moleculares associados à segunda barreira ao longo do Caminho III: Ser 277, Leu 276, Met 259. . . . .	87
6.20	Energia de interação e mecanismos moleculares associados à segunda barreira ao longo do Caminho III: Ser 277 e moléculas de água. . . . .	88
A.1	Variação da energia das interações entre o ligante T3 e os aminoácidos ao longo do Caminho I. . . . .	100

---

A.2	Energia das interações entre moléculas de água e o ligante T3 ao longo do Caminho I. . . . .	101
A.3	Energia das interações entre o ligante T3 e os aminoácidos ao longo do Caminho II. . . . .	102
A.4	Energia das interações entre moléculas de água e o ligante T3 ao longo do Caminho II. . . . .	103
A.5	Energia das interações entre o ligante T3 e os aminoácidos ao longo do Caminho III. . . . .	104
A.6	Energia das interações entre moléculas de água e o ligante T3 ao longo do Caminho III. . . . .	105

# Lista de Tabelas

4.1	Potenciais de Lennard-Jones e cargas utilizadas para o ácido retinóico. . . . .	40
4.2	Potenciais de Lennard-Jones e cargas utilizadas para o T3. . . . .	42
4.3	Potenciais harmônicos para as ligações covalentes do T3 . . . . .	43
4.4	Potenciais usados para as torções de ângulos do T3 . . . . .	43
4.5	Potenciais usados para as torções de ângulos de diédros do T3 . . . . .	44
5.1	Caminhos encontrados em cada uma das simulações com DMAA. . . . .	55
7.1	Forças máximas associadas às principais barreiras encontradas ao longo dos três caminhos de dissociação. . . . .	93

## Capítulo 1

# Receptores Nucleares: Função e Estrutura

Os genes da superfamília dos receptores nucleares hormonais (*Nuclear Hormone Receptor Gene Superfamily*) codificam receptores intracelulares estruturalmente relacionados. Entre eles encontram-se os receptores dos glucocorticóides, dos hormônios andrógenos, da progesterona, do estrógeno, da vitamina D, do ácido retinóico e do hormônio tireoideano, por exemplo. Também fazem parte dessa superfamília de genes vários receptores órfãos, isto é, que não possuem um ligante determinado. Estudos genotípicos comparativos mostram que a mosca *Drosophila* possui vários genes semelhantes aos genes que codificam os receptores nucleares humanos, indicando que esta classe de proteínas é anterior à diferenciação entre vertebrados e invertebrados [1].

### 1.1 Função biológica

As proteínas da superfamília dos receptores nucleares possuem a função de regular a transcrição de genes. Cada classe destas proteínas é responsável pela regulação da transcrição de um conjunto de genes. Por exemplo, os glucocorticóides e o Hormônio Tireoideano regulam cerca de 1% de todos dos genes que são expressados em certas células. As diferentes classes de receptores controlam grupos de genes que podem se sobrepor, mas cada receptor controla um conjunto total de genes único. Os receptores reconhecem seus hormônios e os trechos de DNA de forma altamente seletiva, por uma variedade de mecanismos [1, 2].

A distribuição heterogênea dos receptores nucleares nos diferentes tecidos lhes confere propriedades importantes. A grande maioria dos tecidos possui as proteí-

nas de praticamente todos os receptores, porém em concentrações muito distintas. Existem, ainda, alguns receptores que são específicos de determinados tecidos. Por exemplo, a isoforma TR $\beta$ 2 dos receptores do Hormônio Tireoideano é encontrada unicamente na glândula pituitária e em regiões do hipotálamo [1]. Da atividade regulatória que estes receptores exercem, vale citar alguns exemplos: os Receptores do Hormônio Tireoideano influenciam a diferenciação celular e o desenvolvimento em organismos jovens e controla vários processos metabólicos em organismos adultos [3]; os retinóides, a vitamina A entre eles, atuam sobre o desenvolvimento embrionário dos vertebrados, sobre a homeostase e também sobre a diferenciação celular; receptores do estrógeno e da progesterona atuam em diversas etapas do desenvolvimento e, evidentemente, sobre a diferenciação sexual [4].

A regulação da atividade destes receptores por moléculas pequenas, os hormônios, faz destas proteínas alvos claros para o desenvolvimento de fármacos. Diferentes agonistas e antagonistas já são usados para contracepção, para o controle de processos inflamatórios, prevenção da osteoporose e para o tratamento de várias doenças, incluindo diabetes, doenças de pele, síndromes de resistência aos hormônios e inclusive alguns tipos de câncer [5].

## 1.2 Domínios estruturais e suas funções

Os receptores nucleares são formados basicamente por três domínios que estão representados de forma simplificada na Figura 1.1. Próximo da região N-terminal, existe um domínio altamente variável entre as diferentes classes de receptores e que possui uma região ativadora da transcrição. Este domínio não teve sua estrutura determinada ainda, e há indícios de que seja basicamente desestruturado [2].

O segundo domínio na sequência de aminoácidos é o Domínio de Ligação com o DNA (DBD), cuja principal função é a ligação com seqüências de DNA específicas dos genes associados a cada receptor. Este domínio é composto por aproximadamente 70 aminoácidos com cerca de 40% de similaridade entre as diferentes classes da superfamília do receptores nucleares. O DBD de alguns receptores também está associado à dimerização. Diversas estruturas deste domínios já foram determinadas e consistem em um par *dedos de zinco*, um tipo de conformação estrutural comumente associada à ligação com DNA [2, 6].

O domínio com funções mais diversificadas, também o maior, das proteínas da superfamília dos receptores nucleares é o Domínio de Ligação com os Hormônios (LBD). Entre as diferentes classes de receptores, as seqüências de aminoácidos possuem cerca de 20% de similaridade, mas as seqüências dos receptores de uma mesma classe são bastante mais parecidas. Por exemplo, as seqüências primárias dos diferentes tipos de receptores do hormônio tireoideano possuem 86% de similaridade.

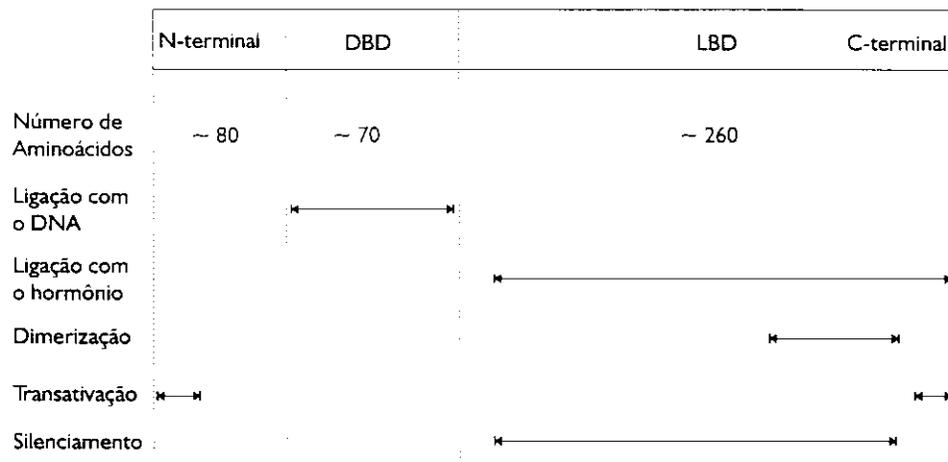


Figura 1.1. Domínios estruturais dos receptores nucleares e suas funções.

Além do reconhecimento seletivo de ligantes, os LBDs possuem outras funções importantes como a transativação dependente da ligação com o hormônio, dimerização e silenciamento de genes. A formação de dímeros é necessária para atividade da maior parte dos receptores conhecidos e se dá pela interação de superfícies hidrofóbicas presentes nos LBDs. Estas estruturas, quando dissociadas dos ligantes, ainda podem ser responsáveis pelo silenciamento de genes, isto é, pela inibição de sua transcrição [7].

### 1.3 Mecanismos de ação

Os receptores nucleares possuem mecanismos de ação que, apesar de não serem totalmente conhecidos, possuem características principais bem determinadas. Os hormônios são transportados na corrente sanguínea por proteínas. Como mostra a Figura 1.2, se dissociam das proteínas transportadoras e entram nas células por

difusão através da membrana celular. Uma vez no citoplasma, podem associar-se aos receptores por dois mecanismos distintos.

O mecanismo mais simples, representado na parte superior da Figura 1.2 consiste em que o hormônio se difunde através do citoplasma até o núcleo celular e, uma vez no núcleo, liga-se ao receptor. O receptor pode estar associado a outros receptores, formando homodímeros ou heterodímeros, a outras proteínas reguladoras, como coativadores ou correpressores e geralmente está associado ao DNA. [1, 2]. Uma vez formado o complexo entre o receptor e o hormônio, os correpressores se dissociam e o processo de transcrição se inicia. Este mecanismo é geralmente reconhecido como sendo o modelo principal de ativação da transcrição para a família dos receptores do Hormônio Tireoideano.

O segundo mecanismo importante reconhecido está representado na parte inferior da Figura 1.2. Os receptores permanecem no citoplasma associados a proteínas de choque térmico<sup>1</sup> e delas se dissociam quando se ligam ao hormônio. Dissociados da HSP, geralmente formam homodímeros que se ligam ao DNA finalmente promovendo a transcrição. Este mecanismo mediado por proteínas de choque térmico foi reconhecido para os receptores dos hormônios esteróides e glucocorticóides [1, 9].

Em ambos os mecanismos duas etapas são determinantes para a especificidade da ação dos receptores nucleares: sua associação com os hormônios e sua associação com o DNA.

### **O papel dos hormônios**

Os receptores nucleares são fatores de transcrição dependentes da associação com hormônios. Existem aproximadamente 40 tipos diferentes de receptores nucleares identificados, sendo que ligantes foram já reconhecidos para a metade deles. O reconhecimento das famílias de ligantes como ácidos graxos e ácidos biliares, associados a receptores que por muitos anos foram considerados órfãos (i. e. sem

---

<sup>1</sup>Proteínas de Choque térmico (*Heat Shock Proteins, HSP*), também chamadas Chaperonas Moleculares, têm a função de induzir o enovelamento correto e evitar a desnaturação de outras proteínas. Associam-se às proteínas durante o processo de tradução antes de que as proteínas estejam totalmente formadas, evitando um enovelamento prematuro. São conhecidas como proteínas de choque térmico por serem expressadas em grande quantidade em situações de estresse térmico [6, 8].

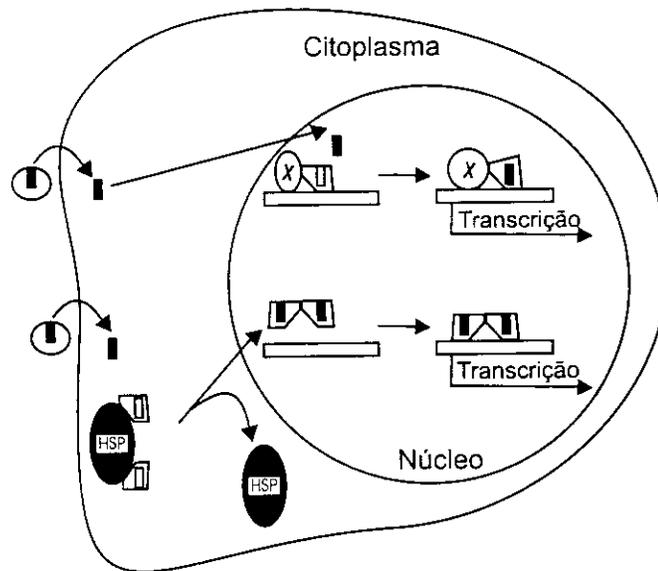


Figura 1.2. Mecanismo geral da ação dos receptores nucleares. HSP: Proteína de Choque Térmico.

ligante reconhecido) suportou a teoria de que todos os receptores nucleares têm sua atividade modulada por algum ligante [10]. Na verdade, muito recentemente foi reconhecido um receptor nuclear cuja atividade independe da associação com qualquer ligante e que, apesar da grande similaridade estrutural com os outros membros da família dos receptores nucleares, não possui a cavidade à qual os ligantes geralmente se associam [11]. A regulação da atividade deste receptor não é ainda bem compreendida.

De qualquer forma, a maior parte dos receptores nucleares tem sua atividade modulada pela presença de ligantes. A concentração destes ligantes na célula determina se os genes associados ao receptor correspondente serão ou não transcritos. A afinidade dos receptores nucleares em relação aos seus ligantes é geralmente muito alta. Por exemplo, o ligante natural T3 do Receptor do Hormônio Tireoideano possui uma constante de dissociação do receptor da ordem de  $10^{-9}$  Mol  $L^{-1}$ . Desta forma, pequenas concentrações dos hormônios no organismo promovem grandes respostas dos receptores. É graças às baixas concentrações necessárias que os hormônios, moléculas principalmente hidrofóbicas, podem cumprir sua função reguladora no organismo [12].

Os hormônios são moléculas basicamente hidrofóbicas com alguns poucos grupos hidrofílicos. Se associam ao Domínio de Associação com o Ligante (LBD) dos seus Receptores pela formação de algumas poucas, mas importantes, interações hidrofílicas e uma série de interações hidrofóbicas. As cavidades dos LBDs às quais os ligantes se associam possuem estruturas que conferem grande especificidade à ligação de cada tipo de hormônio. O papel ativo destes hormônios na regulação da transcrição e a clara componente estrutural envolvida na interação com os receptores é o que torna esta classe de proteína um alvo claro para o desenvolvimento de fármacos. Os hormônios em sua forma natural vêm sendo usados no tratamento de diversas doenças e o desenvolvimento de ligantes com propriedades moduladas é uma área de intensa pesquisa [12, 13].

### **A associação com o DNA**

Não obstante a regulação da atividade dos receptores nucleares seja predominantemente mediada pela associação com os hormônios, a especificidade de ação, quanto ao grupo de genes associado a cada receptor, provém da especificidade da ligação destes com seqüências de bases bem definidas no DNA. Estas seqüências são encontradas na forma de repetições simétricas ou antissimétricas (palíndromos) de 5 bases nitrogenadas, separadas por um conjunto de 3 ou 5 bases. Estas seqüências bem definidas de nucleotídeos são conhecidas como Elementos de Resposta dos Hormônios (*Hormone Response Elements, HRE*) [4].

Os receptores se ligam aos elementos de resposta na forma de homodímeros ou heterodímeros, sendo que cada uma das unidades formadoras dos dímeros se liga a uma das duas seqüências que constituem os HRE. A forma como a estrutura dos dímeros se adapta para se associar ao DNA não é bem compreendida. A associação com repetições de seqüências de bases de simetrias diferentes no DNA requer uma grande flexibilidade. Estruturas dos domínios de ligação como DNA de diversos receptores já foram determinadas, mas a flexibilidade depende da interação e da conexão entre este domínio e o LBD (ver Figura 1.1). As únicas estruturas dos dois domínios juntos determinadas são estruturas de baixa resolução obtidas por Polikarpov e colaboradores com espalhamento de raios X a baixo ângulo das proteínas em solução [14]. Estas estruturas mostram que a distância entre os DBDs

de cada unidade são compatíveis com a distância entre as seqüências no DNA no dímero, mas não no tetrâmero. Não obstante estes resultados tenham mostrado a provável razão pela qual tetrâmeros têm pouca afinidade em relação ao DNA, os mecanismos pelos quais dímeros são capazes de ligar-se tanto às repetições diretas como invertidas das seqüências do DNA permanecem desconhecidos.

## 1.4 Estrutura dos Receptores Nucleares

Dos três domínios presentes nos receptores nucleares, dois deles têm suas estruturas determinadas para várias classes de receptores: o DBD e o LBD. Ainda não foi possível determinar a estrutura do domínio N-terminal e existem evidências de que, ao menos quando isolado, seja basicamente desestruturado.

### Estrutura do domínio de ligação com o DNA

O domínio de ligação com o DNA (DBD) é o domínio que possui a seqüência de aminoácidos com maior grau de similaridade dentro da superfamília dos receptores nucleares. É formado por dois *dedos de zinco* que possuem quatro cisteínas cada um, que se conservam entre as diferentes classes de receptores e que são responsáveis pela coordenação dos íons de zinco. Na Figura 1.3 as cisteínas dos dois *dedos de zinco* estão destacadas, assim como os íons de zinco a elas coordenados. As hélices I e III destes domínios (representadas em verde e vermelho na Figura 1.3) são aproximadamente perpendiculares e formam o núcleo hidrofóbico que interage com o DNA. O DBD pode ser considerado como formado por dois domínios independentes, cada um contendo um dos *dedos de zinco*. A hélice do primeiro domínio é responsável pelo reconhecimento específico dos nucleotídeos que formam o HRE. O *loop* no segundo domínio possui uma superfície de dimerização e sua hélice esta envolvida em interações menos específicas com o DNA [2, 15, 16].

Os DBDs se associam ao DNA na forma de dímeros. O centro das interações entre cada uma das unidades do dímero e o DNA estão separados por 9 bases, o que consiste em aproximadamente uma volta da hélice do DNA. Desta forma, as unidades do dímero interagem do mesmo lado do DNA, o que é consistente com que a dimerização seja principalmente estabilizada pela interação entre os LBDs.

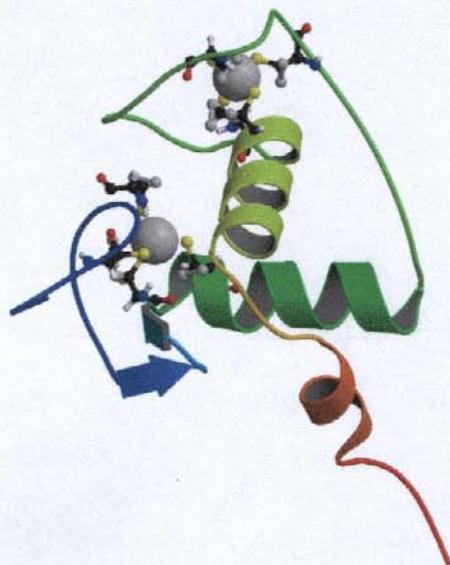


Figura 1.3. Domínio de ligação com o DNA do Receptor X Retinóico [15].

### Estruturas dos domínios 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. A Figura 1.4 ilustra a estrutura e a similaridade entre as estruturas dos LBDs dos receptores de diferentes hormônios. Os LBDs são formados basicamente por  $\alpha$ -hélices e por duas pequenas folhas- $\beta$  que formam um grampo. O grampo de folhas- $\beta$  está em primeiro plano nas três imagens da Figura 1.4.

O restante da estrutura é formado por algo entre 11 e 12  $\alpha$ -hélices, que aparecem em três grupos, formando o que se definiu como *sanduíche* de  $\alpha$ -hélices [17–19]. Os três grupos de  $\alpha$ -hélices são formados por 3 ou 4 hélices cada um. Nas Figuras 1.4 (a), (b) e (c), o primeiro grupo aparece em tons azulados. O segundo grupo, formado por hélices aproximadamente perpendiculares ao primeiro, está representado por tons amarelos. Por fim, perpendiculares ao segundo grupo, é possível reconhecer em tons avermelhados o terceiro grupo de  $\alpha$ -hélices. As três estruturas representadas nesta figura são estruturas obtidas dos LBDs associados aos seus ligantes, que podem ser observados nas Figuras 1.4 (a) e (c) em cinza. Além da similaridade estrutural, a cavidade em que o ligante se encontra também se coloca

nas diferentes classes de receptores em regiões semelhantes dos LBDs. A conexão com o DBD (ver Figuras 1.1 e 1.3) se dá através da hélice 1, que apresenta o azul mais intenso nas três estruturas aqui mostradas [1, 2, 19].

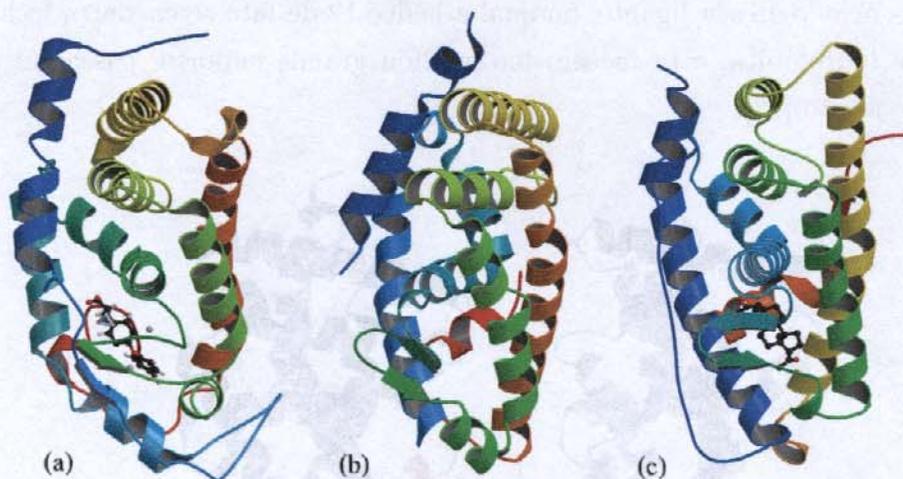


Figura 1.4. Domínios de ligação com os hormônios: (a) Receptor do Hormônio Tireoideano [13]; (b) Receptor X Retinóico [18]; (c) Receptor da Progesterona [20].

A primeira estrutura de um domínio de ligação com hormônios determinada foi a estrutura do Receptor X Retinóico (RXR) dissociada do seu ligante [17]. Em seguida foi determinada a estrutura do Receptor do Hormônio Tireoideano associada ao seu hormônio natural T3 [19]. A determinação das estruturas de outros receptores associados aos seus ligantes, inclusive a do Receptor do Ácido Retinóico (muito semelhante ao RXR e dependente do mesmo hormônio) permitiu as primeiras especulações a respeito dos mecanismos de associação e dissociação dos ligantes [18]. As estruturas do Receptor X Retinóico livre e do Receptor do Ácido Retinóico associado ao seu ligante estão apresentadas na Figura 1.5 (a) e (b), respectivamente.

As principais modificações na estrutura induzidas pela associação do ácido retinóico aos seus receptores são a compactação geral da estrutura e o dobramento da hélice 12 em direção do corpo da proteína. A hélice 12, representada em vermelho nas Figuras 1.5 (a) e (b) apresenta-se separada na estrutura livre, mas fecha a cavidade em que o ligante se associa no complexo com o ácido retinóico. Quando a estrutura livre do ligante foi determinada, sugeriu-se imediatamente que o me-

canismo de complexação do ligante deveria se assemelhar a uma ratoeira (*mouse trap*), na qual o ligante, após entrar na cavidade hidrofóbica, seria preso pelo reposicionamento da hélice 12 [17]. Com a determinação da estrutura deste mesmo receptor associado ao seu ligante, no qual a hélice 12 de fato se encontra fechando a cavidade hidrofóbica, este mecanismo ganhou grande suporte, passando a ser geralmente aceito [18].

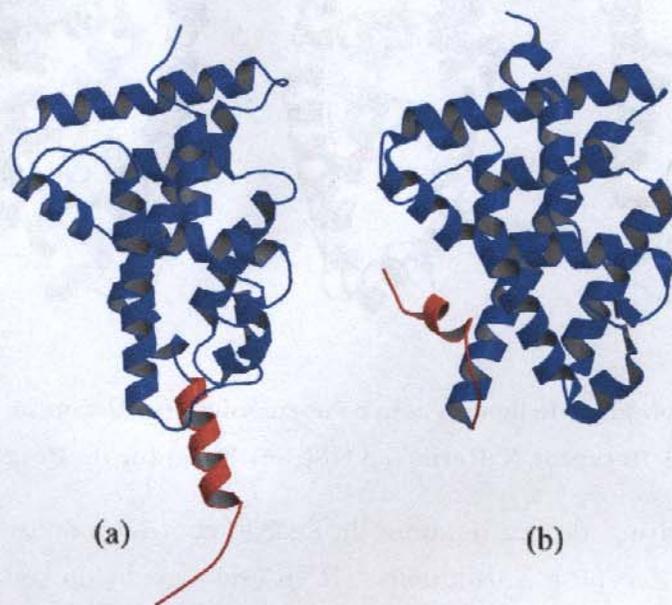


Figura 1.5. Estrutura do (a) Receptor do Ácido Retinóico ( $\text{RAR}\gamma$ ) livre e (b) do Receptor X Retinóico ( $\text{RXR}\alpha$ ) associado ao seu ligante natural [17, 18].

O mecanismo do tipo ratoeira sugerido pelas estruturas do RXR livre e associada ao seu ligante apresenta, no entanto, sérios problemas. Os receptores promovem transcrição de genes quando associados a proteínas conhecidas como coativadores. Sabe-se que a interação destes coativadores com os LBDs se dá especificamente através de diversos aminoácidos que compõem exatamente a região na qual a hélice 12 se coloca na estrutura associada ao ligante [21]. Se o mecanismo de dissociação do ligante envolvesse a saída do ligante e o reposicionamento desta hélice como é sugerido pelas estruturas cristalográficas, o coativador deveria se desligar do receptor simultaneamente à, ou antes da, dissociação do complexo entre o ligante e o LBD. Isto é muito pouco provável, já que os ligantes são mo-

léculas pequenas (em geral têm em torno de 40 átomos), e os coativadores são proteínas grandes, de forma que a saída do ligante dificilmente poderia induzir a dissociação do coativador na mesma escala de tempo de sua dissociação. Espera-se, na verdade, que a saída do ligante seja rápida e que a etapa de reordenação da estrutura do LBD, mais lenta, determine a dissociação do coativador. De fato, existem evidências de que o enovelamento do LBD em torno dos ligantes do Receptor do Hormônio Tireoideano é muito mais lento que sua entrada no sítio ativo [22]. Desta forma, muitas dúvidas ainda permanecem quanto à real importância do mecanismo do tipo ratoeira para dissociação e associação dos ligantes. É importante ainda notar que as proteínas, nos retículos cristalinos dos quais se obtêm as estruturas cristalográficas, estão sujeitas a diversas interações associadas à estabilização do cristal e não às suas conformações mais importantes em solução. Isto se manifesta de forma importante para regiões superficiais e móveis das proteínas, como é exatamente o caso da hélice 12 na estrutura do RXR livre. A importância relativa da estrutura cristalográfica do RXR livre já foi reconhecida e sugere-se que deva ser uma entre diversas estruturas com energias semelhantes que predominava nas condições particulares nas quais os cristais foram obtidos [21]. Inclusive, uma conformação semelhante, com a hélice 12 estendida, foi obtida para o receptor do estrogênio associado ao seu ligante, mas ficou claro que este resultado era apenas uma consequência do empacotamento cristalino [23].

Os LBDs, como já foi dito, possuem importantes superfícies de dimerização. A estrutura do RXR livre de seu ligante foi obtida na forma de um dímero. Nele, cada monômero contribui com 11% de sua área superficial para a formação do dímero, sendo os aminoácidos envolvidos provenientes principalmente da hélice 10 (na Figuras 1.4 (a) e (b), a hélice 10 é a  $\alpha$ -hélice amarelada no topo) [2, 17, 18]. As estruturas dos dímeros devem ser fundamentais para compreensão da associação destes receptores ao DNA mas, além das estruturas de baixa resolução obtidas por SAXS [14], ainda não existem estruturas dos domínios de associação com o DNA e com os ligantes juntos. Estruturas de LBDs de outros receptores também foram obtidas na forma de dímeros, sendo as superfícies de dimerização semelhantes nos diferentes casos [2, 24, 25].

As estruturas dos LBDs dos diferentes receptores são, desta forma, bastante semelhantes, mesmo que suas seqüências primárias sejam semelhantes em pouco

mais de 20% dos aminoácidos. As funções das diferentes regiões foram já reconhecidas, havendo superfícies de dimerização, de recrutamento de correpressores e coativadores e uma cavidade hidrofóbica responsável pela associação do ligante. A estrutura do RXR-LBD livre sugere um mecanismo de associação do ligante, que não é totalmente satisfatório por implicar a dissociação dos coativadores antes da saída do hormônio. As relações entre estrutura e atividade deste domínio são de extrema importância e complexidade, sendo ele o principal alvo das pesquisas em biologia molecular de receptores nucleares.

## Capítulo 2

# A Família dos Receptores do Hormônio Tireoideano

O objeto de estudo deste trabalho é o domínio de associação com o ligante do Receptor do Hormônio Tireoideano. Os hormônios tireoideanos possuem diversas funções regulatórias tanto na diferenciação celular e no desenvolvimento como em vários processos metabólicos em organismos adultos. Entre as atividades relacionadas com o desenvolvimento, se destaca por promover a transformação dos girinos em sapos adultos, além de ser fundamental para o desenvolvimento sadio do sistema nervoso central em crianças. Em organismos adultos atua na regulação da atividade cardíaca, no controle dos níveis de colesterol, no ritmo do metabolismo basal e no metabolismo de tecidos conectivos [3].

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

Existem diferentes tipos de receptores do hormônio tireoideano, que são produtos da expressão de dois genes, denominados  $\alpha$  e  $\beta$ . O conjunto é formado por três receptores que regulam a expressão gênica em resposta aos hormônios tireoideanos, conhecidos como  $TR\alpha1$ ,  $TR\beta1$  e  $TR\beta2$ , além de duas variantes moleculares,  $TR\alpha2$  e  $TR\alpha3$ , que não se ligam ao hormônio, mas que provavelmente modificam a atuação dos receptores verdadeiros [26, 27].

Cada uma das variedades destes receptores é expressada de forma particular nos diferentes tecidos. O receptor  $TR\beta1$  é expressado em grande quantidade no fígado e nos rins, o  $TR\beta2$  é particularmente abundante no hipotálamo e na glândula pituitária e o  $TR\alpha1$  é expressado em grandes concentrações no coração [13, 26].

Desta forma, ratos que não possuem os receptores  $TR\beta$  possuem elevadas concentrações do hormônio no organismo (devido à baixa sensibilidade da glândula pituitária ao hormônio) e disfunções hepáticas. Por outro lado, ratos que não apresentam o receptor  $TR\alpha 1$  possuem sintomas totalmente diferentes, consistentes com o hipotireoidismo cardíaco humano [26].

## 2.2 Hormônios tiroideos naturais

O principal hormônio secretado pela glândula tireóide é o 3,5,3',5'-tetra-iodo-L-tironina (também conhecido com tiroxina, ou T4). Uma menor quantidade de 3,5,3'-tri-iodo-L-tironina (T3) é produzida. No entanto, nos tecidos periféricos ocorre uma substancial perda de iodo das moléculas de T4 para a formação de T3. Este hormônio, produzido por essas duas fontes, é o principal responsável pela atividades dos hormônios tiroideos. Sua abundância nos tecidos depende não só de sua produção como da atividade de processos de transporte e degradação dentro e fora das células [3]. Estes dois hormônios estão representados na Figura 2.1. Como pode ser observado, a diferença entre estes dois hormônios está na substituição de um iodo, presente na molécula de T4, por um hidrogênio no T3, na posição 5' [25]. Os hormônios possuem grande afinidade com seus receptores. Por exemplo, a constante de equilíbrio de associação do hormônio T3 com o receptor  $TR\beta 1$  é de  $2 \times 10^9 \text{ Mol}^{-1} \text{ L}$ , mostrando que pequenas concentrações destes hormônios no organismo já são suficientes para estimular a resposta dos receptores.

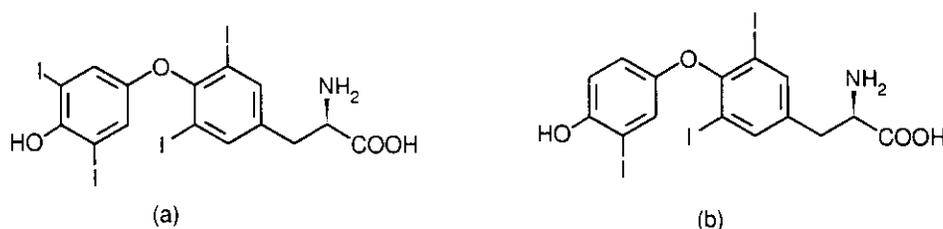


Figura 2.1. Hormônios naturais mais importantes para atividade dos hormônios tiroideos: (a) tiroxina, T4; (b) tri-iodotironina, T3.

O hormônio natural T3 já é usado para o tratamento de algumas doenças. É geralmente empregado de forma negligente e irregular para o tratamento da obesidade e de outros distúrbios metabólicos, mas possui sérios efeitos colaterais. Inclusive,

muito recentemente um análogo do hormônio tireoideano teve sua proibição recomendada no Brasil por provocar “febre, sintomas cardiovasculares (taquicardia, palpitações e hipertensão; ataques cardíacos e infarto agudo do miocárdio; morte súbita), [problemas] neurológicos (insônia, nervosismo, depressão, psicose, derrame cerebral e coma)<sup>2</sup>”. O uso recomendado destes medicamentos é hoje restrito ao tratamento de hipotireoidismo (no qual apenas repõem-se as taxas do hormônio normais no organismo) e para suprimir a produção do hormônio pela glândula em casos de câncer na tireóide.

Hoje sabe-se que estes efeitos colaterais estão associados à atividade de diferentes isoformas do receptor que são expressadas em quantidades diferentes nos diferentes tecidos. Uma vez reconhecido isto, iniciou-se uma busca de análogos do hormônio cuja afinidade em relação às diferentes isoformas do receptor fosse controlada, de forma que os efeitos benéficos das terapias pudessem ser obtidos sem os graves efeitos colaterais que atualmente restringem seu uso seguro para os poucos casos já citados [27].

Veremos que um ligante artificial já foi desenvolvido e que apresenta a seletividade desejada em relação às duas isoformas. Como esperado, os efeitos benéficos sobre o metabolismo são de fato conservados enquanto que os efeitos colaterais indesejados são significativamente reduzidos [27]. No entanto, este ligante foi obtido de forma casual e o estudo das estruturas deste ligante associado às diferentes isoformas do receptor ainda não foi capaz de evidenciar as razões de sua seletividade [13]. O desenvolvimento de hormônios artificiais com as propriedades desejadas é ainda um problema aberto, especialmente quando se considera que uma variedade de compostos deve ser desenvolvida para que algum deles tenha a chance de se tornar clinicamente viável.

## 2.3 Domínios de Ligação com o Hormônio

Os domínios de ligação com o hormônio dos receptores TR $\beta$ 1 e TR $\beta$ 2 são idênticos, de forma que o desenvolvimento de ligantes seletivos para uma ou outra isoforma entre eles não é possível, ao menos do ponto de vista de seu reconhecimento por parte dos receptores. Por outro lado, suas seqüências de aminoácidos

---

<sup>2</sup>Boletim do Instituto de Defesa do Consumidor (Indec) de 23 de Maio de 2003.

são 86% similares à seqüência do TR $\alpha$ 1, revelando a possibilidade de que ligantes com seletividades diferentes entre os dois tipos de receptores sejam desenvolvidos [13, 26]. De fato, os hormônios naturais já possuem afinidades distintas em relação aos diferentes tipos. Por exemplo, ligante T3 possui uma constante de associação de  $4 \times 10^9$  Mol L $^{-1}$  com o receptor TR $\alpha$ 1, que é aproximadamente duas vezes maior que a constante de afinidade com o receptor TR $\beta$ 1 [28].

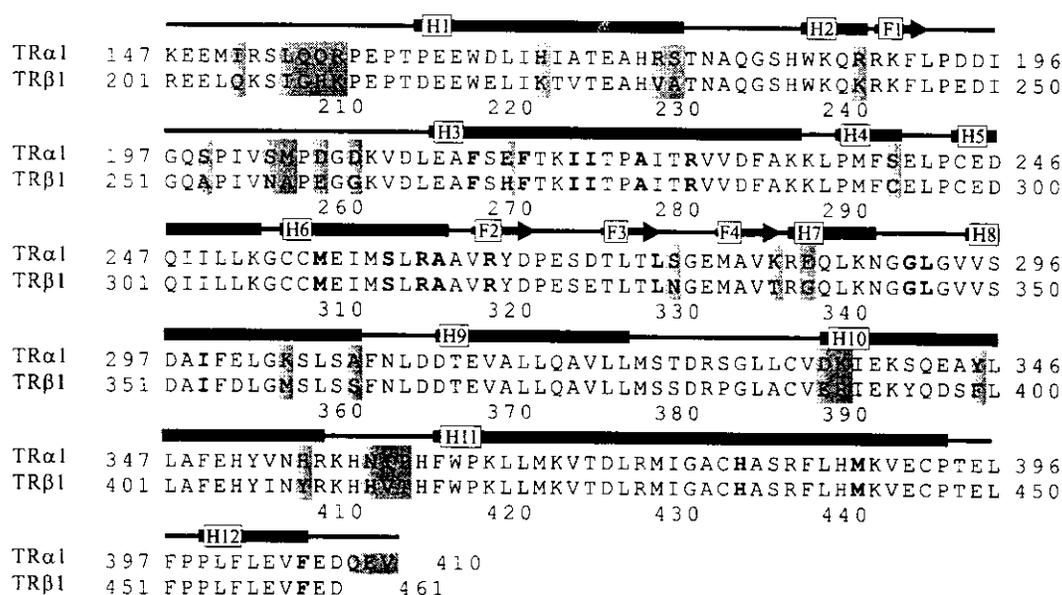


Figura 2.2. Comparação entre as seqüências primárias dos receptores TR $\alpha$ 1 e TR $\beta$ 1 humanos [13].

Uma comparação das seqüências primárias dos receptores TR $\alpha$ 1 e TR $\beta$ 1 humanos está representada na Figura 2.2. Nela, os aminoácidos diferentes estão sombreados, os aminoácidos que interagem diretamente com o hormônio estão em negrito e os tipos de estrutura estão indicados pela figura sobre a seqüência, sendo H1 a H12 as  $\alpha$ -hélices e F1 a F4 as folhas- $\beta$ . Devido à menor extensão dos domínios N-terminal e DBD da isoforma TR $\alpha$ 1, seus resíduos são numerados de 147 a 410 (264 aminoácidos), enquanto que os resíduos do TR $\beta$ 1 são numerados de 201 a 461 (261 aminoácidos). Por outro lado, o LBD da isoforma  $\alpha$  possui uma hélice 12 três resíduos mais extensa, que são importantes para as interações com coativadores [13].

### Características estruturais fundamentais

O domínio de ligação com o hormônio do receptor TR $\alpha$ 1 pode ser observado na Figura 1.4 (a). Suas características principais são semelhantes às características gerais dos LBDs dos receptores nucleares, sendo formado por três conjuntos de  $\alpha$ -hélices agrupados na forma de um *sanduíche* cujas hélices no centro se encontram aproximadamente ortogonais às hélices externas [3, 19]. Além disso, possui o característico grampo- $\beta$ , que é formado pelas folhas F3 e F4 representadas na Figura 2.2. Devido à grande similaridade das seqüências primárias das duas isoformas, as estruturas dos dois LBDs são muito parecidas. O receptor TR $\alpha$ 1 está representado na Figura 1.4 e de forma mais completa na Figura 2.3. Uma imagem semelhante poderia representar o receptor TR $\beta$ 1, com pequenas variações [3, 19].

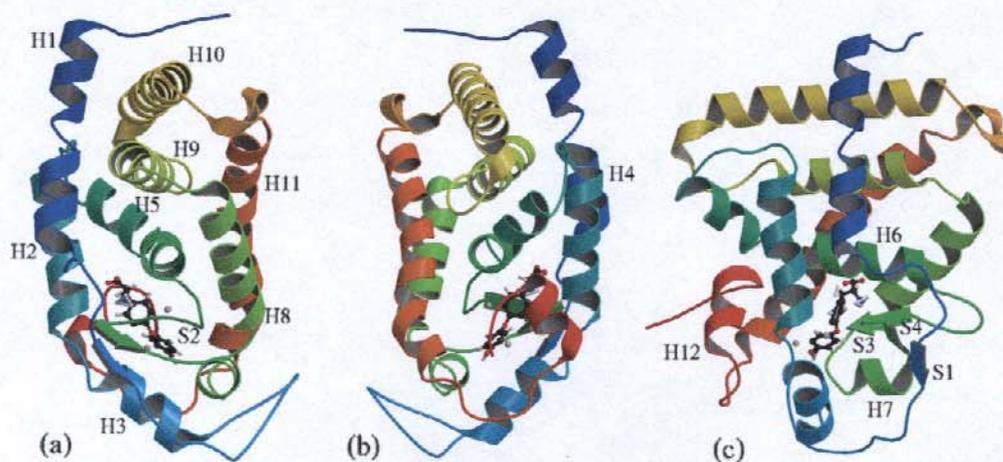


Figura 2.3. Três imagens do LBD do receptor TR $\alpha$ 1 e a posição de cada elemento de estrutura secundária.

É evidente na estrutura da Figura 2.3(c) que a hélice 12 está dobrada sobre a estrutura, na conformação encontrada também para o receptor do ácido retinóico associado ao seu ligante (ver Figura 1.5). Desta forma, seria natural supor que a estrutura dissociada do hormônio também fosse semelhante à estrutura dissociada do hormônio do receptor RXR [3]. Como não existem estruturas livres para nenhum outro receptor, esta generalização seria uma especulação razoável. É importante notar que a hélice 12 é a região C-terminal de todo o receptor, enquanto que o DBD se associa ao LBD a partir da hélice 1, que é a região N-terminal do LBD.

O ligante, T3 na Figura 2.3, se liga à uma cavidade basicamente hidrofóbica na parte inferior da proteína, característica que é conservada em toda a superfamília de receptores nucleares que possuem ligantes e estruturas determinados [25].

### A cavidade de ligação com o hormônio

Uma análise global da Figura 2.2 mostra que os resíduos que interagem diretamente com o hormônio pertencem às hélices H3, H6, H8, H11 e H12, sendo que as mais envolvidas são a H3 (6 resíduos) e H6 (4 resíduos). Outros aminoácidos que pertencem à cavidade de ligação estão nas folhas- $\beta$  F2 e F3 e nos *loops* que ligam as folhas F3 e F4 e as hélices H7 e H8. Todos estes aminoácidos que interagem diretamente com o hormônio se conservam nas duas seqüências,  $\alpha$  e  $\beta$ . Ainda mais, estes aminoácidos também se conservam nos receptores do rato, galinha e do sapo, mostrando sua importância para a alta afinidade destes receptores em relação ao T3 [13]. O reconhecimento destes resíduos como sendo os responsáveis pelas interações diretas do hormônio se deu pela determinação da estrutura dos receptores TR $\alpha$ 1 do rato e do receptor TR $\beta$  humano associados ao ligante natural T3 e a outros ligantes artificiais [13, 19, 22].

No sítio ativo, o T3 forma interações hidrofílicas através do carboxilato e da amina em uma de suas extremidades e através do fenol na outra extremidade, representados na Figura 2.1.

### 2.3.1 O desenvolvimento de ligantes seletivos

A grande importância farmacêutica do desenvolvimento de ligantes com diferentes afinidades em relação às isoformas TR $\alpha$  e TR $\beta$  dos receptores do hormônio tireoideano motiva o estudo da estrutura de novas moléculas análogas aos hormônios naturais e suas atividades sobre os receptores. Estes estudos têm resultados em duas frentes curiosamente distintas: desenvolveu-se um ligante com as propriedades desejadas de seletividade de forma totalmente casual, chamado GC-1. Por outro lado, estabeleceu-se uma metodologia denominada “método da extensão” com a qual diversos antagonistas e recentemente agonistas, puderam ser projetados e estudados. Até muito recentemente os resultados mais importantes associados à compreensão das diferenças de seletividade das duas isoformas estavam associados

ao ligante GC-1.

### 2.3.2 O ligante GC-1

O ligante GC-1 foi originalmente desenvolvido por Grazia Chiellini no grupo de Thomas Scanlan [29] com o intuito de sintetizar uma molécula semelhante ao hormônio T3, sendo que os átomos de Iodo tiveram de ser substituídos para que se obtivesse uma rota de síntese razoavelmente simples<sup>3</sup>. Sua estrutura consiste na estrutura do T3 com algumas substituições que podem ser observadas pela comparação das estruturas nas Figuras 2.1 (b) e 2.4 (a). Fundamentalmente, os três Iodos são substituídos por grupos alifáticos, o oxigênio do éter é substituído por um grupo CH<sub>2</sub>, a amina é removida e um éter é adicionado na posição  $\alpha$  à carboxila.

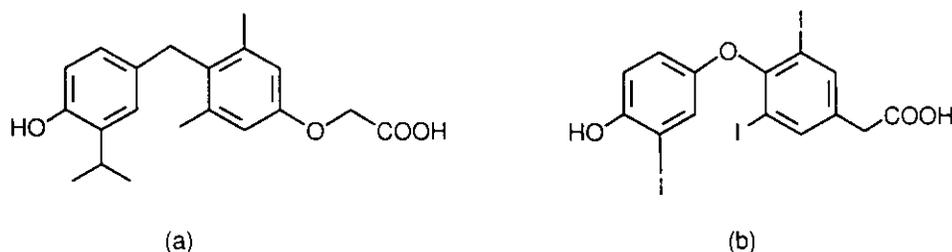


Figura 2.4. Estruturas dos ligantes artificiais (a) GC-1 e (b) Triac.

Apesar de não ter sido projetado com esse intuito, o GC-1 se revelou um modelo ideal para o estudo da seletividade dos receptores TR $\alpha$  e TR $\beta$  por apresentar a seletividade desejada. Este ligante tem uma afinidade aproximadamente 10 vezes maior ao TR $\beta$  em relação ao TR $\alpha$  [27]. Mais ainda, o estudo de seu efeito sobre o metabolismo e a atividade cardíaca de ratos mostrou que as especulações sobre os possíveis efeitos benéficos de um ligante  $\beta$  seletivo eram corretas: os ratos tratados com GC-1 apresentaram redução de peso e de colesterol sem apresentar os conhecidos efeitos colaterais cardíacos [26, 27].

<sup>3</sup>Este propósito simples para o desenvolvimento do ligante GC-1 não é relatado na literatura, mas chegou a nós por intermédio de Paul Webb (UCSF). Dado o sucesso deste ligante, o estudante da literatura se surpreende por não haver nenhuma referência a uma metodologia racional que tenha levado à sua estrutura. O nome GC-1 inclusive tem o significado de ser primeiro dessa família sintetizado por Grazia Chiellini.

A seletividade deste ligante em relação à isoforma rapidamente passou a ser estudada do ponto de vista estrutural. Estes estudos resultaram na apresentação da estrutura cristalográfica do GC-1 associado ao receptor TR $\alpha$ 1 e das estruturas do ligante Triac associado aos receptores TR $\alpha$ 1 e TR $\beta$  há cerca de dois anos [13]. O ligante Triac era um modelo interessante para o estudo da seletividade já que sua afinidade é menos de duas vezes maior para o receptor TR $\beta$  que para o receptor TR $\alpha$ , não apresentando uma seletividade importante como a do GC-1 [28].

Apesar do título sugestivo do artigo em que estas estruturas foram apresentadas (“Hormone Selectivity in Thyroid Hormone Receptors”), os resultados das análises estruturais foram insuficientes para uma atribuição precisa das razões da seletividade do ligante GC-1 [13]. As estruturas dos ligantes Triac e GC-1 associadas ao receptor TR $\beta$  estão apresentadas na Figura 2.5. O único aminoácido razoavelmente próximo ao sítio de ligação com o hormônio, distinto entre as isoformas  $\alpha$  e  $\beta$  é a Asparagina 331 (N331), que na isoforma  $\alpha$  é substituída por uma Serina (S277).

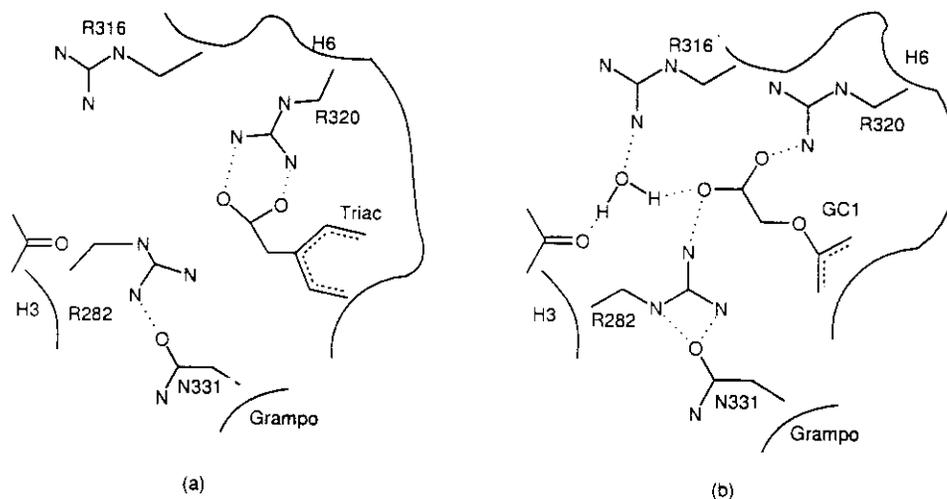


Figura 2.5. Comparação das estruturas do receptor TR $\beta$  associado aos ligantes (a) Triac e (b) GC-1. A maior parte dos átomos de hidrogênio não foi representada para explicitar que estas são estruturas cristalográficas.

Curiosamente este aminoácido não interage diretamente com os ligantes em nenhuma das duas estruturas apresentadas na Figura 2.5 e, ainda, as interações que apresenta com a Arginina 282 (R282) podem tanto ocorrer na presença do

GC-1 com na presença do ligante Triac. Tentativas frustradas foram feitas para observar algum padrão claro de interações nessa rede de pontes de hidrogênio que pudesse esclarecer as razões da seletividade do ligante GC-1. No mesmo estudo, no entanto, foram feitas as mutações N331S no receptor TR $\beta$  e S277N no receptor TR $\alpha$ 1 de forma que se esse fosse o aminoácido responsável, a seletividade deveria ser invertida. Isto é de fato o que ocorre, sendo as afinidades do GC-1 com os mutantes semelhantes às afinidades das isoformas nativas com os aminoácidos naturais correspondentes. A evidência clara de que esta única substituição de aminoácidos era responsável pela seletividade permaneceu contrastante com o difuso papel estrutural que estes aminoácidos apresentam [13].

É possível que a obtenção das estruturas do ligante GC-1 associado ao TR $\alpha$  e aos dois mutantes (S277N-TR $\alpha$ 1 e N331S-TR $\beta$ ) acabem por esclarecer as razões estruturais da seletividade do ligante GC-1. O grupo do Prof. Polikarpov está trabalhando para obter estas estruturas. Por outro lado, também é possível que a seletividade esteja associada a alguma propriedade dinâmica do sítio ativo, que não pode ser observada nas estruturas cristalográficas. Como veremos, o aminoácido S277 está envolvido de forma significativa em diversos mecanismos de dissociação aqui estudados, gerando uma nova linha de raciocínio para a interpretação de propriedades geralmente associadas apenas ao encaixe preciso dos ligantes nos sítios ativos das proteínas receptoras.

### 2.3.3 Os ligantes 5'-substituídos

O outro conjunto de ligantes que vem sendo desenvolvido, desta vez de forma racional, é o conjunto de ligantes 5'-substituídos. A posição 5' do ligante T3 é a posição simétrica à que o Iodo se encontra no anel fenólico (ver Figura 2.1). A idéia por trás do desenvolvimento destes ligantes consiste em que as interações mais importantes para a associação do ligante não são modificadas (interações hidrofílicas através do carboxilato) conservando a afinidade do ligante, mas as extensões na posição 5' podem impedir um enovelamento adequado do LBD fazendo com que o receptor não apresente atividade. Originalmente, estes ligantes foram desenvolvidos para atuar como antagonistas, nos quais o posicionamento incorreto da hélice 12 impediria a associação do LBD com coativadores [30, 31]. Este mecanismo foi observado para

antagonistas do Receptor do Estrógeno [32, 33]. A idéia de que ligantes semelhantes aos agonistas, mas com substituintes que induzem um enovelamento incorreto da proteína, devem ser antagonistas foi denominada “hipótese da extensão”.

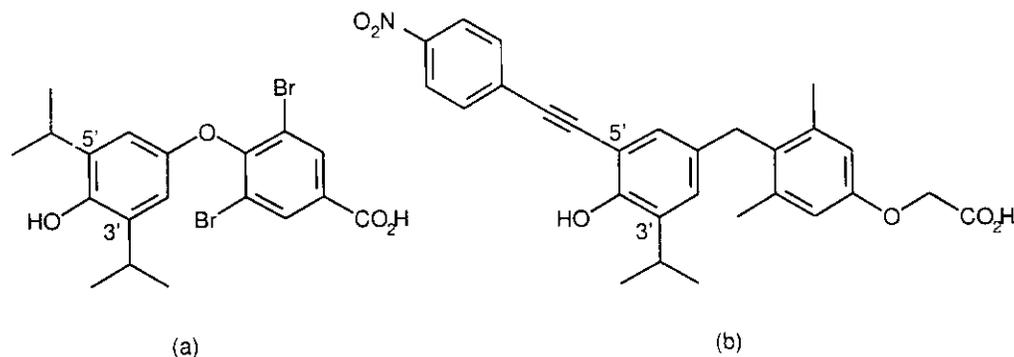


Figura 2.6. Estrutura de dois antagonistas 5'-substituídos: (a) MIBRT [30], (b) NH-3 [31].

Alguns antagonistas desenvolvidos de acordo com a hipótese da extensão estão representados na Figura 2.6. Ambos possuem 10% da atividade do ligante natural T<sub>3</sub>. Por exemplo, o ligante NH-3 possui uma constante de dissociação de  $20 \pm 7 \times 10^{-9} \text{ Mol L}^{-1}$  com o receptor TR $\alpha$ 1 [12]. A enorme afinidade destes ligantes, especialmente do NH-3, com os receptores, mostra que os LBDs são capazes de se associar com ligantes extremamente diferentes dos ligantes naturais. Isto torna evidente que, ao menos quando dissociados dos ligantes, os receptores devem possuir uma mobilidade significativa. Além disso, estes ligantes já sugerem mecanismos de associação, já que as enormes extensões na posição 5' de alguma forma não introduzem um impedimento estérico significativo durante o processo de associação. Isto se torna ainda mais evidente porque ligantes com outros grupos grandes na posição 5', que não o do NH-3, também possuem altas afinidades [12]. O ligante NH-3 mostrou-se especialmente interessante por não possuir nenhuma atividade como agonista e, ainda, por inibir a atividade dos receptores *in vivo* [12, 31]. Foi demonstrado que a inibição da atividade dos receptores pelo ligante NH-3 estava associada à incapacidade do receptor de se associar ao coativador. Da mesma forma, este ligante inibe a associação do corressor.

Curiosamente, outros ligantes com extensões significativas na posição 5' são agonistas parciais da atividade dos TRs. Este resultado levou um dos mais impor-

tantes grupos de estudos experimentais em receptores do hormônio tireoideano a sugerir pela primeira vez que a dinâmica do receptor pode estar associada à sua atividade, em artigo publicado em dezembro de 2002 [34]. Na Figura 2.7 estão apresentados dois agonistas dos receptores. Evidentemente estes agonistas não podem estar causando modificações substanciais nos LBDs e, em particular, na superfície de associação com o coativador formada pela hélice 12.

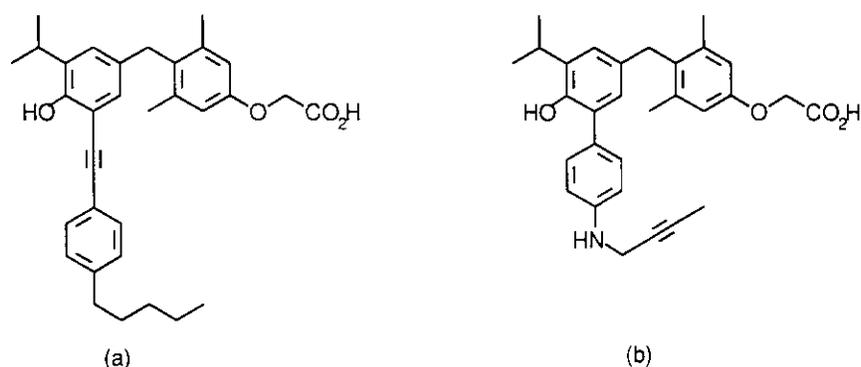


Figura 2.7. Estrutura de dois agonistas 5'-substituídos: (a) NH-2 [12], (b) GC-17 [34].

Em [34] Baxter e colaboradores especulam que a mobilidade da cadeia lateral destes agonistas é o que dá a liberdade de movimento para a hélice 12 atingir a posição associada ao recrutamento dos coativadores. Sua análise não permite, no entanto, sugerir uma conformação para estas extensões e nem sugerir um mecanismo de associação que não implique em uma dinâmica muito distinta da de agonistas naturais. Uma das simulações apresentadas neste trabalho, por outro lado, sugere um mecanismo natural para a associação e dissociação destes ligantes e para seu posicionamento sem a alteração significativa da superfície à qual os coativadores se associam, sendo esta uma das principais contribuições deste trabalho e a que despertou o maior interesse do grupo liderado por John Baxter.

## Capítulo 3

# Dinâmica Molecular dos Receptores Nucleares

Experimentos para a determinação da dinâmica molecular de proteínas vêm sendo realizados há muitos anos, mas as técnicas capazes de fornecer informações estruturalmente detalhadas só forneceram resultados relevantes recentemente [35–37]. Ressonância magnética nuclear, mutações sítio-dirigidas e fluorescência, mesmo sendo poderosas técnicas para o estudo da dinâmica de proteínas, devem ser complementadas por simulações computacionais para uma profunda e detalhada descrição dos processos envolvidos [35, 38, 39]. A dinâmica molecular de receptores nucleares, por sua vez, está surpreendentemente pouco explorada. Existem poucas simulações relatadas e poucos experimentos que procuram descrever diretamente a dinâmica destas proteínas. Os mecanismos dinâmicos dos receptores nucleares são deduzidos, em geral, das análises das estruturas estáticas e de experimentos indiretos, como mutações sítio-dirigidas.

As duas simulações relatadas para a dissociação do Ácido Retinóico de seu Receptor usam duas técnicas distintas conhecidas como Dinâmica Molecular com Amostragem Ampliada [40] e Dinâmica Molecular com Caminho Induzido [41], que neste trabalho são utilizadas para a descrição dos mecanismos de dissociação do ligante T3 dos receptores do hormônio tireoideano. A idéia geral das simulações e destas duas técnicas serão agora introduzidas e os resultados obtidos por Karpplus e colaboradores com DMAA [40] e por Schulten e colaboradores com DMCI [41] serão descritos, completando os resultados necessários para a contextualização deste trabalho.

### 3.1 Simulações computacionais de dinâmica molecular

As técnicas de estudo por simulações computacionais da dinâmica de proteínas estão bastante bem consolidadas [42]. Diversos campos de força foram desenvolvidos e simulações utilizando estes campos apresentam boa correlação com resultados experimentais [35, 38, 39, 43, 44]. As interações interatômicas e intermoleculares são representadas por potenciais efetivos clássicos para átomos individuais ou grupos específicos como  $CH_2$  ou  $CH_3$ . Estes modelos moleculares, conhecidos como *all-atom models* são extensivamente utilizados em simulações de dinâmica molecular ou Monte Carlo para sistemas líquidos ou biomoléculas (isoladas ou em solução). Existem diversos potenciais efetivos clássicos desenvolvidos especificamente para proteínas, sendo OPLS, GROMOS96, CHARMM e AMBER, os mais utilizados. Estes campos de força descrevem as interações entre diferentes sítios pela soma de interações de curto alcance, do tipo Lennard-Jones, e termos de interação eletrostática coulombianos. Estes potenciais são dados em termos de interações aditivas entre pares atômicos:

$$V = V^{bonded} + V^{nonbonded} \quad (3.1)$$

com

$$V^{bonded} = \sum_{bonds} K_r(r - r_0)^2 + \sum_{angles} K_\theta(\theta - \theta_0)^2 + \frac{1}{2} \sum_{n,dihed} V_n[1 - (-1)^n \cos(n\varphi + \gamma_n)] \quad (3.2)$$

e

$$V^{nonbonded} = \sum_{i,j} 4\varepsilon_{ij}[(\sigma_{ij}/r)^{12} - (\sigma_{ij}/r)^6] + \frac{q_i q_j}{4\pi\varepsilon_0 r_{ij}} \quad (3.3)$$

em que o primeiro e segundo termos em 3.2 representam potenciais harmônicos de estiramento e deformação de ligações (*bonded*), enquanto o terceiro termo corresponde à energia de torção de diédros  $\varphi$  [42]. A Equação 3.3 fornece o potencial entre pares atômicos não diretamente ligados na molécula, bem como entre pares atômicos de moléculas distintas. A combinação de parâmetros na forma  $\sigma_{ij} = (\sigma_i + \sigma_j)/2$  e  $\varepsilon_{ij} = \sqrt{\varepsilon_i \varepsilon_j}$  é utilizada para a determinação dos potenciais de pares a partir dos potenciais atômicos ou de grupos. Descrições mais detalhadas destes potenciais podem ser encontradas na literatura [45–48]. Os conjuntos de parâmetros de cada um destes potenciais são continuamente ajustados e testados em diferentes condições de simulação tornando-os representações cada vez mais realistas dos potenciais

reais.

Uma vez definidos os potenciais, o princípio das simulações de dinâmica molecular é bastante simples. Dado um conjunto de coordenadas iniciais para todos os átomos envolvidos, é possível calcular as forças que atuam sobre todos os átomos pelas equações que descrevem os potenciais de interação, sendo  $\vec{F}(t) = -\nabla\vec{V}(t)$ . De acordo com a segunda lei de Newton, temos

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

sendo  $m$  a massa da partícula e  $\vec{a}$  sua aceleração, com o que é possível obter a aceleração da partícula a partir dos potenciais de interação e de sua massa. Tendo definido um conjunto de velocidades iniciais para as partículas, que em geral deve possuir uma distribuição que forneça energias cinéticas correspondentes à temperatura desejada, basta determinar as velocidades no instante seguinte  $t + dt$  por

$$\vec{v}(t + dt) = \vec{v}(t) + \vec{a}(t)dt$$

e as posições no instante seguinte por

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

com o que o ciclo de cálculo dos potenciais e determinação das novas velocidades e posições pode ser reiniciado. Este algoritmo de integração das equações de movimento é o mais simples. Existem algoritmos diferentes que são ao mesmo tempo mais precisos e mais eficientes, mas cujo princípio fundamental é o mesmo [42].

## 3.2 Dinâmica Molecular com Caminho Induzido

A técnica de Dinâmica Molecular com Caminho Induzido consiste basicamente na aplicação de uma força externa a algum átomo na simulação que induz uma dinâmica distinta da dinâmica clássica do sistema. A força é aplicada de forma a induzir um determinado mecanismo de interesse cujas características principais devem ser previamente assumidas [41, 49].

No caso das simulações de dissociação de um ligante de um receptor, estas simulações tem uma aplicação evidente: definindo-se o aspecto geral dos mecanismos de dissociação do ligante, sendo isto a direção de escape com relação à estrutura

da proteína, basta realizar simulações com DMCI nas quais o ligante é induzido (puxado) a seguir o caminho desejado. Apesar de ser necessário saber quais são as direções que podem representar caminhos interessantes, as interações do ligante (apenas um) com a proteína não são aproximadas, de forma que é possível obter informações dinâmicas muito precisas.

A força externa aplicada na técnica DMCI é da forma

$$\vec{F}_{ext}(t) = k(\vec{v}t - \Delta\vec{x}) \quad (3.4)$$

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 no tempo de simulação adequado às possibilidades do usuário. Quanto menor  $|\vec{v}|$ , mais lentamente a força vai atuar, de forma que durante o caminho de dissociação o ambiente em torno do sítio induzido tem maiores possibilidades de assumir conformações mais estáveis. A constante  $k$ , por outro lado, deve ser escolhida de forma que um deslocamento pequeno do sítio puxado, i. e. 1 ou 2 Å, provoque uma redução perceptível na força.

A força possui a interessante propriedade de estar, em todo instante de tempo, 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 está movendo, a componente  $\vec{v}t$  garante que essa força vai aumentar até que a resistência do meio (que em geral provém das interações inter-moleculares) seja vencida e o sítio se desloque na direção desejada. 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 específicas no sistema responsáveis por esta resistência, que poderiam ser ligações de hidrogênio, por exemplo.

### 3.3 Dinâmica Molecular com Amostragem Ampliada

A técnica de Dinâmica Molecular com Amostragem Ampliada consiste na realização de uma simulação utilizando muitas réplicas de uma dada molécula, que

partem de posições semelhantes, de forma que as trajetórias das diferentes réplicas representem o conjunto de trajetórias possíveis que seriam obtidas em diferentes simulações. As réplicas devem ser colocadas em posições iniciais idênticas e a cada uma um conjunto de velocidades iniciais diferentes deve ser atribuído. A trajetória de cada réplica se diferenciará da trajetória das demais, devido à diferença de velocidade inicial e, então, espera-se que as trajetórias seguidas representem trajetórias realistas. Como as réplicas colocadas inicialmente em posições semelhantes devem ser totalmente independentes na simulação, os potenciais de interação entre as réplicas deve ser anulado. Além disso, para que o ambiente em que as réplicas se encontram não seja muito distorcido pela presença das diversas cópias da mesma molécula, os potenciais entre elas e os componentes do ambiente devem ponderados pelo número de réplicas colocado, isto é

$$\sigma_{ij} = \frac{\sigma_i + \sigma_j}{2}$$

porém com

$$\epsilon_{ij} = \frac{\sqrt{\epsilon_i \epsilon_j}}{n}$$

e

$$q'_i = \frac{q_i}{n}$$

se  $i$  não é do mesmo tipo que  $j$  e  $i$  é do tipo da molécula copiada  $n$  vezes. Além disso, entre as réplicas temos  $\epsilon_{ij} = 0$  e  $q'_i = 0$ , de forma que as interações entre elas são nulas. Entre as outras moléculas da simulação, as interações são representadas pelos potenciais completos. Esta metodologia permite, portanto, determinar em apenas uma simulação diferentes trajetórias que uma partícula poderia seguir partindo de condições iniciais ligeiramente diferentes, sendo computacionalmente muito mais barata que a realização do mesmo número de simulações independentemente. Além disso, as constantes de dissociação aumentam exponencialmente com a diminuição das barreiras de potencial, sendo a dissociação, de fato, mais rápida. A importância de cada trajetória é obtida pela probabilidade relativa de que as moléculas sigam a trajetória em relação ao total de cópias da molécula na simulação.

Quando a dinâmica do ambiente, geralmente uma proteína, é pouco dependente da dinâmica da molécula estudada, as trajetórias seguidas pelas diferentes cópias

da molécula devem corresponder às trajetórias possíveis em uma simulação clássica. Por outro lado, se a trajetória das partículas do ambiente depende muito da dinâmica da molécula copiada, dificilmente as trajetórias obtidas por este método serão realistas, uma vez que as interações a que o ambiente está sujeito serão significativamente diferentes, em módulo e distribuição, daquelas a que estaria sujeito se apenas uma cópia da molécula estudada, com seus potenciais completos, estivesse presente. O grau de dependência da dinâmica de uma proteína em relação à dinâmica de moléculas menores não pode ser determinado a priori. As proteínas são macromoléculas que possuem dinâmicas muito restritas pelas interações estereais e pelas restrições estruturais de sua própria cadeia, sendo alvos potencialmente possíveis de serem estudados com esta metodologia.

### **3.4 Estudos da dissociação do Ácido Retinóico de seu receptor**

Existem apenas dois estudos publicados sobre a dinâmica molecular de receptores nucleares envolvendo o domínio de associação com o hormônio [40, 41]. Cada um deles emprega uma das técnicas acima descritas de forma independente. Ambos os estudos ampliaram a visão dos possíveis mecanismos de dissociação e de associação dos hormônios na família dos receptores nucleares significativamente, gerando uma base sobre a qual estudos experimentais podem ser feitos.

#### **Estudo da dissociação do Ácido Retinóico usando DMAA**

Não obstante a associação de hormônios provoque modificações significativas na estrutura dos receptores nucleares [18], os estudos da dissociação do ácido retinóico de seu receptor protéico usando a técnica DMAA revelou mecanismos coerentes de dissociação [40]. Neste trabalho, Blondel e Karplus propuseram que o ácido retinóico pode sair do seu receptor por basicamente três mecanismos distintos. Um deles, de maior importância, tinha sido previsto pela análise das estruturas cristalográficas porque está associado à principal mudança estrutural que o receptor sofre com a associação do hormônio, a movimentação da hélice 12. Os dois mecanismos mais importantes encontrados envolviam o afastamento da hélice 12 das hélices 11 e 3 (ver Figura 2.3 para referência) [18]. Puderam mostrar, ainda, que todos os mecanismos são compostos por duas etapas: a saída do ligante do sítio

ativo e a reorganização da estrutura protéica livre. A primeira etapa resultou ser semelhante para os três mecanismos encontrados e muito se assemelha ao mecanismo de associação proposto pela análise das estruturas cristalográficas. Além dos mecanismos globais de dissociação, ainda foi possível estabelecer o papel de alguns aminoácidos em diferentes etapas da dissociação do ácido retinóico, sua colocação temporal no processo de dissociação e a estabilidade relativa dos contatos pelo tempo de interação médio de cada cópia do hormônio envolvida. Os resultados obtidos estiveram de acordo com resultados experimentais obtidos por mutações sítio-dirigidas. A técnica utilizada, no entanto, não permite uma análise precisa das interações entre o ligante e os aminoácidos, porque envolve uma aproximação bastante grosseira nos potenciais de interação (i. e., o ligante é representado por um conjunto de réplicas).

### **Estudo da dissociação do Ácido Retinóico usando DMCI**

Schulten e colaboradores aplicaram a técnica de Dinâmica Molecular com Caminho Induzido para o estudo da dissociação do ácido retinóico de seu receptor. Os caminhos através dos quais o ligante foi dissociado (ou seja, a direção da força aplicada) foram baseados na análise das estruturas do RAR livre e do RXR associado ao seu ligante, o ácido retinóico [41]. A partir da comparação das duas estruturas, escolheram que mecanismos razoáveis para a dissociação do hormônio fossem sua passagem entre as hélices 12 e 3 (ver Figura 2.3 para uma melhor visualização) e entre as hélices 12 e 11. Estes dois mecanismos foram sugeridos baseados no mecanismo “ratoeira” que envolve a abertura da hélice 12, já que seus estudos não foram baseados nas simulações com DMAA feitas por Karplus e colaboradores. Um terceiro mecanismo foi sugerido pela análise das cavidades na superfície da proteína, no qual o hormônio se dissocia do LBD passando entre o grampo- $\beta$  e as hélices 1 e 3. A estrutura inicial utilizada por eles foi a estrutura do RAR- $\gamma$  associado ao ácido retinóico [50].

A análise do perfil da força em função do tempo de simulação e dos potenciais de interação entre os diferentes aminoácidos e o ligante permitiram identificar quais interações representaram as maiores barreiras de potencial no processo de dissociação. Este tipo de análise não é possível com DMAA porque a amostragem

ampliada implica uma aproximação grosseira dos potenciais de interação entre os ligantes e a proteína, como já mencionamos. As interações que representaram as maiores barreiras para a dissociação do ácido retinóico foram as interações hidrofílicas entre o carboxilato do ácido e diversas cadeias laterais capazes de doar ligações de hidrogênio. Estas barreiras foram observadas nos três mecanismos estudados [41].

O estudo da reação da estrutura da proteína à dissociação do ligante sugeriu que os caminhos 1 e 3 (dissociação entre as hélices 11 e 12 e dissociação entre o grampo- $\beta$  e a hélice 3, respectivamente) não requerem grandes variações estruturais da proteína, devendo ser preferidos em relação ao caminho 2 sugerido. Ainda mais, o estudo da seqüência em que estas interações foram formadas e rompidas ao longo dos caminhos de dissociação permitiu atribuir a um dos caminhos a associação e a outro a dissociação do ligante. Estas atribuições, não obstante sejam bastante pretensiosas, já que as simulações não procuraram nenhum caminho de associação, permitem aos grupos de experimentalistas projetar mutações que possam suportar ou contradizer estes mecanismos. As simulações são importantes fundamentalmente porque não existem técnicas capazes de revelar a dinâmica dos receptores em escala molecular [41].

### 3.5 Conclusões e perspectivas

As duas simulações realizadas para o estudo da dissociação do ácido retinóico de seu receptor expandiram significativamente a visão da dinâmica dos receptores nucleares. Apesar de terem sido realizadas para o mesmo sistema e de forma independente, permitiram uma visualização mais precisa dos possíveis mecanismos dinâmicos envolvidos, que antes só podiam ser sugeridos pela análise das estruturas cristalográficas que, além de estáticas, ainda estão sujeitas ao empacotamento cristalino que se mostrou importante em alguns casos [23]. As deficiências de cada um dos conjuntos de simulações de Karplus e colaboradores [40] e Schulten e colaboradores [41] são complementares. Enquanto a técnica DMAA não assume nenhum mecanismo a priori, não é capaz de detalhar as interações entre os ligantes e a proteína. Por outro lado, na técnica DMCI estas interações podem ser detalhadamente investigadas, mas os mecanismos devem ser previamente assumidos.

Os dois trabalhos foram feitos de forma independente, tendo sido o que utiliza DMCI realizado antes do que usa DMAA. Por esta razão os mecanismos estudados com DMCI tiveram que ser sugeridos por razões estruturais. Ainda assim, estes estudos foram realizados para a única classe de receptores para os quais a estrutura cristalográfica do RAR $\alpha$  livre e associada ao ligante foram determinadas [18, 50], completando uma série de informações importantes, mas para apenas uma das famílias de receptores. A generalização dos mecanismos encontrados para as diferentes famílias de receptores continua sendo motivo de especulação e, como já foi visto, o mecanismo encontrado nestas simulações possui a importante deficiência de envolver a região da proteína que esta envolvida com a associação de coativadores.

## Capítulo 4

# Objetivos e Metodologia

Os resultados das simulações de dinâmica molecular que estudaram a dissociação do ácido retinóico de seu receptor resultados estão praticamente isolados em meio a uma grande quantidade de resultados experimentais e estruturas cristalográficas que vêm colaborando para a compreensão da ação desta importante família de proteínas. Quando se entra em contato com a diversidade e importância destes processos bioquímicos e biofísicos, é difícil não interessar-se em desenvolver algum trabalho que enriqueça uma área de pesquisa tão interessante do ponto de vista científico como importante do ponto de vista farmacológico. Este capítulo descreve a metodologia empregada neste trabalho, assim como as condições detalhadas de cada simulação. A apresentação destes detalhes em um capítulo à parte é coerente com que as metodologias empregadas são menos importantes, neste trabalho, que os sistemas abordados, sendo os resultados das simulações e suas implicações biofísicas melhor apresentados de forma independente. O leitor interessado apenas nos resultados e suas implicações biológicas pode passar diretamente para o capítulo seguinte.

### 4.1 Objetivos

A utilização das técnicas de simulação utilizadas por Karplus e Schulten em seus trabalhos para uma nova família de receptores expande, e praticamente duplica, as informações provenientes de simulações computacionais para a superfamília dos receptores nucleares. O trabalho ainda pode ter a importante vantagem de usar as duas técnicas de forma racional e complementar, sendo os resultados ainda mais

interessantes e representativos dos sistemas reais. Graças à extrema importância da família dos receptores do hormônio tireoideano e, evidentemente, à facilidade de acesso a resultados experimentais obtidos pelos grupos dos Professores Igor Polikarpov e John Baxter (UCSF), os estudos computacionais são ainda mais motivantes.

### **Complementaridade das técnicas DMAA e DMCI**

Como foi visto, as simulações usando Dinâmica Molecular com Amostragem Ampliada não assumem nenhum mecanismo a priori e permitem uma busca de mecanismos de dissociação sendo necessária apenas a estrutura inicial. Para isso faz-se uma aproximação (múltiplas cópias do ligante) que resulta na redução das barreiras de potencial associadas aos processos de dissociação e, desta forma, à observação da dissociação nas escalas de tempo compatíveis com a capacidade computacional disponível. No entanto, esta técnica possui a deficiência de aproximar os potenciais de interação entre cada cópia do ligante e a proteína de forma bastante grosseira, de forma que as interações específicas entre os ligantes e os aminoácidos da proteína não podem ser obtidas com realismo.

Por outro lado, a técnica de Dinâmica Molecular com Caminho Induzido requer que ao menos as direções da dissociação sejam conhecidas. Estas direções podem ser obtidas de qualquer forma, seja pela análise das estruturas cristalográficas ou por alguma evidência experimental. Uma vez assumidas as direções de dissociação, é possível estudar os mecanismos de dissociação nestas direções de forma bastante precisa, já que nenhum potencial de interação é aproximado. No entanto, como as proteínas são muito complexas, é interessante que os mecanismos estudados sejam escolhidos criteriosamente, sob a pena de que, não obstante as interações em cada mecanismo sejam razoáveis, os mecanismos em si não possuam nenhuma relevância do ponto de vista biológico.

As deficiências de cada uma das duas técnicas sugere seu uso combinado de forma complementar. Uma vez que as trajetórias de dissociação aproximadas são obtidas com DMAA, estas trajetórias podem ser estudadas usando DMCI. Desta forma as direções de dissociação são obtidas com uma técnica que não requer nenhuma suposição preliminar sobre os mecanismos, enquanto que as interações podem ser estudadas com bastante detalhe com outra técnica que não faz nenhuma

aproximação sobre os potenciais.

Neste trabalho aplicam-se ambas as técnicas, DMAA e DMCI, para o estudo da dissociação do hormônio tireoideano T3 de seus receptores nucleares. Procura-se ampliar significativamente as informações a respeito da dinâmica destas proteínas em um dos processos de maior importância para sua atividade: a associação e dissociação do hormônio. Com relação aos estudos anteriores de simulação de dinâmica molecular, este trabalho leva a vantagem de combinar as técnicas de forma racional e complementar.

## 4.2 Dinâmica Molecular com Amostragem Ampliada

A técnica de dinâmica molecular com amostragem ampliada foi implementada no programa Tinker [51] em um trabalho conjunto com o aluno Milton T. Sonoda. Estudos foram feitos da dissociação do ácido retinóico de seu receptor com o objetivo de reproduzir os resultados em [40] e experimentos computacionais foram feitos para checar o efeito de algumas condições de simulação (em particular a presença de moléculas de água estruturais) sobre a dinâmica. Em seguida, a técnica foi aplicada para o estudo da dissociação do ligante T3 do receptor TR $\alpha$ 1 e do receptor TR $\beta$ , revelando mecanismos interessantes, com novas implicações biofísicas.

### 4.2.1 Simulações da dissociação do ácido retinóico de seu receptor

Para testar a acuidade da implementação e a dependência da dinâmica em relação aos potenciais utilizados, foram feitas simulações usando DMAA do mesmo sistema estudado por Karplus e colaboradores em [40].

#### Estrutura utilizada

A estrutura inicial utilizada nas simulações da dissociação do ácido retinóico de seu receptor foi a estrutura do receptor RAR $\gamma$  humano associada ao ligante ácido 9-*trans*-retinóico (pdb id. 2LBD) [50]. Esta é uma estrutura determinada a 2,0 Å de resolução. Algumas cadeias laterais faltantes foram adicionadas com o programa

Modeller<sup>4</sup> [52] e a estrutura foi localmente otimizada para aliviar maus contatos com o método LBFGS [53] até que a média quadrática do gradiente da energia em relação às posições dos átomos fosse menor que  $0.01 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-1}$ . A estrutura possui algumas moléculas de água que fazem parte da estrutura cristalina. Foram feitas simulações com e sem essas moléculas de água. As simulações feitas por Karplus e colaboradores não incluíam nenhuma molécula de água<sup>5</sup>.

### Potenciais utilizados

A proteína e o hormônio tiveram todos seus átomos representados explicitamente, inclusive os átomos de hidrogênio. Os potenciais utilizados para a proteína foram obtidos do conjunto OPLSAA disponível na distribuição do pacote Tinker [46, 54–57]. Os potenciais do ácido retinóico foram obtidos por analogia em relação a grupos semelhantes dentro do conjunto OPLSAA. O hormônio foi mantido rígido

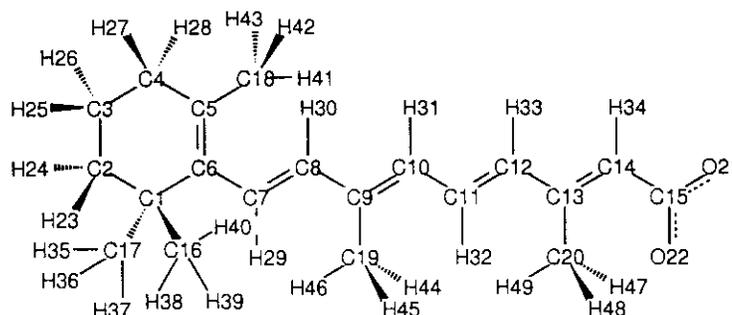


Figura 4.1. Ácido retinóico e a numeração de seus átomos.

em toda a simulação pela utilização do algoritmo RATTLE [58]. As simulações em [40] também mantiveram o ligante rígido. As cargas dos átomos no ácido retinóico foram calculadas utilizando o programa Gaussian [59]. As cargas e a

<sup>4</sup>O programa Modeller gera, a partir de uma estrutura conhecida que é dada como modelo, outra estrutura que é a mais semelhante possível com a estrutura original (dentro da capacidade de modelagem do programa). Os únicos parâmetros de entrada do programa são a estrutura modelo e as seqüências de aminoácidos desta e da estrutura nova desejada. Resíduos diferentes, cadeias laterais a mais, ou pedaços da estrutura adicionados na nova estrutura são ajustados para satisfazer restrições espaciais e minimizar potenciais clássicos CHARMM [52].

<sup>5</sup>Comunicação pessoal de Martin Karplus, a não utilização das águas não é explicitada no artigo [40].

geometria foram otimizadas com a base 6-31+--G\*\* no nível Hartree-Fock. As cargas utilizadas são as cargas Merz-Kollman.

A Tabela 4.1 mostra a que grupo, dentro do conjunto OPLSAA, cada átomo do ácido retinóico foi associado, o valor dos parâmetros de Lennard-Jones e as cargas calculadas. A numeração dos átomos na Tabela 4.1 corresponde à numeração dos átomos na Figura 4.1. O grupo carboxilato foi considerado desprotonado, que é o que se espera em soluções aquosas com pH fisiológico.

### Condições das simulações

Foram feitas simulações usando DMAA do ácido retinóico em seu receptor usando 20 e 25 cópias do ligante sem as moléculas de água da estrutura cristalina, com o intuito de reproduzir os resultados apresentados em [40]. Além disso, foram simulados sistemas com as moléculas de água da estrutura (357 moléculas) com 25 e 50 cópias do ligante. O número de átomos destes sistemas esteve entre 4793 (20 cópias, sem águas) e 6620 (50 cópias, com águas). Foram simulados 200 ps de dinâmica em cada um dos sistemas, sendo que cada simulação demorou em torno de 10 dias em um Athlon 2.0 GHz com 512 Mb de memória RAM. Todas as simulações foram feitas no vácuo e no *ensemble* NVT com o intuito de que a dissipação de energia associada à presença do solvente fosse em parte representada pelo escalonamento de velocidades. A temperatura do sistema foi mantida em 300 K. As equações de movimento foram integradas com o algoritmo Velocity-Verlet [42] com um passo de tempo de 2 fs. As coordenadas foram gravadas a cada 20 fs.

#### 4.2.2 Simulações da dissociação do T3 de seu receptor

A primeira etapa do trabalho foi a expansão dos resultados obtidos para a dissociação do ácido retinóico de seu receptor usando DMAA para os receptores do hormônio tireoideano. Foram feitas simulações para o receptor TR $\alpha$ 1 e TR $\beta$ 1.

#### Estruturas utilizadas

As principais simulações realizadas usando DMAA foram as que utilizaram a estrutura do TR $\alpha$ 1. Esta é uma estrutura cristalográfica refinada a 2,0 Å de resolução que pode ser obtida no *site* do Laboratório de Robert Fletterick [13, 60].

Atomo	Classe	OPLSAA	$\sigma$ / Å	$\epsilon$ / kcal mol <sup>-1</sup>	$q/e$
C1	CT	R2CH2 Alkane	3.5000	0.0660	0.761012
C2	CT	R2CH2 Alkane	3.5000	0.0660	-0.252142
C3	CT	R2CH2 Alkane	3.5000	0.0660	0.063635
C4	CT	R2CH2 Alkane	3.5000	0.0660	-0.212433
C5	CM	RHC=C Alkene	3.5500	0.0760	0.345855
C6	CM	RHC=C Alkene	3.5500	0.0760	-0.582712
C7	CM	RHC=C Alkene	3.5500	0.0760	0.072931
C8	CM	RHC=C Alkene	3.5500	0.0760	-0.316243
C9	CM	RHC=C Alkene	3.5500	0.0760	0.182077
C10	CM	RHC=C Alkene	3.5500	0.0760	-0.358492
C11	CM	RHC=C Alkene	3.5500	0.0760	-0.031462
C12	CM	RHC=C Alkene	3.5500	0.0760	-0.357725
C13	CM	RHC=C Alkene	3.5500	0.0760	0.315006
C14	CM	RHC=C Alkene	3.5500	0.0760	-0.448807
C15	C	COO- Carboxylate	3.7500	0.1050	1.073151
C16	CT	R3CH Alkane	3.5000	0.0660	-0.454682
C17	CT	R3CH Alkane	3.5000	0.0660	-0.495721
C18	CT	R3CH Alkane	3.5000	0.0660	-0.457181
C19	CT	R3CH Alkane	3.5000	0.0660	-0.244555
C20	CT	R3CH Alkane	3.5000	0.0660	-0.434214
O21	O2	COO- Carboxylate	2.9600	0.2100	-0.882477
O22	O2	COO- Carboxylate	2.9600	0.2100	-0.888564
H23	HC	HR Alkane	2.5000	0.0300	0.043709
H24	HC	HR Alkane	2.5000	0.0300	0.034386
H25	HC	HR Alkane	2.5000	0.0300	0.006724
H26	HC	HR Alkane	2.5000	0.0300	-0.005627
H27	HC	HR Alkane	2.5000	0.0300	0.056274
H28	HC	HR Alkane	2.5000	0.0300	0.060015
H29	HC	H-C=C Alkene	2.4200	0.0300	0.096475
H30	HC	H-C=C Alkene	2.4200	0.0300	0.175377
H31	HC	H-C=C Alkene	2.4200	0.0300	0.175016
H32	HC	H-C=C Alkene	2.4200	0.0300	0.153046
H33	HC	H-C=C Alkene	2.4200	0.0300	0.192649
H34	HC	H-C=C Alkene	2.4200	0.0300	0.134712
H35	HC	HR Alkane	2.5000	0.0300	0.108071
H36	HC	HR Alkane	2.5000	0.0300	0.093173
H37	HC	HR Alkane	2.5000	0.0300	0.076242
H38	HC	HR Alkane	2.5000	0.0300	0.083641
H39	HC	HR Alkane	2.5000	0.0300	0.097995
H40	HC	HR Alkane	2.5000	0.0300	0.120270
H41	HC	HR Alkane	2.5000	0.0300	0.119155
H42	HC	HR Alkane	2.5000	0.0300	0.093416
H43	HC	HR Alkane	2.5000	0.0300	0.135528
H44	HC	HR Alkane	2.5000	0.0300	0.082569
H45	HC	HR Alkane	2.5000	0.0300	0.059771
H46	HC	HR Alkane	2.5000	0.0300	0.058868
H47	HC	HR Alkane	2.5000	0.0300	0.210457
H48	HC	HR Alkane	2.5000	0.0300	0.072170
H49	HC	HR Alkane	2.5000	0.0300	0.069656

Tabela 4.1. Potenciais de Lennard-Jones e cargas utilizadas para o ácido retinóico.

As simulações da dissociação do hormônio T3 do receptor TR $\beta$  foram feitas com duas estruturas distintas: a primeira é a estrutura cristalográfica do TR $\beta$  humano refinada a 3,7 Å de resolução (pdb id. 1BSX) [61]. Nesta estrutura diversas cadeias laterais estão faltando, além do  $\Omega$ -loop completo. Estas cadeias e o *loop*

foram modelados com o programa Modeller [52]. Pela comparação da posição relativa do *loop* modelado em relação à sua posição na estrutura do TR $\alpha$ 1 e em vista dos resultados obtidos nos mecanismos de dissociação, mostrou-se necessário fazer simulações com uma nova estrutura. Esta segunda estrutura foi modelada por homologia com estrutura do TR $\alpha$ 1, também com o programa Modeller [52]. Todas as estruturas foram otimizadas até que a média quadrática do gradiente da energia com relação à posição dos átomos fosse menor que  $0.01 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-1}$  [53].

### Potenciais utilizados

Da mesma forma que nas simulações da dissociação do ácido retinóico, todos os átomos foram representados de forma explícita. Foram utilizados potenciais OPLSAA para todos os átomos das proteínas. Os potenciais de Lennard-Jones para os átomos do T3 foram obtidos por analogia dentro do conjunto OPLSAA, a não ser para o átomo de Iodo, cujos parâmetros foram obtidos de [62] porque potenciais OPLSAA para átomos de Iodo não estão definidos.

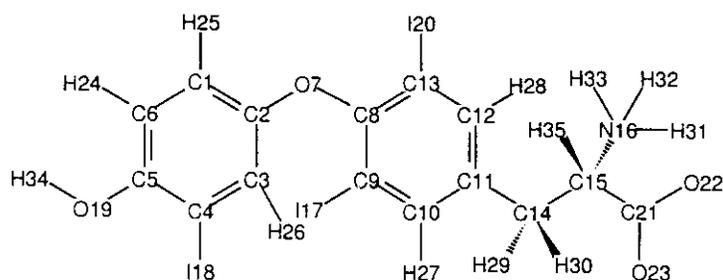


Figura 4.2. 3, 3', 5'-triiodo-L-tironina (T3) e a numeração de seus átomos.

As cargas atômicas foram calculadas usando o programa Gaussian [59], com a base 6-31++G\*\* no nível Hartree-Fock. Foram utilizadas cargas de Mulliken porque não existem parâmetros mais sofisticados para os átomos de Iodo. O conjunto dos parâmetros de Lennard-Jones e cargas utilizados estão listados na Tabela 4.2, sendo a numeração dos átomos correspondente à Figura 4.2.

Ao contrário do que foi feito para o ácido retinóico, a molécula de T3 foi simulada levando-se em consideração a flexibilidade molecular. Os parâmetros de potencial necessários para uma correta representação da flexibilidade de uma mo-

Átomo	Classe OPLSAA	$\sigma/\text{Å}$	$\epsilon/\text{kcal mol}^{-1}$	$q, e$
C1	CA CH Benzene	3.5500	0.0700	-0.287438
C2	CA CH Benzene	3.5500	0.0700	0.509153
C3	CA CH Benzene	3.5500	0.0700	-0.249405
C4	CA CH Benzene	3.5500	0.0700	-0.634328
C5	CA CH Benzene	3.5500	0.0700	0.509126
C6	CA CH Benzene	3.5500	0.0700	-0.272675
O7	OH OH Phenol	3.0700	0.1700	-0.594643
C8	CA CH Benzene	3.5500	0.0700	0.756604
C9	CA CH Benzene	3.5500	0.0700	-0.615843
C10	CA CH Benzene	3.5500	0.0700	-0.253795
C11	CA CH Benzene	3.5500	0.0700	0.243797
C12	CA CH Benzene	3.5500	0.0700	-0.239800
C13	CA CH Benzene	3.5500	0.0700	-0.669133
C14	CT R2CH2 Alkane	3.5000	0.0660	-0.430535
C15	CT R2CHNH2 & ALA CA	3.5000	0.0660	-0.119835
N16	NT NH2 Primary Amine	3.2500	0.1700	-0.767609
I17	I Iodine [62]	4.3000	0.7790	0.258365
I18	I Iodine [62]	4.3000	0.7790	0.248121
O19	OH OH Phenol	3.0700	0.1700	-0.608342
I20	I Iodine [62]	4.3000	0.7790	0.265525
C21	C COO- Carboxylate	3.7500	0.1050	0.413574
O22	O2 COO- Carboxylate	2.9600	0.2100	-0.538192
O23	O2 COO- Carboxylate	2.9600	0.2100	-0.584600
H24	HA H Benzene	2.4200	0.0300	0.239682
H25	HA H Benzene	2.4200	0.0300	0.246668
H26	HA H Benzene	2.4200	0.0300	0.263595
H27	HA H Benzene	2.4200	0.0300	0.245844
H28	HA H Benzene	2.4200	0.0300	0.233781
H29	HC HR Alkane	2.5000	0.0300	0.254187
H30	HC HR Alkane	2.5000	0.0300	0.218603
H31	H3 RNH3+ Ammonium	0.0000	0.0000	0.469746
H32	H3 RNH3+ Ammonium	0.0000	0.0000	0.431435
H33	H3 RNH3+ Ammonium	0.0000	0.0000	0.430197
H34	HO HO Phenol	0.0000	0.0000	0.418807
H35	HC HR Alkane	2.5000	0.0300	0.209364

Tabela 4.2. Potenciais de Lennard-Jones e cargas utilizadas para o T3.

lécua são os parâmetros de estiramento das ligações e de torções de ângulos e ângulos de diédro (ver Equações 3.1 e 3.3). Todos os parâmetros foram obtidos de acordo com os grupos OPLSAA definidos por analogia de acordo com a Tabela 4.2, com as exceções que serão discutidas. A constante de força do estiramento das ligações entre as classes CA (carbono aromático) e I (Iodo) foram escolhidas por analogia com a constante das ligações S-S do conjunto OPLSAA, que possuem uma distância de equilíbrio muito semelhante: 2,038 Å para a ligação S-S e 2,050 Å para as ligações CA-I (a distância de equilíbrio para as ligações CA-I foi obtida da geometria otimizada da qual se obtiveram as cargas). A constante de força para a torção do ângulo CA-CA-I foi obtida por analogia com a torção do ângulo CA-CA-HA do conjunto OPLSAA. Os potenciais de torção dos ângulos estão listados

Classe 1	Classe 2	$k / \text{kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$	$r_{eq} / \text{ \AA}$
CA	CA	469.0	1.4000
CA	HA	367.0	1.0800
CA	OH	450.0	1.3640
CA	I	166.0	2.0500
CA	CT	317.0	1.5100
CT	CT	268.0	1.5290
CT	HC	340.0	1.0900
CT	NT	367.0	1.4710
CT	C	317.0	1.5220
C	O2	656.0	1.2500
TN	H3	434.0	1.0100
OH	HO	553.0	0.9450

Tabela 4.3. Potenciais harmônicos para as ligações covalentes do T3

Classe 1	Classe 2	Classe 3	$k / \text{kcal mol}^{-1} \text{ rad}^{-2}$	$\theta_{eq} / ^\circ$
CA	CA	CA	63.00	120.00
CA	CA	HA	35.00	120.00
CA	CA	OH	70.00	120.00
CA	CA	I	35.00	120.00
CT	CA	CA	70.00	120.00
CT	CT	CA	63.00	114.00
HC	CT	CA	33.00	107.80
CT	CT	HC	37.50	110.70
HC	CT	HC	33.00	107.80
CT	CT	NT	80.00	111.20
CT	CT	C	63.00	111.10
C	CT	NT	80.00	111.20
HC	CT	NT	35.00	109.50
HC	CT	C	35.00	109.50
CT	NT	H3	35.00	109.50
H3	NT	H3	35.00	109.50
CA	OH	HO	35.00	113.00
CT	C	O2	70.00	117.00
O2	C	O2	80.00	126.00
CA	OH	CA	100.00	123.13

Tabela 4.4. Potenciais usados para as torções de ângulos do T3

na Tabela 4.4.

O oxigênio do éter conjugado (formado pelo átomo O7 na Figura 4.2) foi parametrizado por analogia com o oxigênio fenólico do conjunto OPLSAA, já que ambos estão parcialmente conjugados com os anéis aromáticos. Esta analogia foi feita com segurança já que os parâmetros para éteres não conjugados são também bastante semelhantes. As torções de ângulos de diédro para os ângulos contendo átomos de Iodo foram escolhidas como iguais às torções dos diversos outros grupos ligados a anéis aromáticos, que possuem potenciais de torção idênticos dentro do grupo OPLSAA, como mostra a Tabela 4.5; estes parâmetros não são muito dependentes do grupo funcional. Por fim, o ângulo de diédro de equilíbrio para

Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4	Periodicidade 1		Periodicidade 2		Periodicidade 3	
				Amplitude	Fase	Amplitude	Fase	Amplitude	Fase
CA	CA	CA	CA			7.250	180.0		
CA	CA	CA	HA			7.250	180.0		
HA	CA	CA	OH			7.250	180.0		
CA	CA	CA	OH			7.250	180.0		
CA	CA	CA	I			7.250	180.0		
HA	CA	CA	I			7.250	180.0		
I	CA	CA	OH			7.250	180.0		
OH	CA	CA	I			7.250	180.0		
CT	CA	CA	CA			7.250	180.0		
CT	CA	CA	HA			7.250	180.0		
CT	CT	CA	CA						
CA	CA	CT	HC						
CA	CT	CT	NT	0.845	0.0	-0.962	180.0	0.713	0.0
CA	CT	CT	C	-1.697	0.0	-0.456	180.0	0.585	0.0
HC	CT	NT	CT					0.366	0.0
HC	CT	CT	C					-0.225	0.0
HC	CT	CT	HC					0.318	0.0
CT	CT	NT	H3					0.347	0.0
C	CT	NT	H3					0.347	0.0
HC	CT	NT	H3					0.261	0.0
CT	CT	C	O2			0.820	180.0		
NT	CT	C	O2						
HC	CT	C	O2						
HA	CA	CA	HA			7.250	180.0		
CA	CA	OH	HO			1.682	180.0		
CA	CT	CT	HC					0.462	0.0
HC	CT	CT	NT					0.384	0.0
CA	CA	OH	CA			7.250	23.6		

Amplitude em 2,0 kcal mol<sup>-1</sup>; fase em graus.

Tabela 4.5. Potenciais usados para as torções de ângulos de diédrio do T3

o diédrio formado por três carbonos aromáticos e o oxigênio do éter (O7) foi obtido da estrutura otimizada e a sua constante de força e multiplicidade também foram definidos por analogia com as torções dos diversos grupos associados a anéis aromáticos no conjunto OPLSAA.

### Condições das simulações

As simulações da dissociação do hormônio tireoideano T3 de seus receptores foram feitas com o menor número de cópias com os quais foi possível observar a dissociação dos hormônios dentro do tempo de simulação compatível com nossa capacidade computacional, isto é, entre 150 e 200 ps. Desta forma, simulações da dissociação do T3 do receptor TR $\alpha$ 1 foram feitas com um número de cópias variando de 10 a 25. As simulações de dissociação do ligante do receptor TR $\beta$  foram feitas com 10, 20 e 50 cópias para as simulações partindo da estrutura cristalográfica de baixa

resolução. Simulações com um número de cópias entre 10 e 20 foram feitas a partir da estrutura do TR $\beta$  modelada por analogia com a estrutura do TR $\alpha$ 1. O número de átomos nestas simulações variou entre 4419 (TR $\alpha$ 1 com 10 cópias do T3) e 5739 (TR $\beta$  com 50 cópias do ligante). Nenhuma molécula de água foi considerada nos cálculos. As simulações foram feitas em um Athlon 2.0 GHz com 512 Mb de memória RAM e tomaram entre 7 e 15 dias cada uma. As simulações foram feitas no *ensemble* NVT para que o escalonamento da temperatura aproximadamente representasse a dissipação da energia associada à presença do solvente. Foi utilizado o algoritmo de integração Velocity-Verlet [42] em praticamente todas as simulações com um passo de tempo de 2 fs. Algumas simulações foram feitas com passos de 1 fs e outras com o algoritmo Beeman [63], mas não houve nenhuma diferença significativa nos resultados em ambos os casos. As simulações foram feitas a 300 K e as coordenadas foram gravadas a cada 20 fs.

### 4.3 Dinâmica Molecular com Caminho Induzido

As simulações DMCI requerem alguns cuidados maiores na escolha das condições das simulações devido a que não são feitas aproximações nos potenciais de interação, como é o caso das simulações com DMAA. Os parâmetros fundamentais nestas simulações são a constante de força e, em especial, a velocidade da força utilizada, porque dela depende o tempo que o ambiente (a proteína) tem para se adaptar às novas conformações e posições do ligante no sítio ativo. Os potenciais utilizados foram os mesmos que nas simulações usando DMAA. A técnica DMCI foi implementada no programa Tinker de acordo com sua descrição no artigo sobre a dissociação do ácido retinóico de seu receptor [41]. Para sua utilização, é necessário fornecer o sítio no qual a força deve ser aplicada, o vetor velocidade desta força, a posição inicial do sítio puxado e o tempo no início da simulação (em geral  $t = 0$ ), de acordo com a metodologia descrita na Seção 3.2. A implementação da técnica foi feita de tal forma que, a cada intervalo de tempo definido pelo usuário, o tempo de simulação, a força aplicada e o deslocamento do sítio em relação a sua posição inicial fossem gravados, para que o perfil da força em função do tempo de simulação, ou em função do deslocamento do sítio ao qual é aplicada, pudessem ser analisados.

### Estruturas e configurações iniciais

As simulações com DMCI foram feitas apenas para a dissociação do T3 de seu receptor  $TR\alpha 1$ , para o qual uma boa estrutura cristalográfica está disponível [13, 60]. Apenas muito recentemente o grupo do Prof. Igor Polikarpov resolveu as estruturas dos LBDs dos receptores  $TR\alpha 1$  e  $TR\beta$  humanos com resoluções de 1,8 Å e 2,2 Å respectivamente, com que poderão ser feitas simulações representativas também para o receptor  $TR\beta$ . Como os potenciais nestas simulações não são aproximados, é necessário que o ambiente no qual a proteína está seja melhor representado. Para isso, foram construídas caixas de simulação contendo a proteína e água nas densidades adequadas com o programa *Packmol* [64]. No entanto, estas caixas possuem cerca de 30.000 átomos, o que não podemos simular por tempos razoáveis com nossa atual capacidade computacional. Desta forma, escolheu-se fazer uma simulação na qual a proteína estaria imersa em uma “gota” de moléculas de água. Para isso, foram removidas as moléculas de água que não possuíam nenhum átomo mais próximo da proteína que 6 Å. As simulações de Schulten e colaboradores usaram o mesmo procedimento, a não ser pelo fato de que devido à maior capacidade computacional disponível, o raio de corte foi 15 Å [41]. A espessura da camada de solvatação é importante especialmente no final dos mecanismos de dissociação, quando o hormônio interage diretamente com as moléculas de água. O efeito destas aproximações será discutido com os resultados. As caixas de simulação ficaram então com 8247 átomos, sendo 4069 átomos pertencentes à proteína, 35 átomos do T3 e 4143 átomos pertencentes às 1381 moléculas de água restantes. A partir da estrutura gerada com *Packmol* com moléculas de água removidas foram simulados 100 ps com termalização a cada 1 ps a uma temperatura de 298 K sem a aplicação de nenhuma força. Desta forma, obteve-se um sistema termicamente equilibrado a partir do qual as simulações usando DMCI foram feitas. Esta simulação foi realizada com o algoritmo Velocity-Verlet com um passo de tempo de 2 fs.

### Parametrização da força aplicada

A força aplicada nas simulações com DMCI deve ser a menor e mais lenta possível para que a perturbação externa não produza efeitos fisicamente espúrios. No entanto, a dissociação deve ocorrer em escalas de tempo de simulação compatíveis

com a capacidade computacional disponível e, quanto maior a força, mais rápida a dissociação. Não existe outra forma de escolher a velocidade da força que não seja fazendo algumas tentativas. Por esta razão dois conjuntos de simulações foram feitos, sendo que o primeiro deles permitiu uma escolha mais adequada dos parâmetros para a realização de um segundo conjunto de simulações com um força mais suave.

Uma constante força  $k = 4 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$  foi utilizada em ambos os conjuntos de simulações por ser suficientemente pequena para permitir flutuações da força aplicada e, ao mesmo tempo, que as flutuações da força sejam suficientemente significativas para variações de 1 ou 2  $\text{\AA}$  na posição do sítio puxado [65, 66]. Esta constante de força foi também utilizada nas simulações da dissociação do ácido retinóico de seu receptor [41].

O parâmetro mais importante para estas simulações é, no entanto, a velocidade da força. Quanto menor a velocidade, mais tempo tem o ambiente (no caso a proteína) para relaxar e estabilizar as novas posições do ligante, diminuindo a resistência do meio ao seu movimento. Desta forma, quanto menor for a velocidade da força utilizada, menor deve ser a força exercida, ao menos enquanto a movimentação do ligante for muito mais rápida que a relaxação da proteína ao seu redor. O primeiro conjunto de simulações utilizou uma força com velocidade de módulo  $|\vec{v}| = 0.4 \text{ \AA ps}^{-1}$ . Com esta velocidade, a dissociação total do hormônio ocorreu em aproximadamente 100 ps de simulação para os três mecanismos, que representaram simulações de 10 a 15 dias. De acordo com nossa disponibilidade de tempo e capacidade computacional, decidiu-se que simulações que durassem de 20 a 30 dias ainda eram viáveis, de forma que a velocidade da força foi reduzida pela metade, passando a ser, no segundo conjunto de simulações  $|\vec{v}| = 0.2 \text{ \AA ps}^{-1}$ . Como era esperado, a dissociação total do ligante ocorreu no dobro do tempo, ou seja, pouco antes dos 200 ps de simulação.

### Restrições nas posições

Uma dificuldade que surge na utilização desta técnica provém de que a aplicação da força pode induzir um momento angular no sistema. Se a proteína é suficientemente grande e a resistência à dissociação do hormônio é pequena, este momento

angular induzido não é relevante. No entanto, uma simulação da dissociação do T3 ao longo do Caminho I mostrou que o momento angular gerado não é insignificante neste caso, tendo a dissociação ocorrido em uma direção indesejada devido à rotação da proteína. Para evitar este tipo de problema, foram introduzidas restrições ao movimento de vários átomos da proteína que estavam distantes da região de dissociação. Este mesmo procedimento foi adotado nas simulações Schulten e colaboradores [41].

Não é necessário que as restrições sejam muito fortes nem que muitos átomos sejam presos, já que a inibição da movimentação de alguns poucos átomos é suficiente para inibir a rotação da proteína. Para cada um dos caminhos um conjunto de átomos distantes da região da dissociação foi escolhido e a cada um destes átomos foi adicionada uma restrição harmônica em sua posição da forma

$$V(t) = k_{res}[x(t) - x_0 - x_{tol}]^2$$

para  $x - x_0$  maior que um deslocamento tolerado  $x_{tol}$  e  $V = 0$  para distâncias menores que o deslocamento tolerado. Aqui,  $x(t)$  e  $x_0$  são as posições do sítio nos instantes  $t$  e  $0$  e  $k_{res}$  é uma constante de força. Em todas as restrições foi permitida uma movimentação livre dos átomos de raio  $x_{tol} = 1,0 \text{ \AA}$  e a constante de força utilizada foi  $k_{res} = 100,0 \text{ kcal \AA}^{-2}$ . Os átomos aos quais as restrições foram aplicadas estão representados nas Figuras 4.3 (a), (b) e (c) para um estágio intermediário da dissociação ao longo de cada um dos três caminhos.



Figura 4.3. Átomos a cujas posições foram aplicadas restrições, representados como esferas. (a) Caminho I, (b) Caminho II, (c) Caminho III.

### **Direção e sítios nos quais a força foi aplicada**

A força foi aplicada nas simulações que pretendiam representar os caminhos I e II da dissociação (ver Figura 5.4) no oxigênio fenólico (O19 na Figura 4.2). O Caminho III, no qual a direção da dissociação é oposta, escolheu-se o carbono carboxílico (C21) para a aplicação da força. A força foi aplicada em uma direção associada à formação das primeiras cavidades observadas nas simulações com DMAA representadas na Figura 5.5, sendo o vetor escolhido de acordo com a posição inicial do sítio e a posição de algum sítio da proteína próximo ao centro da cavidade. Quais exatamente são esses vetores não é relevante, uma vez que dependem da orientação da proteína.

### **Condições das simulações**

As simulações usando DMCI partiram todas da mesma condição inicial termalizada a 298 K, como foi descrito. Todas as simulações foram feitas utilizando o algoritmo de integração Velocity-Verlet com um passo de tempo de 2 fs. As simulações foram feitas no *ensemble* NVE. As coordenadas foram gravadas a cada 100 fs. No primeiro conjunto de simulações, com a maior velocidade da força, as simulações foram feitas por 100 ps, tempo no qual a dissociação total do hormônio foi observada. Nas simulações com menor velocidade, foram obtidos 200 ps de simulação que também garantiu a dissociação total do hormônio. Todas as simulações foram feitas em um Athlon 2.0 GHz com 512 Mb de memória RAM e demoraram entre 20 e 30 dias cada uma.

## Capítulo 5

# Estudo da Dissociação do ligante T3 usando DMAA

Neste capítulo apresentaremos os primeiros resultados da utilização técnica DMAA para o estudo da dissociação do hormônio tireoideano de seu receptor. O capítulo se inicia com a apresentação dos testes que confirmam uma correta implementação da técnica e o efeito de águas estruturais sobre a dinâmica. Em seguida, descrevem-se os caminhos de dissociação encontrados para o ligante T3 dos LBDs dos receptores  $TR\alpha 1$  e  $TR\beta 1$  e as diversas correlações com resultados experimentais e implicações funcionais destes mecanismos.

### 5.1 Testes preliminares

Para testar a implementação do método DMAA no pacote Tinker e os potenciais escolhidos, foram feitas simulações da dissociação do ácido retinóico de seu receptor  $RAR\gamma$ . Foram feitas também simulações usando as águas presentes na estrutura cristalográfica para discernir sua importância na dinâmica dos receptores usando esta técnica de simulação.

#### 5.1.1 Reprodução do resultados de Blondel e Karplus

Para reproduzir os resultados de Blondel e Karplus foram feitas simulações com 20 e 25 cópias do ácido retinóico, já que as simulações com 20 cópias apresentadas em seu trabalho foram as simulações com o menor número de cópias em que foi possível observar a dissociação dos ligantes [40]. Os resultados obtidos nestas simulações estão apresentados na Figura 5.1 para a simulação com 20 cópias. Os

tempos de simulação de cada foto são os mesmos que foram apresentados por Blondel e Karplus e a semelhança dos mecanismos encontrados por eles e por nós neste trabalho pode ser verificada inclusive na escala de tempo da dissociação pela comparação da Figura 5.1 com a Figura 1 de [40]. O mecanismo envolve a separação das hélices 12 (em laranja na figura) e 3 (em primeiro plano), como já foi discutido. É importante lembrar que estas simulações diferem das apresentadas em [40] pelo uso de potenciais OPLSAA para representar a proteína e o ligante, em lugar de potenciais CHARMM [45].

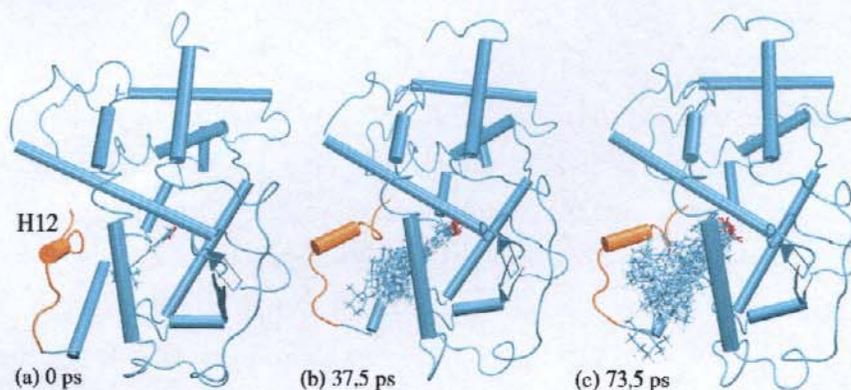


Figura 5.1. Mecanismo de dissociação do ácido retinóico de seu receptor estudado com DMAA.

### 5.1.2 Efeito das águas estruturais sobre a dinâmica

Como as simulações feitas por Blondel e Karplus não utilizaram nenhuma molécula de água, foram feitas simulações da dissociação do ácido retinóico do LBD do mesmo receptor RAR $\gamma$  levando as águas da estrutura cristalográfica em consideração, para verificar qual a influência de sua presença na dinâmica usando DMAA. Como foi discutido, foram feitas simulações 25 e 50 cópias do ligante na presença de moléculas de água. Em princípio, quanto maior o número de ligantes, menor deve ser o tempo de dissociação, uma vez que as barreiras de potencial são reduzidas de com aumento do número de réplicas.

No entanto, com a presença das moléculas de água, novos contatos hidrofílicos surgiram nas simulações da dissociação do ácido retinóico. As moléculas de água

formaram redes de ligações de hidrogênio que estabilizaram a conformação fechada da hélice 12, como mostra a Figura 5.2. Nesta figura, os aminoácidos no topo (Prolina e Leucina) pertencem à hélice 12, enquanto que o aminoácido abaixo (Serina) pertence à hélice 3. Estas são as duas hélices que se separam no mecanismo descrito em [40]. A Figura 5.2 mostra o exemplo com 25 cópias do ácido retinóico em que não foi observada dissociação dos ligantes nem mesmo em 190 ps de simulação.

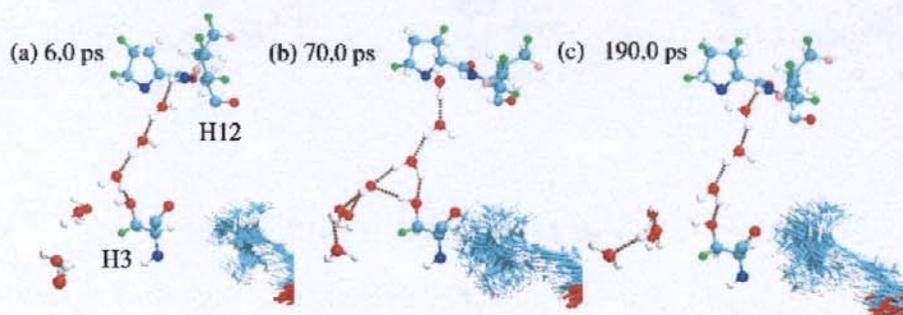


Figura 5.2. Estabilização da estrutura pela formação de redes de ligações de hidrogênio.

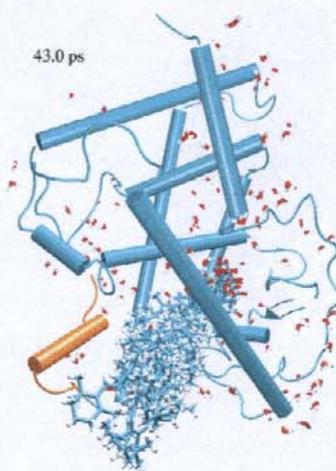


Figura 5.3. A simulação com 50 cópias do ácido retinóico e água mostrou o mesmo mecanismo de dissociação que as simulações anteriores.

Por outro lado, na simulação com 50 cópias do ligante, na presença de moléculas de água, foi observado o mesmo mecanismo, com a abertura da hélice 12,

como mostra a Figura 5.3. Estas simulações indicam, portanto, que apesar das águas exercerem um papel estabilizador da estrutura, alterando a escala de tempo da dissociação, pelo menos nestes casos os mecanismos observados não são qualitativamente modificados.

## 5.2 Caminhos de dissociação para o receptor TR $\alpha$

Diversas simulações com um número de cópias do ligante variando de 10 a 25 foram realizadas. A Tabela 5.1 resume os resultados. Três possíveis caminhos de dissociação foram identificados.

### 5.2.1 Dissociação ao longo do Caminho I

O Caminho I foi reconhecido como um dos caminhos de dissociação possíveis para o ácido retinóico de seu receptor RAR $\gamma$  por Karplus e colaboradores [40] e pode ser deduzido da comparação das estruturas dos receptores do ácido retinóico dissociado e associado ao seu ligante. Consiste no deslocamento da hélice 12 e do *loop* entre as hélices 11 e 12 afastando-se da hélice 3, como mostra a Figura 5.4 (a). A hélice 12 sofre uma desnaturação significativa, mas de certa forma que o resíduo Phe 405 mantém sua orientação em direção à cavidade do ligante. Isto é uma reminiscência do fato de que este resíduo está em contato direto com o ligante na estrutura cristalina [19]. Ao mesmo tempo, a hélice 3 se rompe em duas hélices, separadas pelos aminoácidos Thr 223 e Pro 224. A desnaturação da hélice 12, formada pelos aminoácidos Leu 400 a Phe 405 é seguida pelo afastamento do *loop* entre as hélices 11 e 12 (resíduos Thr 394 a Pro 399) da parte baixa da hélice 3 (resíduos Ala 214 a Thr 223), que por sua vez preserva sua estrutura ao longo de toda a simulação. As cópias do hormônio finalmente passam entre a cavidade formada pelo *loop* entre H11 e H12 e a parte baixa da hélice 3, deixando o sítio de ligação. Esta descrição é válida para as três simulações nas quais o Caminho I foi observado.

A formação da cavidade que permite o escape dos ligantes no início das simulações está mostrada na Figura 5.5 (a). As superfícies foram construídas de acordo com o protocolo descrito em [67] com um raio de prova de 1.4 Å que é o valor padrão no programa de visualização de trajetórias moleculares VMD [68]. A formação desta cavidade envolve a quebra das interações hidrofóbicas entre as cadeias

Número de cópias	Caminho encontrado
10	-*
12	-*
13	II
14	III
15	I
16	I
17	I
18	II
19	-*
20	III
25	III

\*Não foi observada dissociação no tempo de simulação

Tabela 5.1. Caminhos encontrados em cada uma das simulações com DMAA.

laterais dos aminoácidos Thr 223 e Leu 400 e entre Thr 219, Pro 398 e Leu 396. Na presença de água estes contatos devem se estabilizar, uma vez que ambientes aquosos favorecem a agregação de cadeias laterais apolares.

### 5.2.2 Dissociação ao longo do Caminho II

Os principais aspectos do Caminho II incluem a separação das hélices 8 e 11 e o deslocamento do  $\Omega$ -loop, como mostra a Figura 5.4 (b). A abertura da cavidade de escape ocorre pela desnaturação local da hélice 11 entre os resíduos Gly 378 e Ala 379. A hélice 8 é conservada, mas muda sua inclinação com relação à hélice 11 de forma que os aminoácidos Val 294 a Ala 308 se afastam da hélice 11. Esta mudança no posicionamento relativo da hélice 8 é acompanhada pela retração do  $\Omega$ -loop. A principal interação entre a hélice 8 e o  $\Omega$ -loop na estrutura cristalográfica é uma ponte de hidrogênio entre a cadeia lateral do resíduo Asp 208 e o grupo amino do resíduo Val 294. Observa-se que esta interação se conserva ao longo de toda a simulação e resulta no deslocamento conjunto da hélice 8 e do  $\Omega$ -loop. As interações da hélice 11 com o loop são afetadas: a fraca interação hidrofóbica entre os resíduos Pro 205 e Val 390 e a interação dipolar entre os resíduos Pro 205 e Glu 391 são substituídas pela formação de uma ponte de hidrogênio entre o resíduo Glu 391 e o grupo amino do resíduo Met 204, como mostra a Figura 5.6 (a). Isto leva o  $\Omega$ -loop

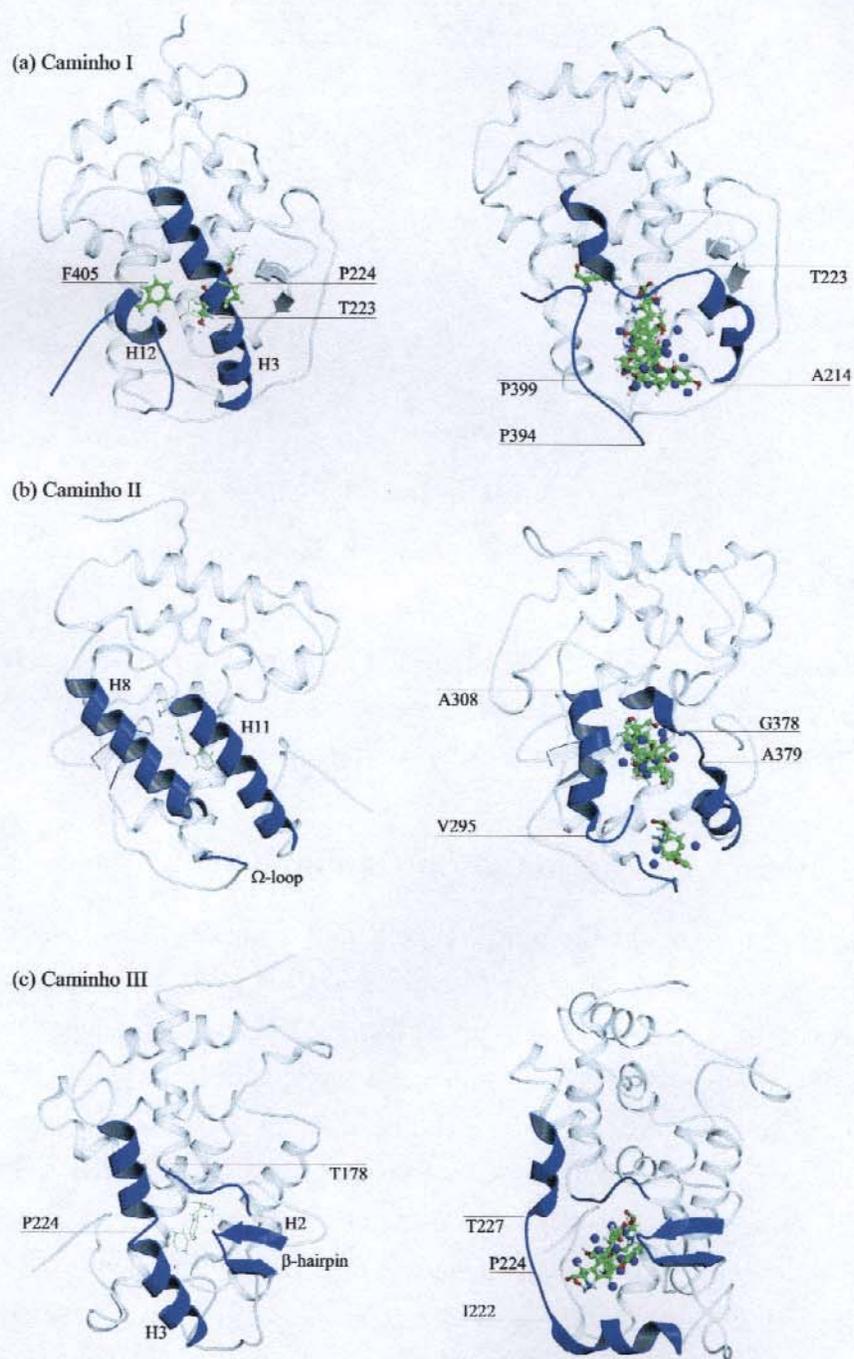


Figura 5.4. Imagem geral dos caminhos de dissociação do T3 ao longo das trajetórias obtidas por DMAA.

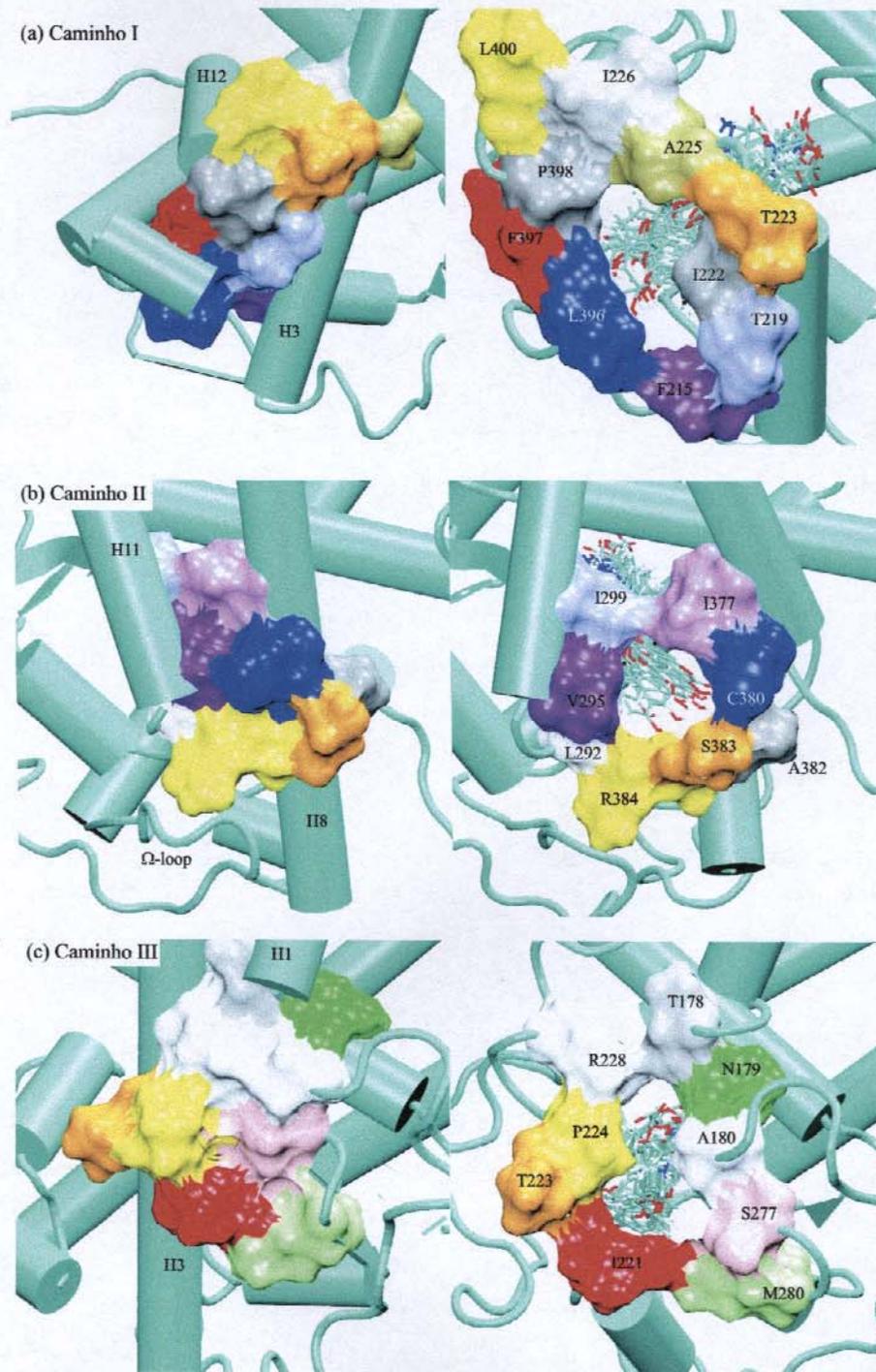


Figura 5.5. Formação das primeiras cavidades nos mecanismos de dissociação de acordo com as simulações usando DMAA.

para trás permitindo a formação da cavidade entre as hélices 8 e 11 que finalmente leva à dissociação dos ligantes.

A análise das cavidades no início das simulações, mostrada na Figura 5.5 (b) mostra que o principal contato rompido é a interação hidrofóbica envolvendo os aminoácidos Val 295, Ile 377 e Cys 380. Também pode ser observado que os resíduos Arg 384, Ser 383 e Ile 299 tem papéis importantes na formação desta cavidade. As principais interações entre aminoácidos envolvidas são, como no Caminho I, hidrofóbicas, de forma que devem ser estabilizadas em solução aquosa.

Este mecanismo não tinha sido previsto anteriormente nem pela análise das estruturas cristalográficas, nem pelos estudos da dissociação do ácido retinóico por simulação computacional. No entanto, o posicionamento do ligante entre as hélices 8 e 11, com uma retração significativa do  $\Omega$ -loop foi descrito como um estágio final da dissociação do ácido retinóico por Karplus e colaboradores [40]. A metodologia utilizada nesse estudo não reconhece caminhos efetivos, mas estados de transição [69]. Sugeriu-se que este estado de transição estaria associado a um caminho de dissociação semelhante ao Caminho I aqui encontrado.

O Caminho II pode ser particularmente importante porque o desenho de antagonistas pelo método da extensão tem se mostrado eficaz quando grupos hidrofóbicos grandes são adicionados à posição 5' do ligante T3 (ver Figura 2.1) [30]. A visão atualmente aceita é que esta extensão induz um enovelamento incorreto da hélice 12 por interagir com o loop entre as hélices 11 e 12. As mudanças conformacionais induzidas por ligantes com essas características em receptores de Estrógeno suportam esta hipótese [32, 33]. As mudanças estruturais induzidas por antagonistas frequentemente afetam as hélices 11 e 12 distorcendo seus contatos com o  $\Omega$ -loop. Isto compromete a estabilidade da região envolvida neste mecanismo de dissociação. Além disso, a associação de ligantes por um mecanismo semelhante ao Caminho II, mas em sentido inverso, deve implicar que estes grupos volumosos na posição 5' só interajam com a proteína nos estágios finais da ligação, como está ilustrado na Figura 5.6 (b). Este mecanismo, portanto, poderia explicar a grande afinidade de ligantes com grupos muito grandes na posição 5', como, por exemplo, análogos do ligante GC-1 com extensões 5'-feniltienil [12]. Vários destes ligantes possuem, inclusive, significativo caráter agonista.

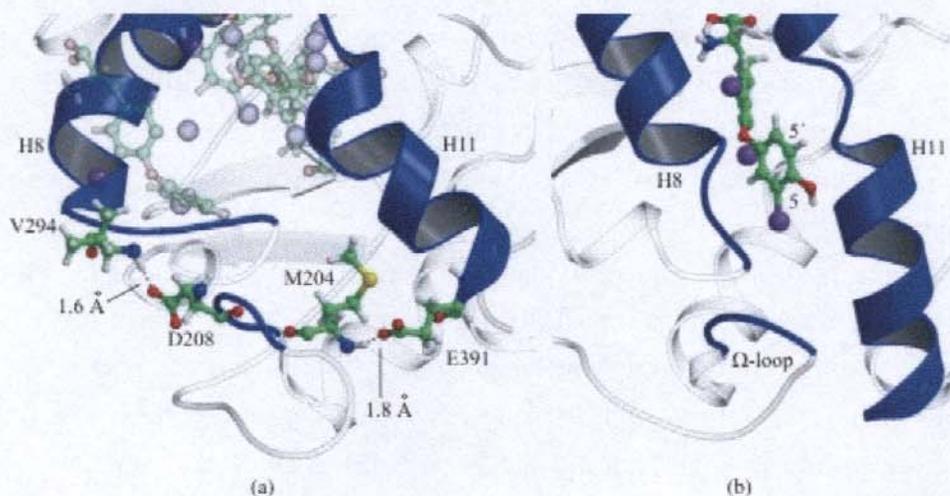


Figura 5.6. (a) Movimentação do  $\Omega$ -loop no Caminho II. (b) Posição relativa do sítio 5' em relação à proteína neste caminho.

### 5.2.3 Dissociação ao longo do Caminho III

O último caminho encontrado envolve uma região da proteína diferente dos dois caminhos anteriores. Este mecanismo já tinha sido sugerido para a entrada do hormônio tireoideano pela análise da superfície da proteína [19] e para a dissociação do ácido retinóico de seu receptor RAR $\gamma$  no estudo computacional de Schulten e colaboradores [41]. Nas simulações de Karplus e colaboradores [40], este mecanismo não foi observado a não ser pelo escape parcial de uma das cópias do ligante em uma simulação com 50 cópias do ligante ácido retinóico. Pela análise do fator de temperatura, esta região foi reconhecida como uma das mais flexíveis do LBD [19]. O Caminho III está ilustrado na Figura 5.4 (c). As cópias do ligante T3 saem do receptor por uma abertura formada entre as hélices 3, o grampo- $\beta$  e o *loop* entre as hélices 1 e 2. Os resíduos Thr 178 a Gly 182, pertencentes ao *loop* entre as hélices 1 e 2, Lys 220 a Val 229, pertencentes às hélices 2 e 3, e os resíduos Thr 275 a Met 280 no grampo- $\beta$  estão diretamente envolvidos no processo. É importante notar que os aminoácidos I221, I222, A225, R228 e L276, que formam contatos diretos com o hormônio na estrutura cristalográfica, também participam deste mecanismo. A dinâmica deste caminho se inicia pela ruptura da hélice 3 em 2 hélices, que conservam sua estrutura entre os resíduos Leu 212 e Pro 224

e entre Ile 226 e Lys 234. A segunda parte da hélice 3 se afasta do grampo- $\beta$ . Este grampo e o *loop* entre as hélices 1 e 2 passam por rearranjos internos menos evidentes e são também deslocados de suas posições iniciais para longe da hélice 3. Estes movimentos conjuntos levam à formação da cavidade pela qual os ligantes escapam.

A formação da cavidade no início da simulação está mostrada na Figura 5.5 (c). O aspecto mais importante deste processo é que, ao contrário das cavidades formadas nos caminhos I e II, envolve cadeias laterais hidrofílicas, cuja agregação deve ser pouco estável em solução aquosa. Simulações com o RAR $\gamma$  [41] mostraram que é de fato possível que moléculas de água entrem através desta cavidade, chegando a interagir diretamente com o grupo carboxílico do ácido retinóico. A abertura da cavidade por um processo semelhante é também possível com o T3, já que a estabilização desta região se deve à formação de uma série de pontes de hidrogênio entre o hormônio e diversos resíduos hidrofílicos [13]. O contato mais importante que se rompe é a interação hidrofílica entre a Arg 228 e a cadeia lateral da Ser 227. Este contato mostrou-se particularmente importante para a estabilização da cavidade do ligante, e a entrada de água já foi observada nas estruturas cristalográficas do LBD do TR $\beta$  associado ao T3 [19].

### 5.3 Caminhos de dissociação para o receptor TR $\beta$

O primeiro conjunto de simulações realizado para a dissociação do hormônio T3 do receptor TR $\beta$  foi feito a partir da estrutura cristalográfica determinada a 3,7 Å de resolução (pdb id. 1BSX) e que teve o  $\Omega$ -*loop* modelado. Além do *loop*, formado pelos resíduos I255 a G262, também foi necessário modelar a região N-terminal do LBD, formada pelos resíduos E202 a H210 (ver Figura 2.2). A qualidade inferior da estrutura e a necessidade de que grandes partes da proteína fossem modeladas tornam estas simulações menos confiáveis. Por esta razão foi construído um modelo da estrutura do TR $\beta$  a partir da estrutura do TR $\alpha$ 1. No entanto, como ambas as estruturas são ainda menos representativas dos sistemas reais, os resultados são discutidos brevemente.

Todas as simulações realizadas com a estrutura cristalográfica apresentaram o mesmo mecanismo de dissociação. Este mecanismo, mostrado na Figura 5.7

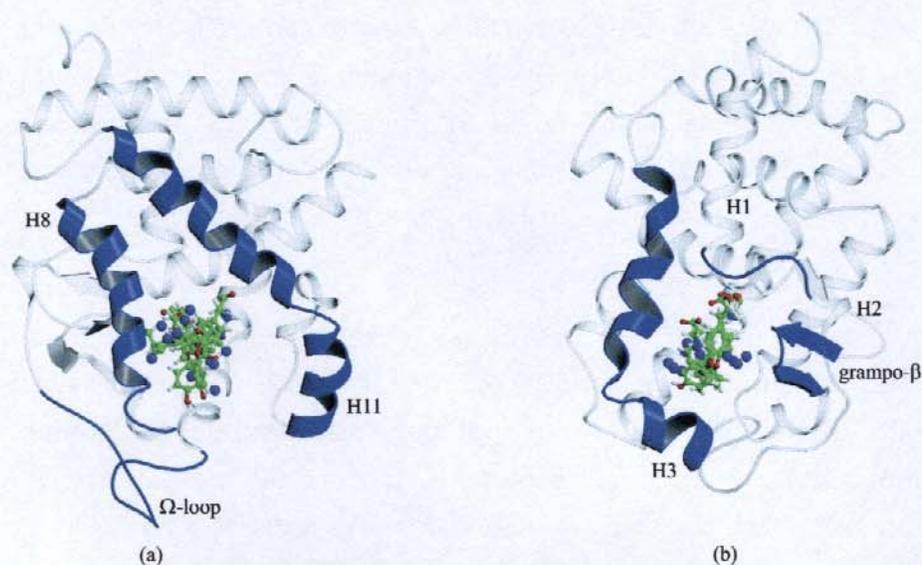


Figura 5.7. Visão global dos caminhos encontrados para a dissociação do T3 do LBD do receptor TR $\beta$ . (a) Caminho similar ao Caminho II. (b) Caminho similar ao Caminho III. A maior parte das cópias do ligante foi omitida.

(a) é semelhante ao Caminho II encontrado para a dissociação do T3 do TR $\alpha$ 1 (ver também a Figura 5.4 (b)). Este mecanismo envolve a separação das hélices 8 e 11, e o ligante escapa entre estas hélices e o  $\Omega$ -loop. O  $\Omega$ -loop modelado nesta estrutura está separado das hélices 8 e 11 adotando uma conformação menos compacta quando comparada com a estrutura do TR $\alpha$ 1. O papel importante dos contatos entre este loop e as hélices 8 e 11 não pode ser negligenciado e, portanto, o mecanismo encontrado de forma determinística nestas simulações pode ser um resultado da menor estabilidade desta região do LBD.

Por outro lado, todas as simulações realizadas com o modelo do TR $\beta$ 1 obtido por homologia com a estrutura do TR $\alpha$ 1 revelaram outro mecanismo, semelhante ao Caminho III encontrado para a dissociação do T3 do TR $\alpha$ 1. Este mecanismo envolve a separação do grampo- $\beta$ , da hélice 3 e do loop entre as hélices 1 e 2, como mostra a Figura 5.7 (b). A formação da abertura ocorre com uma desnaturação parcial da hélice 3 entre os aminoácidos Ile 276 e Ile 280. A hélice preservada entre os resíduos Leu 266 e Ile 275 se separa do grampo- $\beta$  formando a cavidade por onde os ligantes escaparam.

Apesar de que estas simulações não são muito confiáveis devido à baixa qualidade das estruturas utilizadas, elas indicam que, de forma geral, a dinâmica desta isoforma deve ser semelhante à do TR $\alpha$ 1 e que os mesmos mecanismos de dissociação devem prevalecer. As especificidades de cada tipo não podem ser deduzidas destas simulações.

## 5.4 Conclusões

As simulações com DMAA foram capazes de sugerir três mecanismos de dissociação do T3 do LBD do receptor TR $\alpha$ 1, sendo que dois deles também foram observados nas simulações com o LBD do receptor TR $\beta$ 1. Estas são as primeiras evidências de que mecanismos semelhantes aos observados para a dissociação do ácido retinóico de seu receptor podem estar envolvidos na dissociação dos hormônios tireoideanos dos TRs obtidas por simulações de dinâmica molecular.

O Caminho I coincide com o mecanismo sugerido a partir das estruturas associada e dissociada dos ligantes dos receptores do ácido retinóico. O Caminho II dá uma explicação racional para a grande afinidade dos ligantes 5'-substituídos. O Caminho III, por sua vez, já tinha sido sugerido por Fletterick e colaboradores para a entrada do ligante T3 [19] e por Schulten e colaboradores em suas simulações da dissociação do ácido retinóico de seu receptor [41]. Desta forma, diversas linhas de evidência obtidas das simulações e de resultados experimentais dão suporte à existência destes mecanismos. O estudo detalhado das interações do ligante em cada um dos mecanismos de dissociação com DMCI é um complemento natural para estes resultados, podendo sugerir mutações sítio-dirigidas e permitir uma análise da importância relativa de cada um destes mecanismos nos sistemas reais, o que não pode ser feito a partir das simulações com DMAA.

## Capítulo 6

# Estudo da Dissociação do T3 usando DMCI

Os resultados obtidos por DMAA foram muito estimulantes por estarem correlacionados com observações experimentais e por serem capazes de sugerir explicações para alguns fenômenos cujas interpretações, baseadas nas estruturas cristalográficas e nos estudos funcionais, não eram claras. Um estudo mais detalhado das interações entre a proteína e o hormônio nestes mecanismos de dissociação se faz necessário, no entanto, para que a comunidade experimental seja capaz de sugerir mutações sítio-dirigidas que procurem verificar ou refutar cada um destes mecanismos. A técnica escolhida para a análise destas interações surgiu de forma natural pelo estudo das simulações de Schulten e colaboradores sobre a dissociação do ácido retinóico e é conhecida como Dinâmica Molecular com Caminho Induzido. Nosso estudo da dissociação do hormônio tireoideano leva uma vantagem significativa sobre o estudo em [41] devido a que os mecanismos induzidos são aqueles obtidos com DMAA, enquanto que em [41] as trajetórias tiveram que ser propostas apenas pela análise das estruturas estáticas.

### 6.1 Metodologia de análise dos resultados

Como foi apresentado na Seção 4.3, as simulações com DMCI foram feitas com forças com duas velocidades diferentes. Espera-se que as simulações com a força mais lenta sejam representações melhores da dinâmica real, uma vez que a proteína tem mais tempo para relaxar e estabilizar as configurações do ligante ao longo do caminho induzido. Desta forma mostraremos, em primeiro lugar, que o perfil da força nos dois conjuntos de simulação não é qualitativamente alterado, de forma que

as interações específicas são posteriormente analisadas apenas para o conjunto de simulações com forças mais lentas. Em seguida, mostraremos a metodologia escolhida para a análise dos resultados, integrando o perfil das interações e o perfil da força ao longo da simulações com as configurações de dinâmica observadas diretamente.

### Força: velocidade e comportamento

Em estudos com DMCI é necessário saber se as forças envolvidas nos mecanismos estudados correspondem a interações representativas de uma simulação não induzida. Forças muito pequenas devem induzir a dissociação de forma muito suave, tendo a proteína tempo de estabilizar todas as configurações envolvidas da mesma forma que o faria em uma simulação clássica. Na medida que a velocidade da força aumenta, deslocamentos mais bruscos são provocados no sítio puxado. Se a dinâmica da proteína não é suficientemente rápida, as interações observadas podem não ser interações realistas, mas estados de alta energia que foram induzidos pela passagem rápida do ligante.

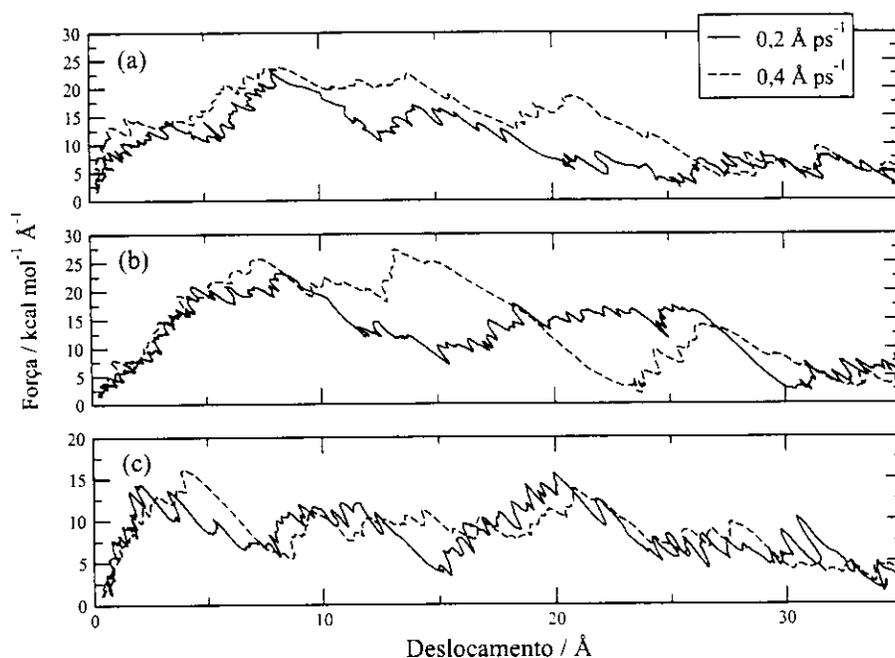


Figura 6.1. Comparação dos perfis das forças com velocidades diferentes nos três caminhos: (a) Caminho I; (b) Caminho II; (c) Caminho III.

A análise do perfil das forças em função do deslocamento do ligante pode ser feita sem nenhuma mudança de escala (os perfis de força em função do tempo não podem ser comparados diretamente, já que o tempo de dissociação varia com a velocidade da força). Estes perfis estão representados na Figura 6.1. Como é possível observar, os perfis das forças para os caminhos I e III não variam significativamente: praticamente as mesmas barreiras são encontradas e a principal diferença está na melhor definição destas barreiras. Em alguns casos a magnitude da força é menor para as simulações com menor velocidade, como é o caso do processo do Caminho I que ocorre em torno de 24 Å. Forças menores para simulações com velocidades menores são em geral esperadas pela melhor estabilização das conformações do ligante ao longo da trajetória. A diferença mais notável está no processo que ocorre após 15 Å de deslocamento ao longo da Caminho II. Para a simulação com velocidade  $0,4 \text{ \AA ps}^{-1}$  há uma redução muito pronunciada da força, enquanto que nas simulações com menor velocidade a força permanece constante até que diminui em 27 Å, aproximadamente.

Esta diferença se deve a que, na simulação com forças rápidas, o ligante atinge uma cavidade basicamente hidrofóbica e sai dela pela rápida perda de uma série de impedimentos estéreos, que requerem uma movimentação significativa da cadeia protéica. Na simulação mais lenta, o ligante tem tempo de formar diversas interações hidrofílicas na mesma cavidade, que são responsáveis pela barreira associada aos 27 Å de deslocamento.

Resumindo, os perfis mostram que a maioria dos processos são mantidos e ocorrem com magnitudes semelhantes, a não ser em algumas exceções. O maior problema está associado a uma distorção da cadeia lateral da proteína na simulação mais rápida, mas que não ocorre na simulação mais lenta. Para as interações hidrofílicas, que são responsáveis pela maior parte das barreiras, a mudança de velocidade não alterou qualitativamente as simulações, apenas a intensidade e definição destas barreiras. A análise detalhada das interações mostrará a natureza das barreiras em cada curva apresentada na Figura 6.1.

### Sistemática de análise

Três resultados devem ser analisados de forma combinada para que a técnica DMCI seja explorada em todo seu potencial: os perfís da força em função do tempo de simulação, os perfís das energias de interação entre os aminoácidos e o ligante e as configurações espaciais da proteína e do ligante que podem ser observadas diretamente nas simulações.

As energias de interação entre todos os aminoácidos que estiveram a menos de 4,0 Å de algum sítio do hormônio em algum momento da simulação foram computadas em todos os instantes da simulação. Desta forma, geraram-se perfís de interação entre diversos aminoácidos e o hormônio em função do tempo de simulação. Em seguida, o perfil das interações foram analisados e todos os aminoácidos cuja energia de interação com o hormônio excedeu aproximadamente 10,0 kcal mol<sup>-1</sup> em algum momento da simulação foram escolhidos<sup>6</sup>. A dinâmica destes aminoácidos foi observada de forma combinada com a dinâmica do hormônio nas simulações para verificar a natureza das interações e suas variações. Simultaneamente, comparou-se a variação da energia de interação com o perfil de força em função do tempo para atribuir as barreiras apresentadas neste último perfil à perda ou formação de interações importantes com cada um dos aminoácidos. O mesmo procedimento foi feito para todas as moléculas de água na simulação. Assim, uma análise combinada dos perfís das energias de interação, das forças e da dinâmica molecular foi feita, permitindo alcançar uma visão detalhada dos mecanismos.

## 6.2 Caminhos de dissociação para o receptor TR $\alpha$

Os três mecanismos estudados com DMCI são aqueles obtidos com DMAA. Agora, no entanto, não se faz nenhuma aproximação sobre os potenciais.

### 6.2.1 Dissociação ao longo do Caminho I

Na Figura 6.2 o Caminho I de dissociação está representado, e os aminoácidos cujas interações com o hormônio foram mais importantes estão destacados. A dissociação

<sup>6</sup>10 kcal mol<sup>-1</sup> é aproximadamente duas vezes a energia tipicamente envolvida em uma ligação de hidrogênio na água líquida.

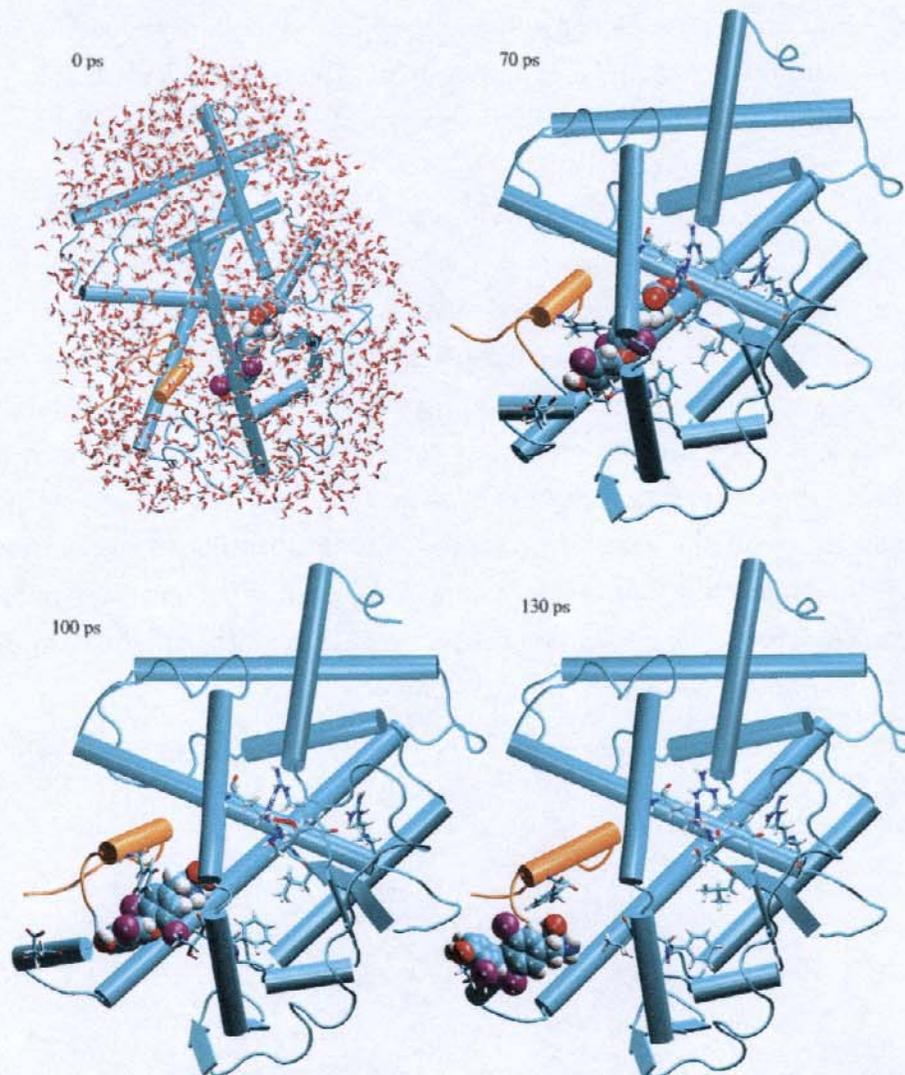


Figura 6.2. Visão global da dissociação ao longo do Caminho I obtida usando DMCI.

ocorre lentamente até aproximadamente 70 ps e então prossegue de forma mais rápida, sendo que após 130 ps o hormônio está praticamente fora do LBD. Uma primeira análise dos perfis da força em função do tempo de simulação, representada na Figura 6.3 mostra que, de fato, a maior barreira para o deslocamento do ligante se desfaz em torno dos 70 ps de simulação.

A força tem um crescimento aproximadamente constante até pouco mais de

25 ps de simulação, quando sofre uma pequena redução. Pela análise do perfil das interações entre os aminoácidos e o ligante, esta pequena redução pode ser atribuída a uma interação eletrostática levemente repulsiva entre o ligante e a Leu 276, como mostra a Figura 6.4 (a).

A força, em seguida, continua aumentando até que sofre a redução mais importante na simulação, que ocorre entre 70 e 75 ps, aproximadamente. Várias interações estão envolvidas neste processo, de forma conjunta, e podem ser vistas nas Figuras 6.5 e 6.6. Na Figura 6.5 (a) a (c) estão apresentados os perfis das interações dos aminoácidos hidrofílicos Arg 228 e Arg 262 e da molécula de água W639, estando destacados os intervalos de tempo que correspondem à diminuição da força após a primeira barreira. Os mecanismos moleculares em que estas espécies estão envolvidas estão representados na Figura 6.5 (d). Como pode ser observado, enquanto que a interação com a Arg 228 praticamente não muda, ocorrem reduções expressivas nas interações eletrostáticas do hormônio com o resíduo Arg 262 e com a água W639.

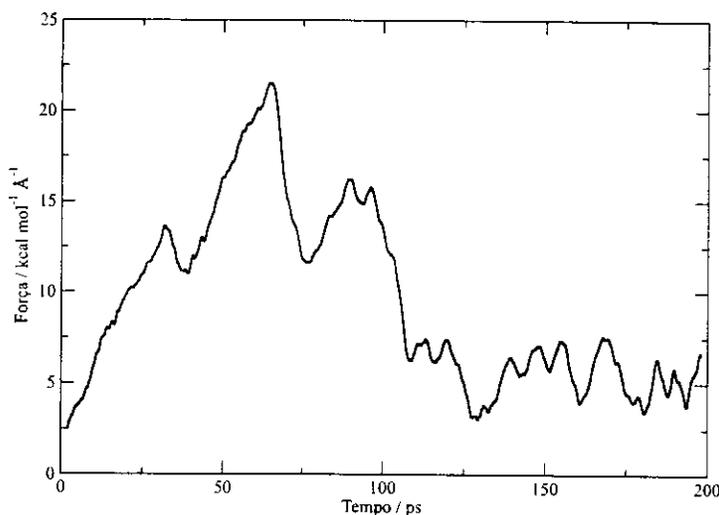


Figura 6.3. Força em função do tempo de simulação ao longo do Caminho I.

As imagens associadas aos principais processos envolvidos nesta primeira barreira estão representados nas Figuras 6.5 (d) e 6.6 (e). A interação hidrofílica da Arg 262 é intermediada por uma molécula de água (W639) desde o início da simulação. Esta interação se conserva até 70 ps, quando o hormônio se desloca fazendo com que a ligação de hidrogênio do carboxilato do T3 com a água W639 se rompa.

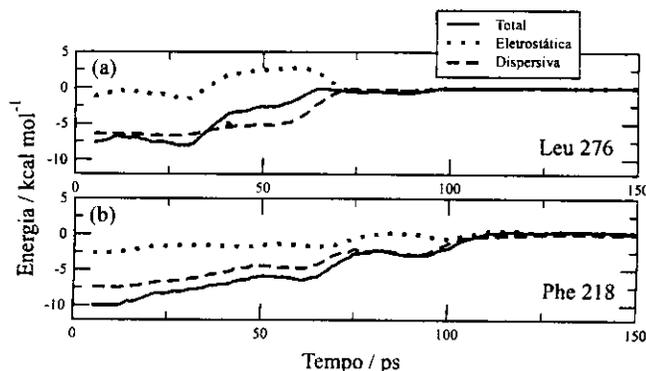


Figura 6.4. Variação da energia das interações hidrofóbicas mais importantes ao longo do Caminho I.

A estabilidade da cavidade hidrofílica é conservada pela formação da ligação de hidrogênio entre esta molécula de água e a Ser 277 e em 75 ps a interação entre a Arg 262 e o hormônio já está significativamente enfraquecida, como mostra a Figura 6.5 (d) aos 75 ps de simulação. O enfraquecimento subsequente da interação T3-R262 é consequência do lento afastamento do carboxilato do hormônio. A molécula de água W639 também tem sua interação com o hormônio enfraquecida, já que permanece interagindo com os aminoácidos R262 e S277, como mostram as Figuras 6.5 (c) e (d).

O deslocamento que promove a perda da interação T3-R262 provoca, simultaneamente, uma modificação importante nas interações entre o hormônio e o aminoácido Ser 277. Como mostra a Figura 6.6 (e), antes de 70 ps a Ser 277 forma um ligação de hidrogênio com o grupo amino do T3 através de seu carbono carbonílico. Esta ligação está associada à baixa energia de interação entre este resíduo e o ligante desde o início da simulação, mostrada na Figura 6.6 (b). O perfil desta interação é interessante: a interação atrativa dura até pouco mais de 75 ps, quando é substituída por uma interação levemente repulsiva. Em seguida, novamente se forma uma breve interação atrativa que é logo perdida, antes dos 100 ps de simulação. A contribuição para esta energia de interação é fundamentalmente eletrostática (linha pontilhada). A Figura 6.6 (e) torna evidente a natureza desta interação: a ligação de hidrogênio entre a amina do hormônio e o grupo carbonílico da Ser 277 persiste até 66 ps de simulação. Em seguida, esta interação se

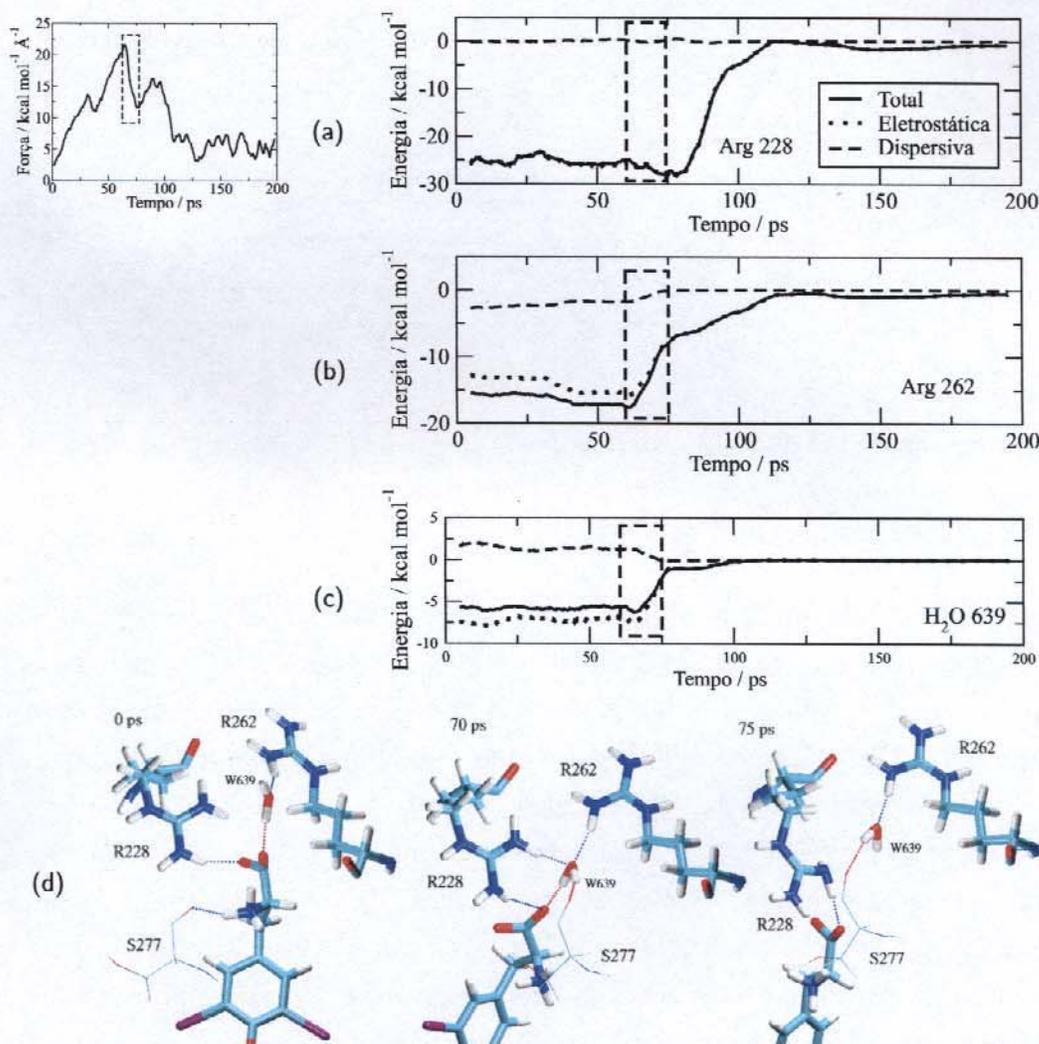


Figura 6.5. Energia de interação e mecanismos moleculares associados à primeira barreira ao longo do Caminho I: Arg 228, Arg 262 e W639. O perfil da força em função do tempo de simulação é mostrado no canto superior esquerdo para maior clareza. Os retângulos tracejados indicam o intervalo de tempo que está sendo analisado.

rompe, mas é rapidamente substituída por uma nova ligação de hidrogênio entre a amina do ligante e, desta vez, o álcool da serina. Esta interação também é breve, sendo substituída por uma ligação de hidrogênio entre a amina e uma molécula de água (W317). Neste estado de transição o carboxilato se aproxima do oxigênio do álcool, gerando a interação eletrostática repulsiva observada na Figura 6.6 (b) em

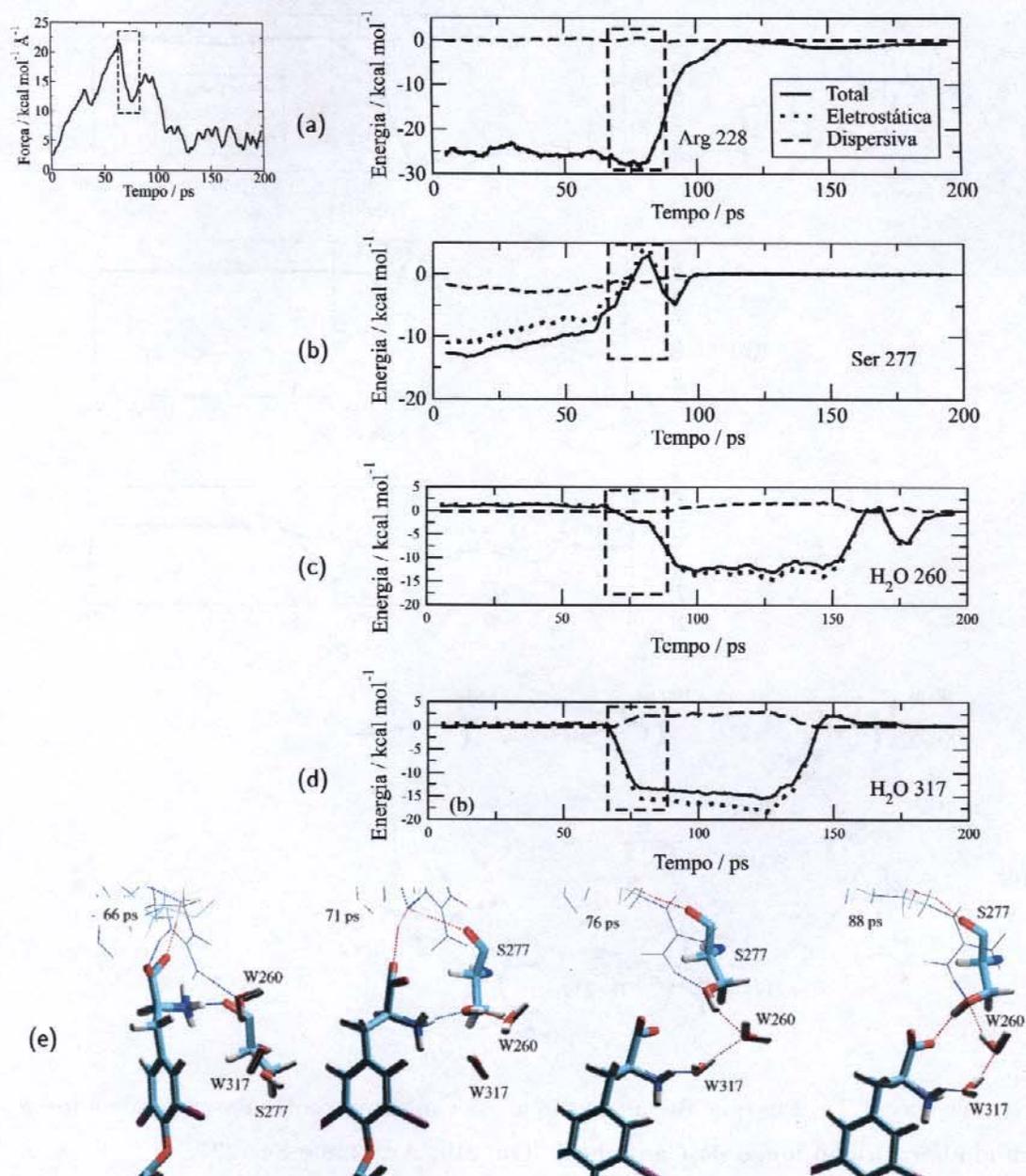


Figura 6.6. Energia de interação e mecanismos moleculares associados à primeira barreira ao longo do Caminho I: Arg 228, Ser 277, W260 e W317.

76 ps. Antes de 90 ps, porém, o álcool se reposiciona para formar uma ligação de hidrogênio com o carboxilato, que resulta novamente em uma interação atrativa breve, como mostram as Figuras 6.6 (b) e 6.6 (e).

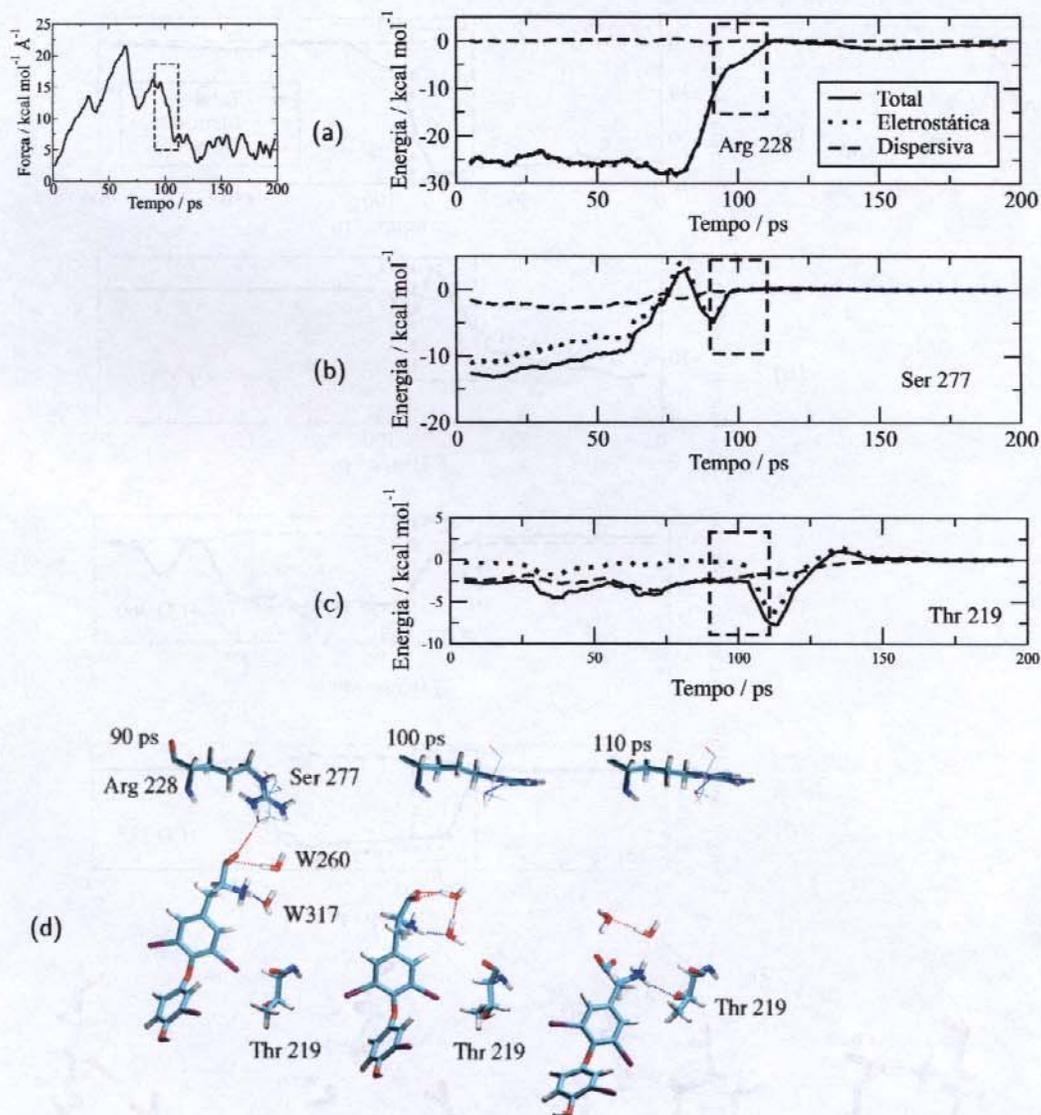


Figura 6.7. Energia de interação e mecanismos moleculares associados à segunda barreira ao longo do Caminho I: Thr 219, Arg 228 e Ser 277.

A última estrutura representada na Figura 6.6 (e) já mostra o início da forte interação entre as moléculas de água W260 e W317 com o ligante. Estas moléculas de água permanecem associadas à extremidade hidrofílica do hormônio durante praticamente todo o processo de dissociação a partir de 80 ps, sendo que percorrem a cavidade hidrofóbica juntamente com o ligante. Este comportamento é razoável, uma vez que deve estabilizar as cargas do carboxilato e da amina. As energias de

interação destas moléculas de água com o ligante estão representadas nas Figuras 6.6 (c) e (d) e uma visão do tipo de estrutura envolvida pode ser vista na Figura 6.7 (d). A formação destas ligações não impede, no entanto, que a perda das interações hidrofílicas com os aminoácidos não representem uma segunda barreira no processo de dissociação. Como mostra a Figura 6.3, a força volta a crescer após 75 ps de simulação e uma nova redução brusca se inicia pouco antes de 100 ps. As interações das águas W260 e W317 permanecem aproximadamente constantes nesse período, como mostram as Figuras 6.6 (c) e (d), mas a importante interação entre a Arg 228 e o carboxilato é finalmente perdida. O perfil desta interação pode ser observado na Figura 6.7 (a) e imagens do processo molecular envolvido estão representados na Figura 6.7 (d). No fim deste processo, uma ligação de hidrogênio se forma entre a Thr 219 e a amina do hormônio, o que deve atrair o ligante na direção da dissociação e, portanto, contribuir para a redução da força. Este processo pode ser observado pelo perfil da interação T3-T219 na Figura 6.7 (c) e no mecanismo representado na Figura 6.7 (d).

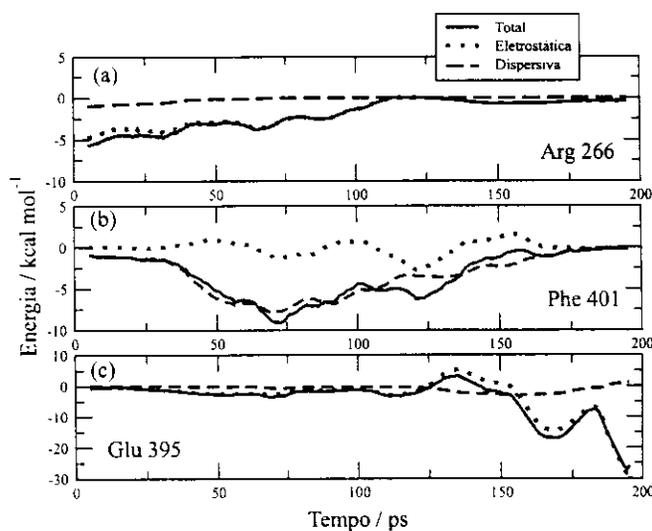


Figura 6.8. Variação da energia das interações de importância secundária ao longo do Caminho I.

Vale a pena também destacar brevemente algumas interações de menor importância ao longo deste caminho, que estão representadas na Figura 6.8. A Arg 266 possui uma interação levemente atrativa com o ligante desde o início da simulação.

Esta atração eletrostática se perde lentamente com o afastamento do hormônio. Esta arginina também compõe a extremidade polar da cavidade de ligação. No decorrer do processo de dissociação, ainda se forma uma interação hidrofóbica bastante efetiva entre a Phe 401 e o hormônio, como mostra a Figura 6.8 (b). Esta interação consiste na interação dispersiva entre anéis aromáticos da fenilalanina e do ligante. Este aminoácido pertence à hélice 12 e pode ser observado na Figura 6.2. Por fim, quando o hormônio já se encontra praticamente fora do LBD, uma interação bastante efetiva entre o carboxilato do ácido glutâmico 395 e a amina do T3 se estabelece, no que poderia ser um estado inicial de um processo de associação análogo, mas no sentido inverso. As pequenas barreiras encontradas no perfil da força (Figura 6.3) após 110 ps são formadas por estas interações e por interações com moléculas de água no exterior da proteína (ver Apêndice A).

Concluindo, o mecanismo envolve duas etapas principais que são determinantes para dissociação do ligante ao longo do Caminho I. A primeira delas, observada logo após 70 ps de simulação envolve o rompimento de interações hidrofílicas e hidrofóbicas simultaneamente, sendo importante a participação de moléculas de água. Em seguida, uma segunda barreira é observada, na qual a principal interação perdida é a interação do ligante com a Arg 228, que é o aminoácido que possui a menor energia de interação com o ligante na estrutura inicial. Este mecanismo se destaca pelo importante papel da Serina 277, que é o aminoácido responsável pela seletividade do ligante GC-1 em relação à isoforma  $\beta$  deste receptor. As interações deste aminoácido com o ligante são bastante particulares. Apesar de que na estrutura cristalográfica, provavelmente a de menor energia, sua interação não ocorre diretamente com o ligante, na dissociação ao longo deste caminho e na estrutura inicial, a formação de ligações de hidrogênio com o T3 ocorre de duas formas, pela aceitação e doação de prótons por seus grupos carbonílico e alcóólico, respectivamente.

A participação das moléculas de água na substituição das interações hidrofílicas também é fundamental. Algumas moléculas, inclusive, acompanharam o ligante através da cavidade hidrofóbica. Ao imaginar este mecanismo como um mecanismo de associação, também é possível imaginar que moléculas de água inicialmente associadas aos grupos hidrofílicos do hormônio poderiam acompanhar sua migração através da cavidade de ligação aproximando os resíduos da extremidade hidrofílica

antes de uma completa associação do ligante.

### 6.2.2 Dissociação ao longo do Caminho II

Uma visão geral do Caminho II pode ser observada na Figura 6.9, na qual a separação das hélices 8 e 11 induzida pela passagem do ligante é evidente. Este caminho também possui duas barreiras de potencial bem definidas, como pode ser observado no perfil da força em função do tempo de simulação, na Figura 6.10. A primeira barreira de potencial ocorre em torno de 70 ps de simulação e, como pode ser visto na Figura 6.9, nesse momento o ligante ainda está totalmente no interior do LBD. A segunda barreira ocorre em 150 ps, instante no qual apenas a extremidade hidrofílica do hormônio interage efetivamente com a proteína.

A partir de 50 ps de simulação o ligante já perde algumas interações com a proteína, o que faz com que a força permaneça aproximadamente constante. Estas interações correspondem às interações hidrofílicas entre o carboxilato do T3 e os aminoácidos Arg 228 e Arg 266 e à interação entre a amina do T3 e a carbonila da Ser 277. A evolução das energias destas interações com o ligante podem ser vistas na Figuras 6.11 (a) a (c). O mecanismo molecular associado a esta evolução está representado na Figura 6.11 (e).

A Figura 6.11 (e) mostra que até 49 ps a extremidade hidrofílica do hormônio participa de várias interações com aminoácidos polares do LBD: a amina faz uma ligação de hidrogênio com a carbonila da Ser 277, e o carboxilato interage fortemente com a Arg 228 e com uma molécula de água (W639). Esta molécula ainda forma ligações de hidrogênio com as argininas 228 e 262, formando uma rede de interações hidrofílicas que estabiliza o sítio de ligação. A Arg 266 não está representada na Figura 6.11 (e) porque não interage por ligações de hidrogênio com nenhuma das espécies envolvidas nesta rede de interações, mas sua interação eletrostática é importante, como pode ser observado na Figura 6.12. O perfil da interação da molécula de água W639 com o T3 pode ser visto na Figura 6.11 (d).

Antes de 60 ps a interação da Arg 228 com o ligante já foi reduzida pela metade, devido ao rompimento da ligação de hidrogênio desta com o carboxilato do T3. No entanto, enquanto a ligação de hidrogênio com a Ser 277 se conserva, a molécula de água se desloca e passa a intermediar uma interação entre o carboxilato e a Arg 228,

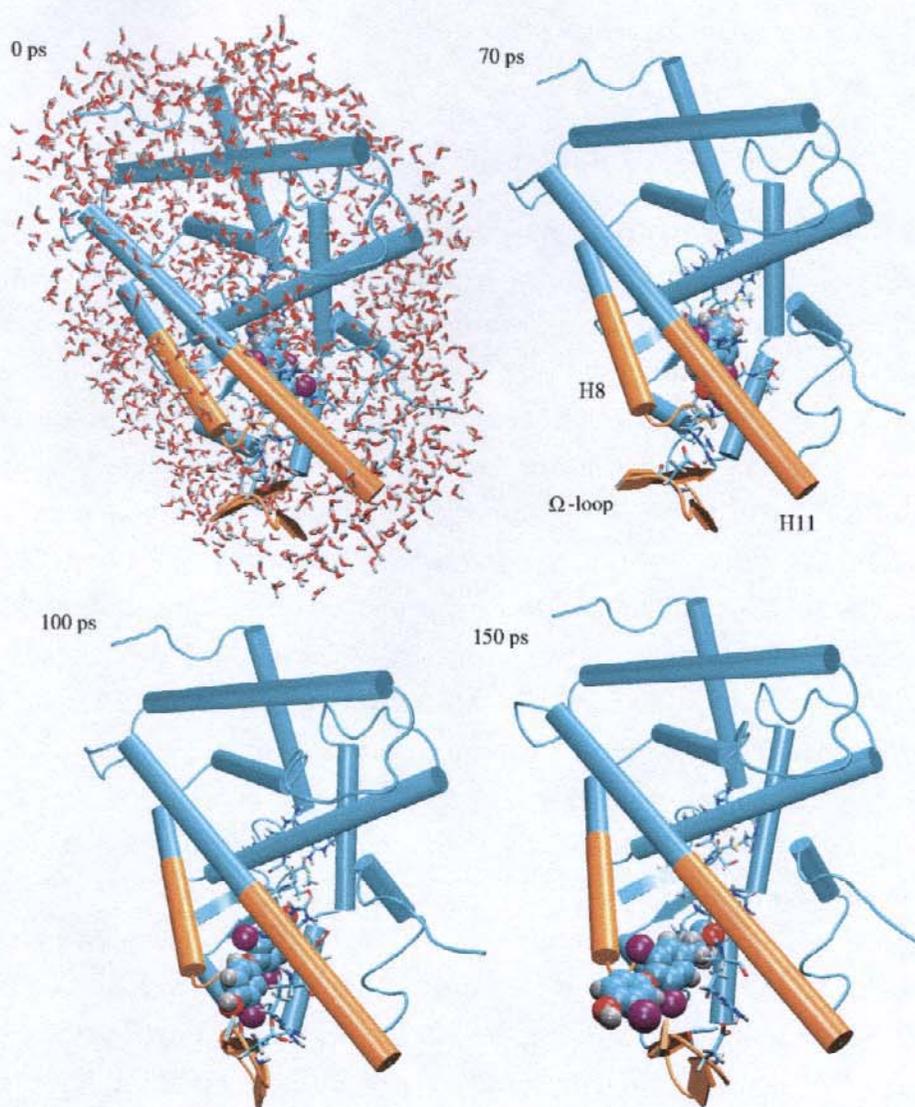


Figura 6.9. Visão global da dissociação ao longo do Caminho II obtida usando DMCI.

em processo que pode ser observado na Figura 6.11 (e) em 56 ps. Este movimento resulta na redução substancial da interação T3-R228 e, em seguida, da interação T3-R262, que podem ser observadas nas Figuras 6.11 (a) e (b). Em seguida, a ligação de hidrogênio do T3 com a molécula de água se rompe e a interação entre a amina do hormônio e a carbonila da Ser 277 é substituída por uma ligação de

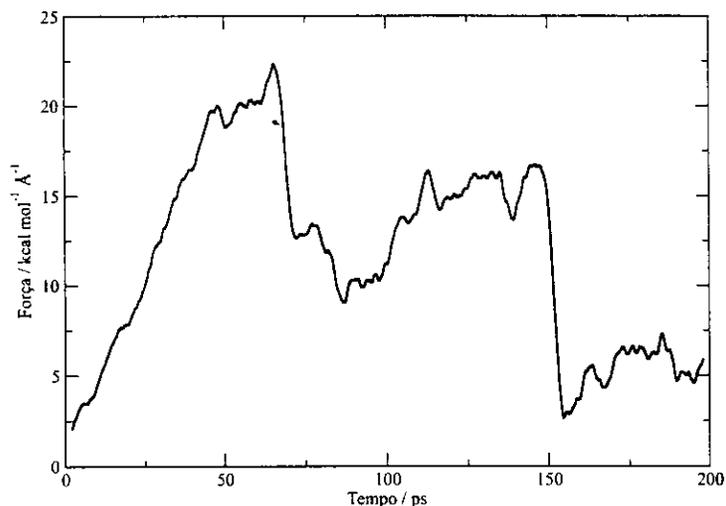


Figura 6.10. Força em função do tempo de simulação ao longo do Caminho II.

hidrogênio entre a amina da Ser 277 e o carboxilato do T3. Esta ligação também dura pouco e, em 72 ps, o hormônio se desloca significativamente afastando-se da extremidade polar da cavidade.

A força reduz-se ao máximo apenas após 75 ps de simulação. Isto se deve a que interações hidrofílicas mais fracas e algumas interações hidrofóbicas também representam barreiras de potencial significativas para o movimento do hormônio. As Figuras 6.13 (a) a (d) mostra a energia de interação interação de quatro aminoácidos que possuem interações fracamente hidrofílicas ou hidrofóbicas no decorrer da simulação. Os mecanismos moleculares associados à evolução destas interações até 75 ps estão representados na Figura 6.13 (e).

A Thr 275 forma intermitentemente uma ligação de hidrogênio com a amina do T3 desde o início da simulação. O alinhamento paralelo do anel fenólico do hormônio e o anel aromático da Phe 218 resultam em uma interação dispersiva bastante importante, que pode ser observada na Figura 6.13 (a). Em 60 ps, estes anéis tornam-se praticamente ortogonais, fazendo com que esta interação dispersiva se perca. Outra interação dispersiva importante pode ser observada entre a Leu 276 e o outro anel aromático do T3, que evolui de forma semelhante à interação dispersiva T3-F218, como mostra a Figura 6.11 (d). Associado ao deslocamento decorrente da perda da interação T3-R228, o hormônio deixa de interagir com a Thr 275 até que, pouco antes de 70 ps, forma uma breve ligação de hidrogênio com

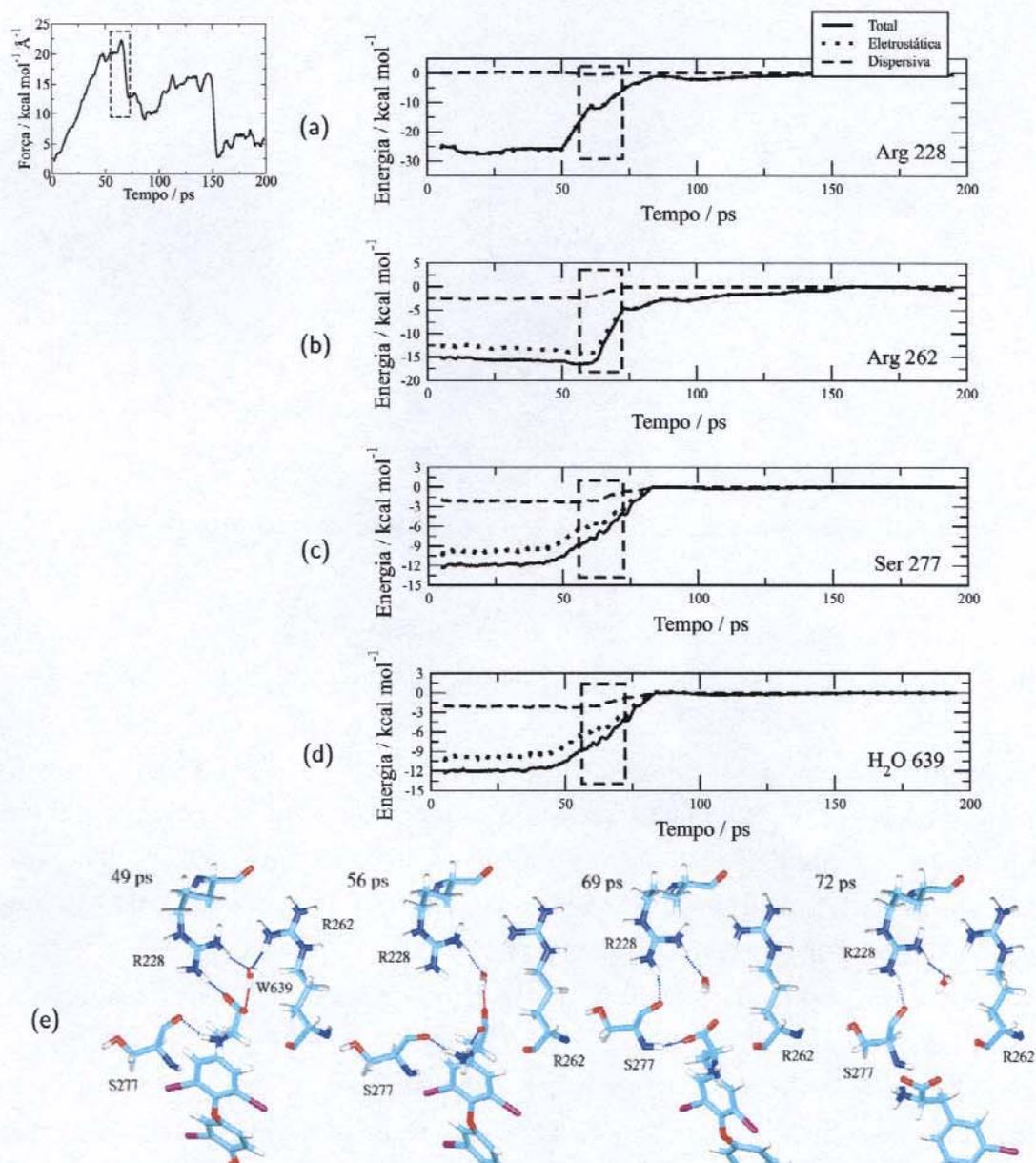


Figura 6.11. Energia de interação e mecanismos moleculares associados à primeira barreira ao longo do Caminho II: Arg 228, Arg 262, Ser 277 e W639.

a Met 259. Esta resulta em um leve decréscimo de sua energia de interação com o hormônio, como pode ser observado nas Figuras 6.13 (d) e (e). Em 75 ps todas estas interações já se perderam e o hormônio sofre um deslocamento significativo que resulta na redução da força observada na Figura 6.10. O hormônio rapidamente

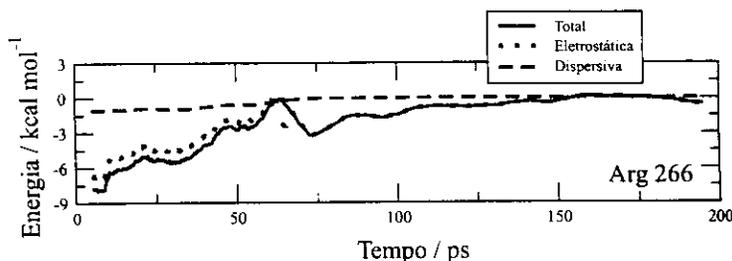


Figura 6.12. Variação da energia da interação T3-R266 ao longo do Caminho II.

passa a formar uma ligação de hidrogênio com a carbonila da Phe 218 e a se acomodar na cavidade hidrofílica em que participa das interações formadoras da segunda barreira de potencial.

Entre 75 e 150 ps o hormônio se desloca lentamente através da cavidade hidrofóbica, em um processo que envolve a substituição gradual das interações eletrostáticas em que participava no sítio ligação por novas interações que se formam para estabilizar um novo estado de transição. Estas interações envolvem um aminoácido hidrofóbico, a Phe 218, e outros quatro aminoácidos cujas cadeias laterais são capazes de participar de interações hidrofílicas: Thr 219, Arg 384, His 381 e Asp 206. A primeira interação formada é a ligação de hidrogênio entre a carbonila da Phe 218 com a amina do hormônio. Até 140 ps de simulação, no entanto, já se formou uma ligação de hidrogênio do carboxilato do T3 com o álcool da Thr 219 e uma forte interação eletrostática com a His 381, como pode ser observado nas Figuras 6.13 (e) e 6.14 (f). Além disso, a Asp 206 forma ligações de hidrogênio intermitentes com o fenol, resultando também em uma importante interação hidrofílica.

Após 150 ps de simulação, as ligações de hidrogênio entre o T3 e os aminoácidos Phe 218 e Thr 219 se rompem, assim como se desfaz a interação eletrostática com a His 381. A perda simultânea destas interações resulta em um rápido deslocamento do hormônio e, portanto, no rápido decréscimo da força, observado na Figura 6.10. O rompimento destas ligações é claramente observado entre 142 e 152 ps, como mostra a Figura 6.14 (f). A repulsão eletrostática entre o carboxilato do Asp 206 e Iodo do anel fenólico resultam no perfil da força observado na Figura 6.14 (d). A esta altura o hormônio se encontra praticamente fora do LBD, mas finalmente interage de forma efetiva pela atração eletrostática entre seu carboxilato e a cadeia

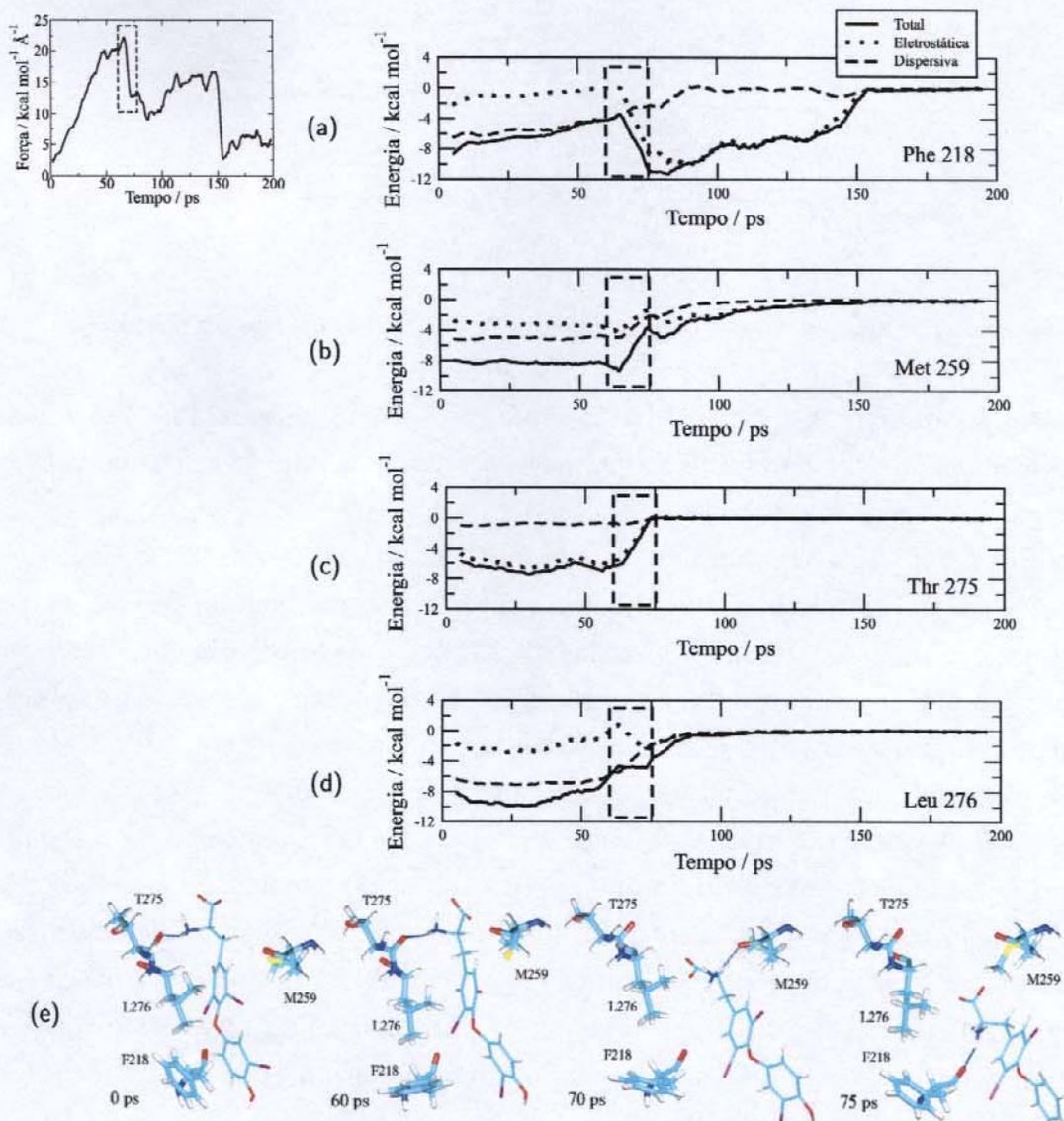


Figura 6.13. Energia de interação e mecanismos moleculares associados à primeira barreira ao longo do Caminho II: Phe 218, Met 259, Thr 275 e Leu 276.

lateral da Arg 384, interação representada na Figura 6.14 (b). A formação de diversas interações atrativas nos estágios finais da dissociação ao longo deste caminho indica que o início uma associação pelo mecanismo inverso pode ser favorável.

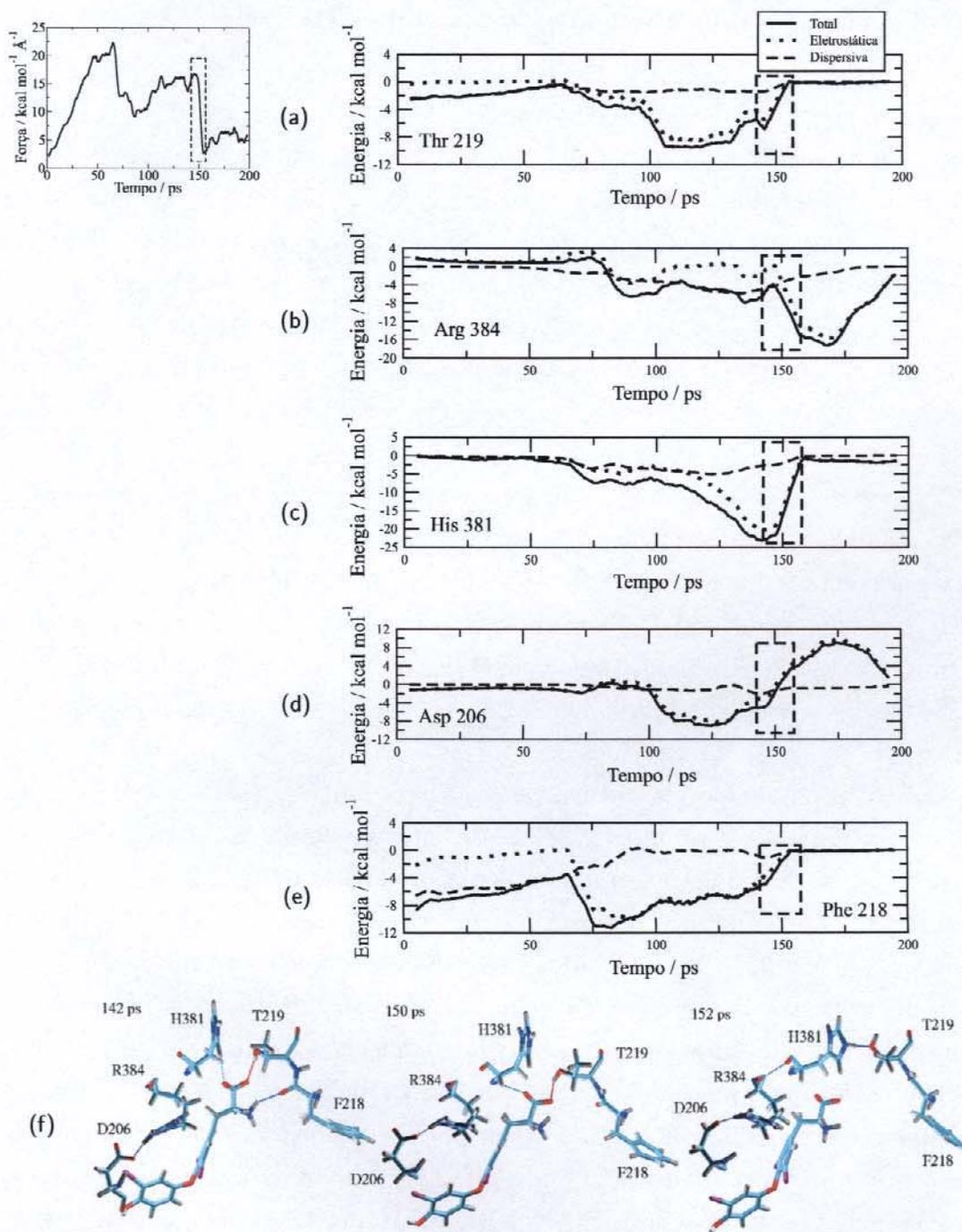


Figura 6.14. Energia de interação e mecanismos moleculares associados à segunda barreira ao longo do Caminho II: Thr 219, His 381, Arg 384, Phe 218 e Asp 206.

### 6.2.3 Dissociação ao longo do Caminho III

Por fim, a dissociação ao longo do Caminho III apresenta outros aspectos interessantes. Esta região da proteína já tinha sido sugerida para a entrada do ligante pela análise da estrutura cristalina do LBD do receptor TR- $\beta$ , que mostrava, pelos fatores de temperatura, ser a região mais móvel deste domínio [19]. A diferença fundamental entre este mecanismo e os outros dois está em que a extremidade hidrofílica do ligante sai da cavidade em primeiro lugar. Isto permite que o carboxilato e a amina do T3 façam ligações de hidrogênio com moléculas de água do meio. Por outro lado, todos os grupos hidrofóbicos do hormônio têm que passar pela extremidade polar da cavidade de ligação.

O perfil da força em função do tempo de simulação para a dissociação segundo este caminho está apresentado na Figura 6.15 e uma visão global da dissociação está representada na Figura 6.16. O perfil da força mostra três barreiras bem definidas, que ocorrem em 25 ps, 73 ps e 120 ps, aproximadamente. Como se vê na Figura 6.16, até 50 ps o T3 ainda está quase que totalmente no interior da proteína. Em 80 ps a extremidade hidrofílica já saiu do LBD e, em 130 ps, o hormônio já está quase que totalmente dissociado.

Os mecanismos moleculares envolvidos em cada um dos processos que resultam nas três barreiras são bastante distintos. A primeira redução da força, que ocorre a partir de 25 ps de simulação, se deve à perda simultânea de interações hidrofílicas e hidrofóbicas. A Figura 6.17 mostra a evolução das interações entre o T3 e os aminoácidos Arg 262, Arg 266 e Phe 218. São as energias de interação destes aminoácidos com o hormônio que sofrem variações significativas antes dos 50 ps, como mostram as Figuras 6.17 (a) a (c). O alinhamento paralelo do anel fenólico do T3 com o anel aromático da Phe 218 resulta em uma importante interação dispersiva que se reduz a menos da metade até os primeiros 50 ps de simulação. Isto ocorre inicialmente pela perda da conformação paralela dos dois anéis e, em seguida, pelo afastamento do hormônio. Este afastamento é uma consequência da rotação que o hormônio precisa realizar para atravessar a cavidade sem perturbar significativamente a estrutura da proteína, processo que pode ser observado com maior clareza nas duas primeiras imagens da Figura 6.16. Simultaneamente à perda desta interação dispersiva, a ligação de hidrogênio do carboxilato do T3 com

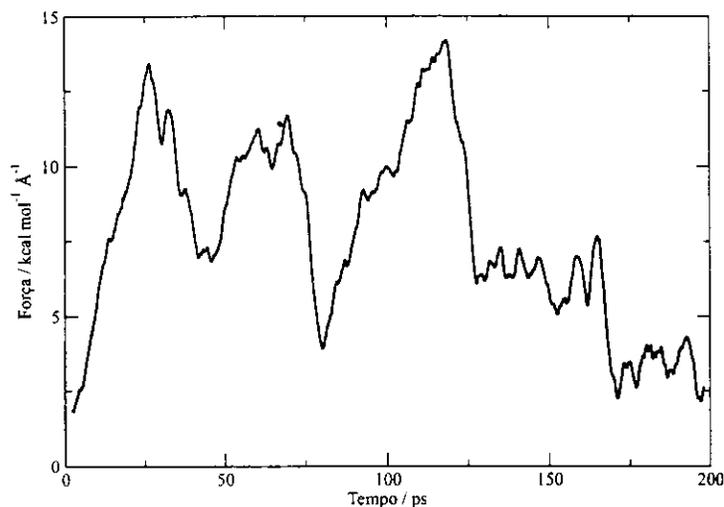


Figura 6.15. Força em função do tempo de simulação ao longo do Caminho III.

a molécula de água 639 se rompe. Esta molécula faz uma ponte entre o carboxilato e a Arg 262. O rompimento desta ligação resulta em um rápido afastamento do carboxilato desta arginina e da Arg 266, que resulta na redução significativa das atrações eletrostáticas entre estes dois aminoácidos e o carboxilato. Além disso, este movimento resulta em uma aproximação da amina do hormônio e a cadeia lateral da Arg 266 que gera uma interação eletrostática levemente repulsiva, que pode ser observada na Figura 6.17 (c) e na foto em 30 ps da Figura 6.17 (d). A perda conjunta da interação dispersiva T3-F218 e das interações hidrofílicas T3-R262, T3-R266 e T3-W639 resultam em um deslocamento significativo do hormônio e na redução da força observada entre 25 e 50 ps de simulação.

Enquanto estas interações são perdidas, a interação do hormônio com a Arg 228 é significativamente fortalecida, como mostra a Figura 6.18 (a). Isto ocorre porque este aminoácido, em geral, faz uma ligação de hidrogênio com o carboxilato do T3, mas durante a dissociação ao longo deste caminho, interage através de duas ligações de hidrogênio paralelas, como mostra a imagem em 50 ps da Figura 6.18 (b). Como pode ser visto no perfil da energia de interação T3-R228, em 75 ps de simulação a maior parte da atração eletrostática entre este aminoácido e o hormônio já se perdeu (Figura 6.18 (a)). Curiosamente, este processo, que se inicia claramente antes dos 60 ps, não é acompanhado por uma redução significativa na força, como era de se esperar em um processo no qual o hormônio perde uma inte-

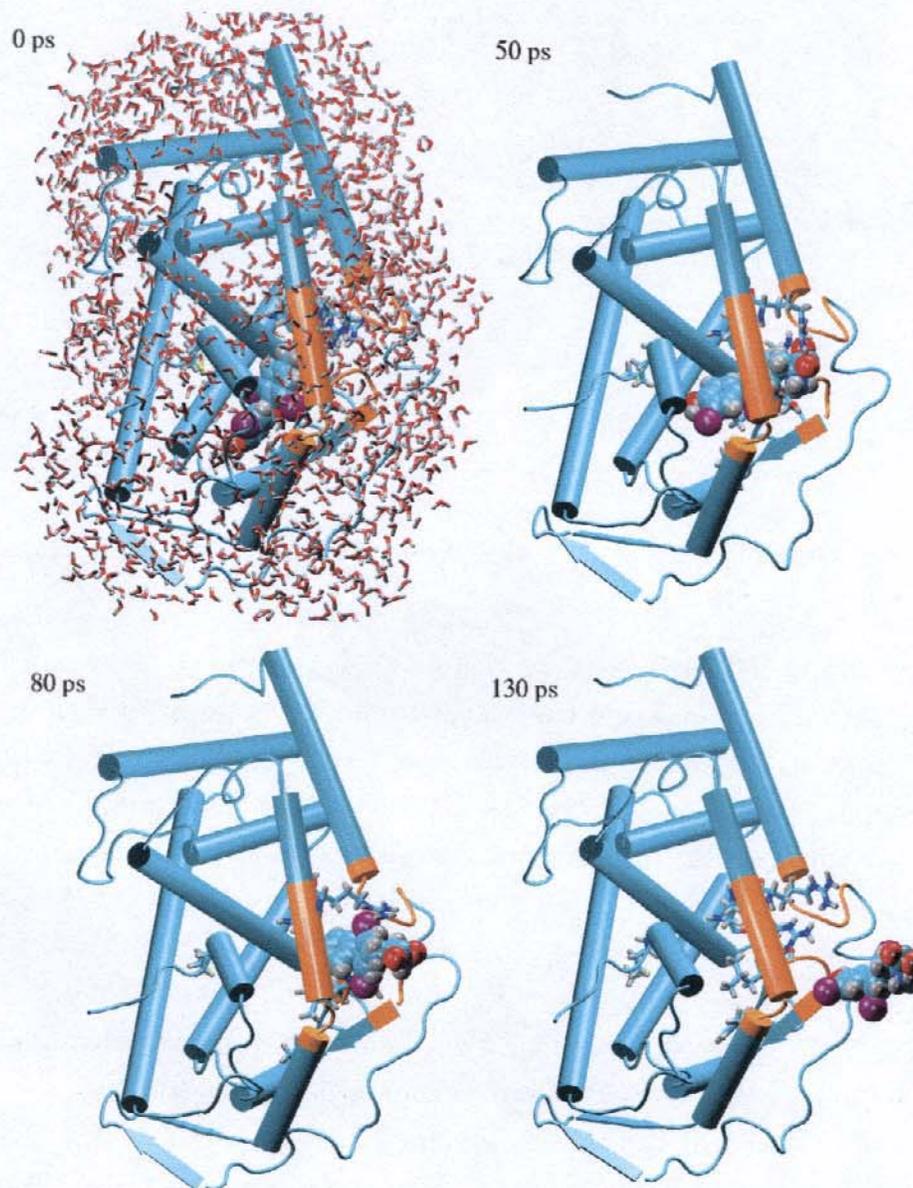


Figura 6.16. Visão global da dissociação ao longo do Caminho III obtida usando DMCI.

ração muito efetiva. O que se observa, no entanto, é que uma atração eletrostática extremamente intensa se desfaz sem que isto se manifeste claramente na força externa aplicada. É importante lembrar que, nos outros dois mecanismos, a perda da interação T3-R228 estava associada às principais barreiras impostas pela proteína

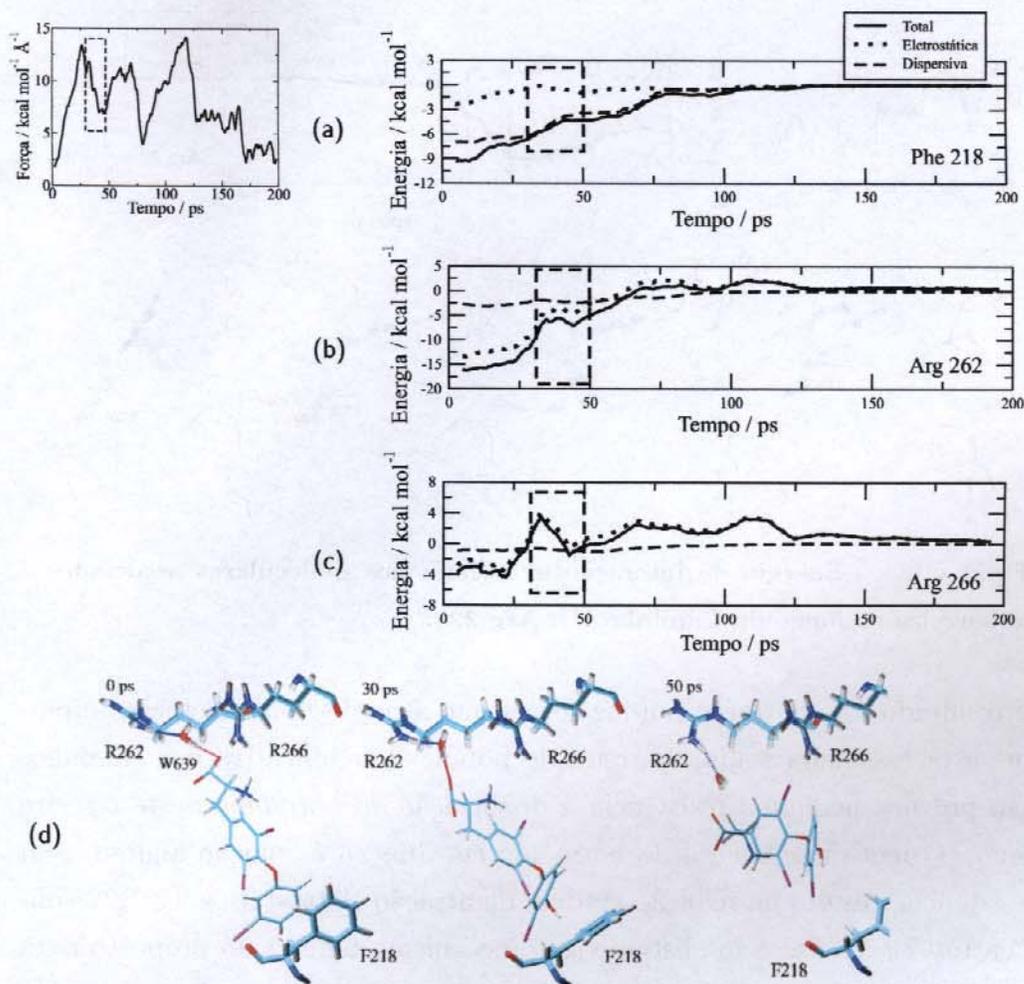


Figura 6.17. Energia de interação e mecanismos moleculares associados à primeira barreira ao longo do Caminho III: Phe 218, Arg 262 e Arg 266.

à dissociação do hormônio. Neste mecanismo, porém, o carboxilato sai em direção ao meio aquoso, enquanto que nos outros mecanismos o carboxilato tinha que atravessar a cavidade hidrofóbica após dissociar-se dos resíduos da extremidade polar da cavidade de ligação. Como mostra a Figura 6.18 (b), o processo de rompimento das ligações de hidrogênio entre o T3 e a Arg 228 está completo em 71 ps, mas estas interações são progressivamente substituídas por ligações de hidrogênio com moléculas de água que solvata a proteína. Esta substituição faz com que a perda da interação T3-R228 não represente uma barreira de potencial, uma vez que o carboxilato é imediatamente atraído pela água no exterior da proteína.

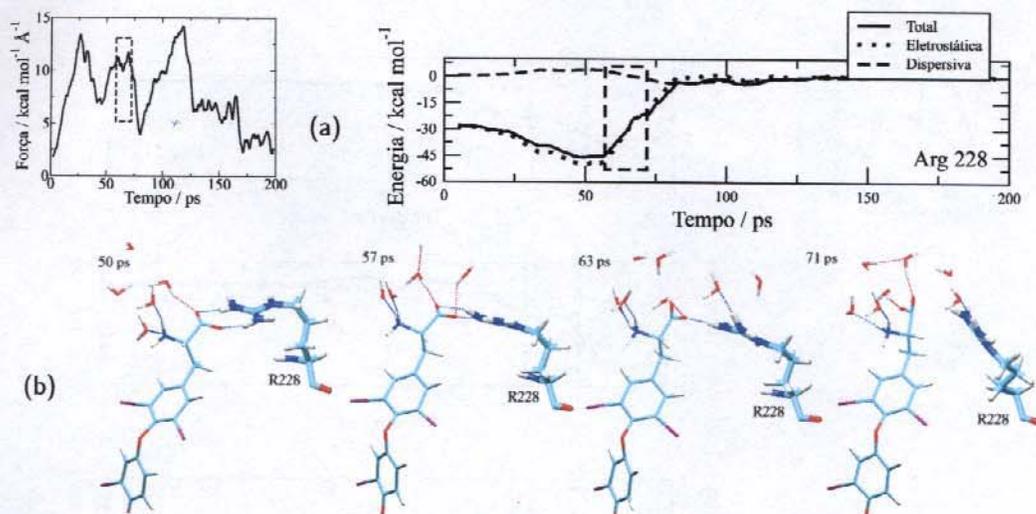


Figura 6.18. Energia de interação e mecanismos moleculares associados à primeira barreira ao longo do Caminho III: Arg 228.

Este resultado é importante porque revela que a perda uma interação importante que está associada a uma barreira de potencial significativa nos caminhos I e II não provoca nenhuma resistência à dissociação do hormônio neste terceiro mecanismo. O lento movimento do hormônio em direção à solução aquosa, sem maior resistência, resulta na redução gradual da atração eletrostática T3-R228 observada entre 52 e 76 ps. Não obstante este mecanismo tenha sido proposto para a dissociação do ácido retinóico de seu receptor em um estudo semelhante usando DMCI, este fato não foi observado, apesar de que a entrada de água no sítio ativo e sua associação com o carboxilato do ácido retinóico foi observada mesmo em simulações em que nenhuma força foi aplicada [41]. É interessante notar que, nessa altura da simulação, a amina do hormônio também já está formando ligações de hidrogênio com moléculas de água, que devem favorecer a dissociação.

Após o patamar da força entre 40 e 70 ps, aproximadamente, ocorre uma redução rápida e significativa, que representa a perda das interações responsáveis pela segunda barreira importante para a dissociação ao longo do Caminho III. A análise dos perfis das energias de interação dos aminoácidos com o hormônio mostram que interações eletrostáticas importantes são perdidas rapidamente entre o hormônio e os resíduos Ser 277 e Met 259. Além disso, interações dispersivas com os aminoácidos Leu 276 e Met 259 também se perdem no mesmo período de tempo, entre 74

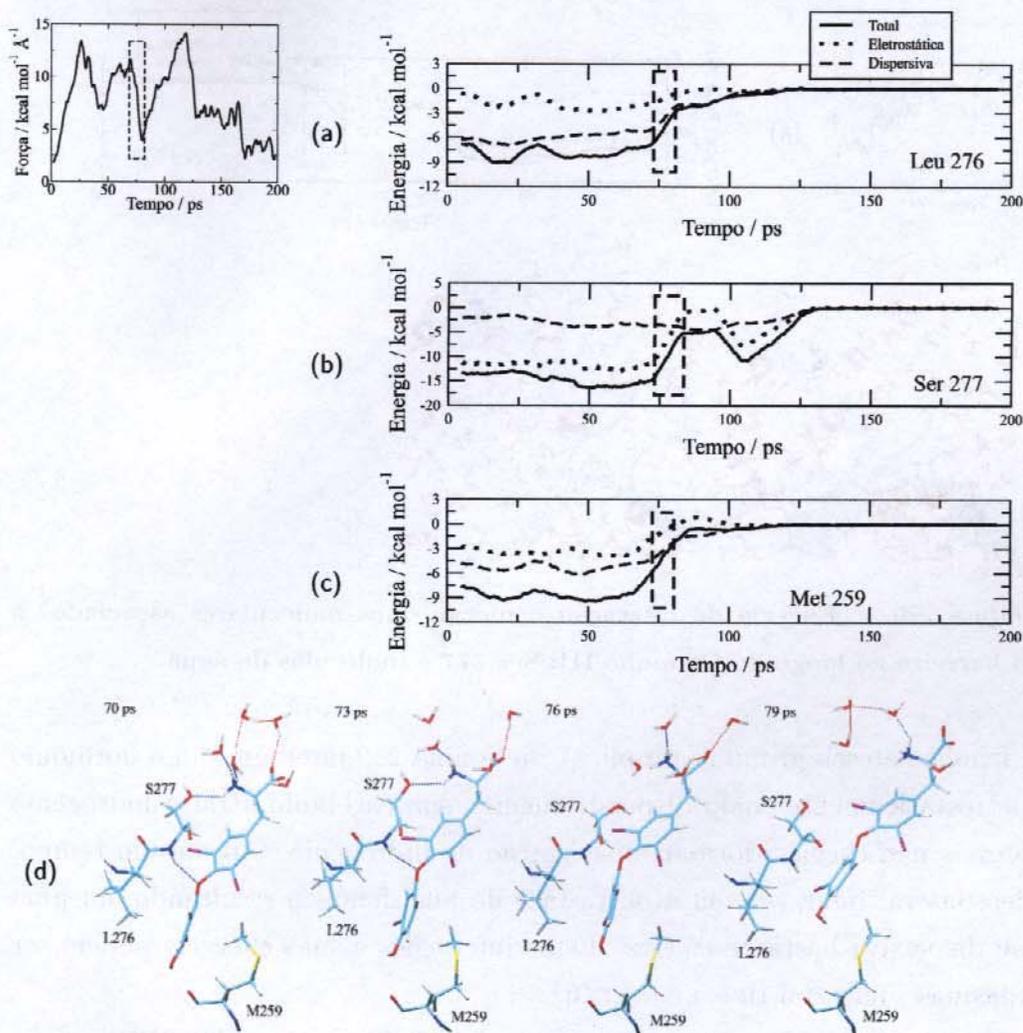


Figura 6.19. Energia de interação e mecanismos moleculares associados à segunda barreira ao longo do Caminho III: Ser 277, Leu 276, Met 259.

e 80 ps, aproximadamente, como mostram as Figuras 6.19 (a) a (c). O mecanismo molecular associado à perda destas interações está representado na Figura 6.19 (d). Em 70 ps o T3 possui duas interações eletrostáticas importantes com a Ser 277: uma ligação de hidrogênio entre sua amina e o álcool da serina e outra entre a amina deste aminoácido e o éster do hormônio. Estas ligações são intermitentes, razão pela qual a energia de atração eletrostática na Figura 6.19 (b) não é mais negativa. A Leu 276 possui, nesse instante, uma leve interação eletrostática com o hormônio, mas sua interação é principalmente dispersiva e ocorre pela proximidade

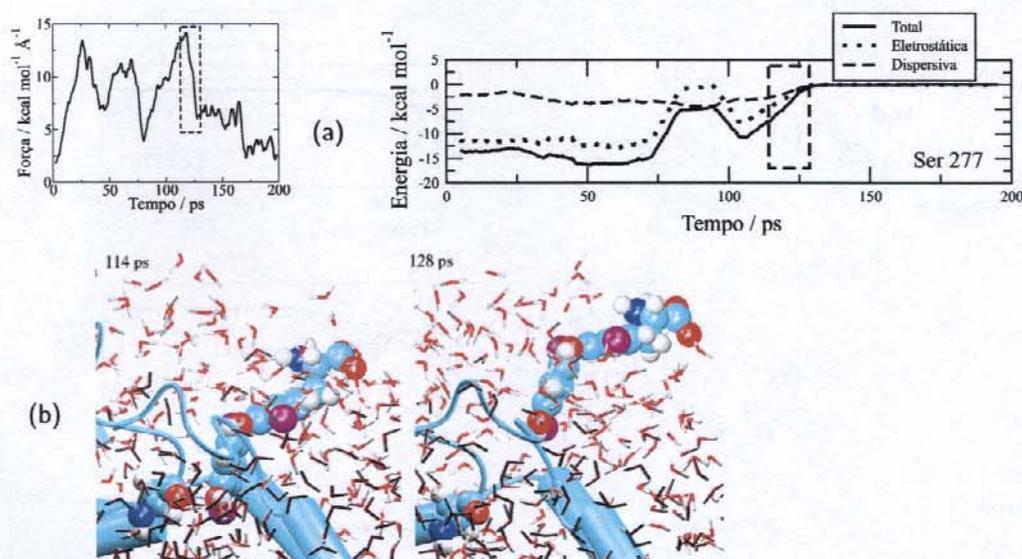


Figura 6.20. Energia de interação e mecanismos moleculares associados à segunda barreira ao longo do Caminho III: Ser 277 e moléculas de água.

do anel fenólico ao seu grupo isopropil. A metionina 259 interage com o hormônio tanto eletrostaticamente como dispersivamente: sua carbonila atrai o hidrogênio fenólico, mas não chega a formar uma ligação de hidrogênio. Ao mesmo tempo, sua cadeia lateral interage com a outra face do anel fenólico resultando em uma interação dispersiva bastante efetiva. Estas interações e suas energias podem ser observadas nas Figuras 6.19 (c) e 6.19 (d).

Até 73 ps as interações dispersivas com a Leu 276 e com a Met 259 já estão bastante reduzidas, mas a Ser 277 conserva as interações eletrostáticas que mantém o hormônio aproximadamente na mesma posição. Em 76 ps, no entanto, estas interações já se desfizeram, como pode ser observado nos perfis das energias de interação entre a serina e o hormônio, na Figura 6.19 (b). A Figura 6.19 (d) mostra a evolução destas interações: em 79 ps, em fim, todas estas interações já se desfizeram e a extremidade hidrofílica do hormônio já está imersa na água no exterior da proteína. A perda destas interações permite o deslocamento do hormônio e a conseqüente redução da força observada em torno de 75 ps na no perfil da força em função do tempo (Figura 6.15).

A última barreira observada para a dissociação ao longo do Caminho III ocorre em torno de 130 ps. Não obstante seja bastante notável, não tem grande importân-

cia do ponto de vista dos objetivos deste trabalho porque está associada à perda de ligações de hidrogênio com moléculas de água no exterior da proteína. Na verdade, em 114 ps a Ser 277 ainda forma uma ligação de hidrogênio com o oxigênio fenólico, que dura pouco, mas aparece no perfil da interação entre este aminoácido e o T3 já após 100 ps de simulação (Figura 6.20 (a)). Esta interação está representada na Figura 6.20 (b), na qual a Ser 277 e o hormônio estão desenhados por esferas de van der Waals. Em 128 ps, como se vê, essa ligação se rompeu, mas ainda mais importante para a redução da resistência ao movimento do hormônio é a saída do carboxilato e da amina da camada de moléculas de água utilizada na simulação. Este processo, então, não seria observado em uma simulação que tivesse uma camada de hidratação suficientemente espessa para acomodar todo o deslocamento do hormônio no exterior da proteína. Neste caso, a resistência ao movimento do hormônio seria constante, assim como a força externa. Da mesma forma, o último processo, observado em torno de 150 ps, é a saída definitiva do hormônio da água.

## Capítulo 7

# Conclusão

Os ligantes possuem um papel estrutural fundamental nos LBDs dos receptores nucleares. O fato de que estes ligantes se encontram completamente englobados pela estrutura dos LBDs a eles associados implica que deve haver rearranjos conformacionais significativos associados a sua entrada e saída. No entanto, os mecanismos moleculares envolvidos em ambos os processos são ainda desconhecidos. Este trabalho utilizou duas técnicas de simulação para explorar os possíveis mecanismos de dissociação do hormônio tireoideano de seu receptor. Estes são, até onde sabemos, os primeiros estudos sistemáticos destes mecanismos para a família dos receptores do hormônio tireoideano.

### **Caminhos de dissociação**

As simulações com DMAA reconheceram três caminhos para a dissociação do hormônio natural T3 do receptor TR- $\alpha$ 1. O Caminho I é uma variação do caminho “ratoeira” deduzido da comparação das estruturas dos receptores do ácido retinóico associadas e dissociadas de seus ligantes. Este mecanismo envolve a separação da hélice 12 do corpo da proteína e o escape do ligante através da base do LBD entre as hélices 3 e 11. O Caminho II não tinha sido ainda previsto nem pela análise das estruturas cristalográficas, nem por simulações computacionais e envolve a separação das hélices 8 e 11 e o escape do ligante entre estas hélices e o  $\Omega$ -loop. Finalmente, o Caminho III envolve a formação da cavidade no loop entre as hélices 1 e 2 e o escape do ligante através deste loop, do grampo- $\beta$  e da hélice 3. Este região já tinha sido sugerida para a entrada do ligante por Fletterick

e colaboradores pela análise da estrutura protéica estática [19]. Dos três caminhos identificados nestas simulações, dois deles (Caminhos II e III) também foram identificados como possíveis caminhos de dissociação a partir do receptor TR- $\beta$ 1 e outros dois (Caminhos I e III) já tinham sido identificados para a dissociação do ácido retinóico de seu receptor [40, 41]. Desta forma, as evidências combinadas das simulações neste trabalho e das simulações já realizadas para os receptores do ácido retinóico sugerem que alguns destes mecanismos podem ser gerais para a superfamília dos receptores nucleares e que, em particular, o Caminho III aparece freqüentemente.

As simulações com DMAA geralmente encontram diversos caminhos possíveis, mas não são capazes de definir sua importância relativa. Mesmo com o auxílio das simulações com DMCI, ainda é necessário realizar novos estudos para definir quais destes mecanismos são de fato importantes em sistemas reais. É interessante, no entanto, analisar alguns resultados prévios em vista dos mecanismos aqui obtidos. A dissociação ao longo do Caminho III envolve uma região do receptor que é relativamente desordenada nas estruturas cristalográficas, como pode ser inferido da análise dos fatores de temperatura. Recentemente, estruturas cristalográficas de mutantes do receptor TR $\beta$ 1 provenientes de pacientes com Síndrome de Resistência ao Hormônio Tireoideano (RTH) revelaram diferenças modestas de estrutura, a não ser pelo aumento significativo da desordem na região entre as hélices 1 e 3. Cada uma destas mutações se caracteriza pelo aumento da constante de dissociação sem uma modificação significativa na constante de associação (Cunha-Lima *et al.*, resultados não publicados). Portanto, é interessante especular que as mutações associadas à RTH podem facilitar a dissociação pelo Caminho III por aumentar a instabilidade da região entre as hélices 1 e 3.

É possível que mais de um mecanismo de dissociação exista *in vivo* e que diferentes modos de dissociação prevaleçam em condições diferentes. A modificação na posição da hélice 12 é a maior alteração estrutural conhecida associada à ligação dos hormônios e é muito provável que esta alteração regule a associação do ligante em alguns contextos. Sabe-se, por exemplo, que a remoção de parte desta hélice aumenta a velocidade de dissociação, provavelmente por um mecanismo semelhante ao Caminho I. Por outro lado, resultados recentes indicam que mutações próximas à hélice 8 aumentam a constante de dissociação, sem aumentar

Caminho	Força máxima por barreira / kcal mol <sup>-1</sup> Å <sup>-1</sup>	
	Barreira 1	Barreira 2
I	21,5	16,2
II	22,3	16,7
III	13,3	11,6

Tabela 7.1. Forças máximas associadas às principais barreiras encontradas ao longo dos três caminhos de dissociação.

a velocidade de associação, provavelmente reduzindo a estabilidade desta região (Togashi *et al.*, resultados não publicados). Provavelmente estas mutações aumentam a probabilidade de dissociação ao longo de um caminho semelhante ao Caminho II. Novamente, é interessante lembrar que os Caminhos I e II envolvem a desestabilização do LBD pela perda de vários contatos hidrofóbicos que devem ser estabilizados em solução aquosa, enquanto que o Caminho III envolve a perda, sem maiores barreiras, de diversas interações hidrofílicas.

Uma melhor imagem das possíveis mutações que podem ser feitas para a confirmação destes mecanismos é obtida das simulações usando DMCI. Estas simulações podem dar indícios da preferência de um ou outro mecanismo de dissociação e são caminhos cuja reversibilidade é melhor compreendida, já que são sucessões de configurações razoavelmente estáveis com potenciais completos. Uma análise comparativa dos perfis das forças em função do tempo de simulação para os três caminhos está apresentada na Tabela 7.1. Uma primeira comparação das forças associadas às principais barreiras de dissociação logo indica que o Caminho III de dissociação deve ser preferencial. A maior das duas barreiras, neste caminho, é menor que a menor barreira nos outros dois. Já os caminhos I e II são muito semelhantes nesse sentido, não mostrando nenhuma preferência. As menores barreiras neste caminho estão associadas à saída do grupo hidrofílico em direção à solução aquosa e, provavelmente, à maior mobilidade desta região da proteína em relação às regiões envolvidas nos caminhos I e II. Como já foi discutido, a mobilidade desta região já tinha sido reconhecida pelos fatores de temperatura em estruturas cristalográficas e mutações associadas à RTH aumentam significativamente a desordem e as constantes de dissociação.

Todos os indícios apontam, portanto, para que o Caminho III seja o principal

caminho de dissociação. Este caminho condiz com a dissociação do hormônio em escalas de tempo diferentes da dissociação dos coativadores, problema que já foi reconhecido para caminhos semelhantes ao Caminho I.

### **Especulações sobre a associação do hormônio**

Os estudos aqui apresentados não procuram nenhum caminho de associação. Apesar disso, é interessante especular que estes mecanismos podem ser reversíveis e representar potenciais caminhos de associação. As barreiras que representam impedimentos nos processos de dissociação não necessariamente representam barreiras para a associação do ligante. Um primeiro aspecto que deve ser notado é que a maior parte dos aminoácidos que formam contatos diretos como o hormônio se encontram no interior da proteína. O ligante certamente tem de interagir com aminoácidos mais superficiais antes da sua entrada na cavidade hidrofóbica.

Neste sentido, o Caminho II é o mais promissor. Nas etapas finais da dissociação, o hormônio teve que romper uma série de interações hidrofílicas que não estão presentes no sítio ativo, mas que estão associadas a aminoácidos mais próximos da superfície da proteína (Figuras 6.9 em 150 ps e 6.14 (f)). Estas interações hidrofílicas representam uma barreira importante para a dissociação do hormônio, mas podem ser responsáveis pela sua captura da solução e pelo início do processo de associação. É interessante notar também que, embora as duas principais barreiras ocorram de forma bastante independente no tempo, a troca das interações hidrofílicas iniciais pelas da segunda cavidade é contínua, já que se inicia pela substituição da interação hidrofóbica T3-F218 por uma interação hidrofílica entre o hormônio e este mesmo aminoácido.

Os Caminhos I e III, por outro lado, não possuem estados de transição que indiquem um caminho de associação. Por exemplo, a barreira final para a dissociação ao longo do Caminho I é a perda de ligações de hidrogênio do carboxilato do hormônio com a Arg 228, que é uma das interações importantes no sítio ativo. A cadeia lateral deste aminoácido é, inclusive, arrastada pelo hormônio na direção contrária à solução aquosa, tendo que entrar na cavidade hidrofóbica. Em seguida, a Arg 228 retrocede a sua posição inicial e passa a interagir com a água no exterior da proteína, da mesma forma que o faz no Caminho III (Figura 6.7 (d)). Não é

---

provável que esta cadeia lateral possa atingir a conformação deste último estado de transição em um mecanismo de associação, uma vez que isto implicaria na perda de inúmeras interações hidrofílicas com moléculas de água. No entanto, o corte da hélice H12 também aumenta a velocidade de associação do ligante. Desta forma, o mecanismo “ratoeira” provavelmente representa um mecanismo de entrada realista em algumas circunstâncias, sugerindo que o hormônio poderia entrar no LBD em um caminho semelhante ao Caminho I e sair dele por um mecanismo semelhante ao Caminho III, especialmente nos receptores com mutações associadas à RTH.

O Caminho III, por sua vez, é menos provável como caminho de associação porque o corpo hidrofóbico do hormônio teria que atravessar a extremidade hidrofílica da cavidade de ligação. Isto não representaria problema maior que a passagem da extremidade polar do hormônio pela cavidade hidrofóbica da proteína, a não ser porque não foi possível visualizar interações capazes de atrair o hormônio para dentro da cavidade. Nos Caminhos I e II estas podem ser as diversas interações eletrostáticas entre a extremidade polar do hormônio e diversos resíduos da proteína. Além disso, seria muito mais natural que o hormônio se aproximasse da superfície da proteína ao longo do Caminho III na posição inversa, isto é, com o carboxilato interagindo com os aminoácidos hidrofílicos. Isto levaria a uma associação na qual o ligante estaria na posição contrária da que apresenta naturalmente e, portanto, não é realista.

Finalmente, nossos resultados ressaltam regiões do LBD que são flexíveis. Estes resultados podem ter aplicações para o desenho de antagonistas. Diversos antagonistas dos TRs foram desenvolvidos racionalmente pela adição de extensões na posição 5' [30]. Foi sugerido que estas extensões interferem no *loop* entre as hélices 11 e 12, inibindo a associação do coativador pelo posicionamento incorreto da hélice 12. No entanto, alguns compostos com grandes extensões na posição 5' se comportam como agonistas com afinidades relativamente altas. Uma vez que a posição 5' se projeta em direção à região de contato entre as hélices 8 e 11 em algumas estruturas cristalográficas, a mobilidade desta região observada no Caminho II pode explicar a capacidade do LBD de acomodar estes ligantes sem distorcer o restante da estrutura.

## Perspectivas

Os resultados obtidos com DMCI, que estão parcialmente justificados pelas simulações com DMAA, permitem a projeção de diversas mutações sítio-dirigidas que podem ser estudadas tanto do ponto de vista computacional como do ponto de vista experimental. Baxter e colaboradores vêm desenvolvendo um estudo sistemático das diversas mutações comuns em pacientes com RTH, que vêm mostrando que as baixas afinidades dos receptores mutantes devem estar associadas ao aumento da velocidade de dissociação por um ou outro caminho. As simulações aqui apresentadas já permitiram especular qualitativamente o papel destas mutações, que em geral estão associadas à região que envolve o Caminho III. O estudo sistemático por DMCI das diversas mutações que vêm sendo pesquisadas experimentalmente deve gerar informações estruturais precisas e ser de grande valia para a compreensão dos mecanismos moleculares por trás da RTH. Com algumas adaptações, é possível que a técnica DMCI permita também o estudo da associação dos hormônios.

Outro problema interessante é a obtenção das constantes de dissociação do hormônio do receptor nativo ou de mutantes a partir das simulações computacionais. Desenvolvimentos teóricos recentes permitiram o estabelecimento da teoria necessária para computar as energias livres de processos induzidos por forças externas, como é o caso das simulações com DMCI [70, 71]. Não existem resultados computacionais da aplicação destas técnicas para complexos entre ligantes e proteínas, mas sua aplicação permitirá comparar as simulações diretamente com resultados experimentais e, ainda, deduzir quais caminhos de dissociação devem ser mais ou menos importantes.

Um aspecto fundamental de qualquer trabalho computacional nesta área de conhecimento e, provavelmente, em outras áreas de interesse biológico e farmacológico, é a interação constante com grupos experimentais. O trabalho experimental é capaz de levantar inúmeros problemas que são acessíveis por uma ou outra técnica computacional e que são intratáveis por técnicas laboratoriais. Os problemas aqui abordados surgiram de forma natural em discussões com o professor Polikarpov e pela análise do ponto de vista da factibilidade das simulações. A análise dos resultados é constantemente enriquecida por essa interação e pela colaboração dos professores Paul Webb e John Baxter (UCSF). Hoje já temos diversos problemas

novos e perspectivas de trabalho para continuar aplicando estas e outras técnicas computacionais para iluminar a complexidade da atividade e da dinâmica desta família de proteínas.

## Apêndice A

# Outras interações do T3 observadas com DMCI

Os perfis das interações mais importantes entre o ligante T3 e as outras espécies nas simulações com DMCI já foram apresentados no Capítulo 6. No entanto, como foi descrito na Seção 4.3, foram computadas as interações de todos os aminoácidos ou moléculas de água que em algum momento das simulações estiveram a uma distância menor que 4,0 Å de algum sítio do hormônio. Foram consideradas importantes as interações que excederam em módulo, em algum momento da simulação, 10 kcal mol<sup>-1</sup> Å<sup>-1</sup>. Para as moléculas de água, no entanto, muitas destas interações ocorreram após a saída do ligante do LBD, de forma que não foram consideradas nas discussões do Capítulo 6. Neste apêndice mostram-se os perfis das interações de todos os outros aminoácidos que estiveram a menos de 4 Å do hormônio e de todas as moléculas de água que apresentaram interações maiores que 10 kcal mol<sup>-1</sup> Å<sup>-1</sup> em algum momento da simulação, de forma que a desconsideração eventual de alguma interação possa ser corrigida pelo observador mais atento.

## Interações ao longo do Caminho I

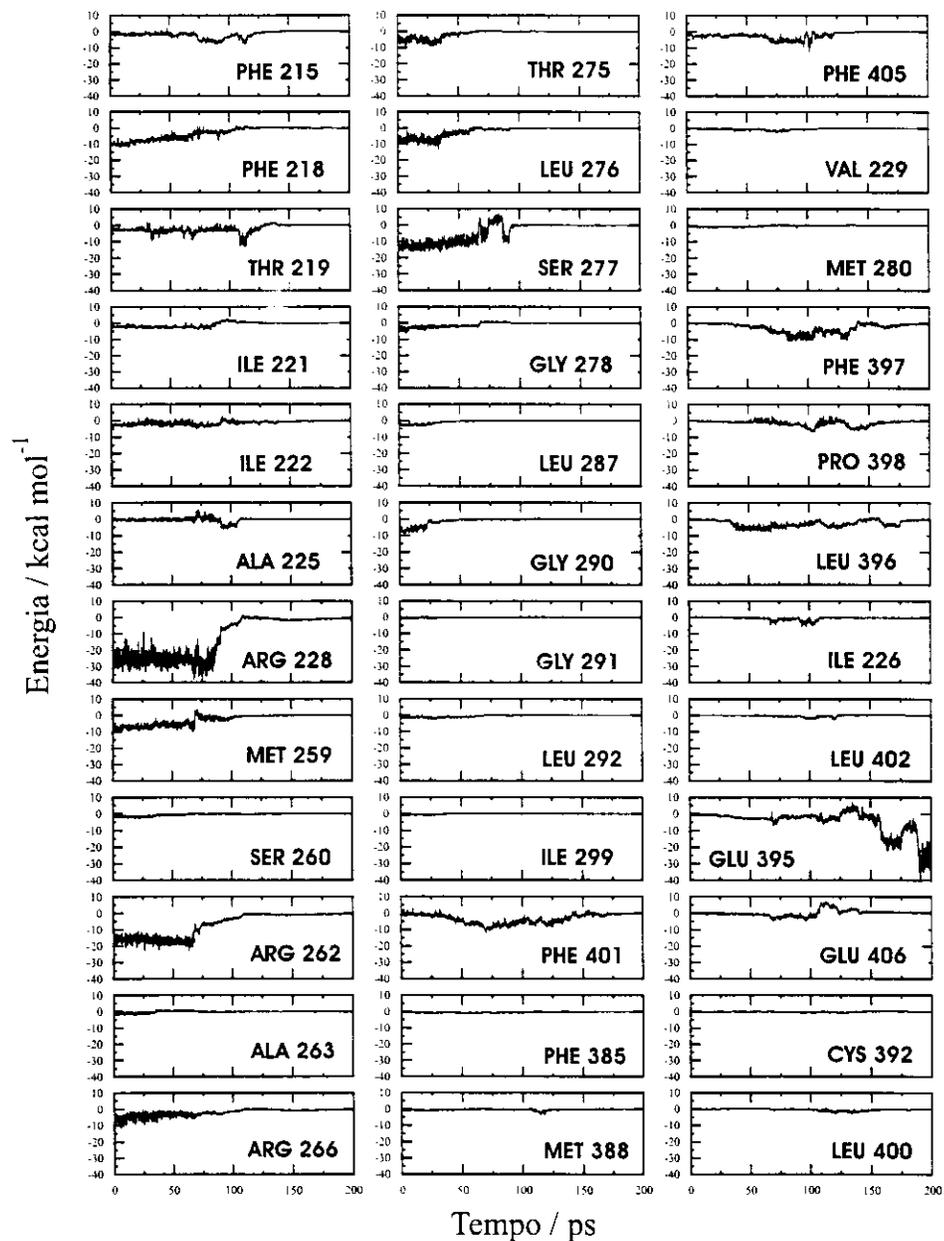


Figura A.1. Variação da energia das interações entre o ligante T3 e os aminoácidos ao longo do Caminho I.

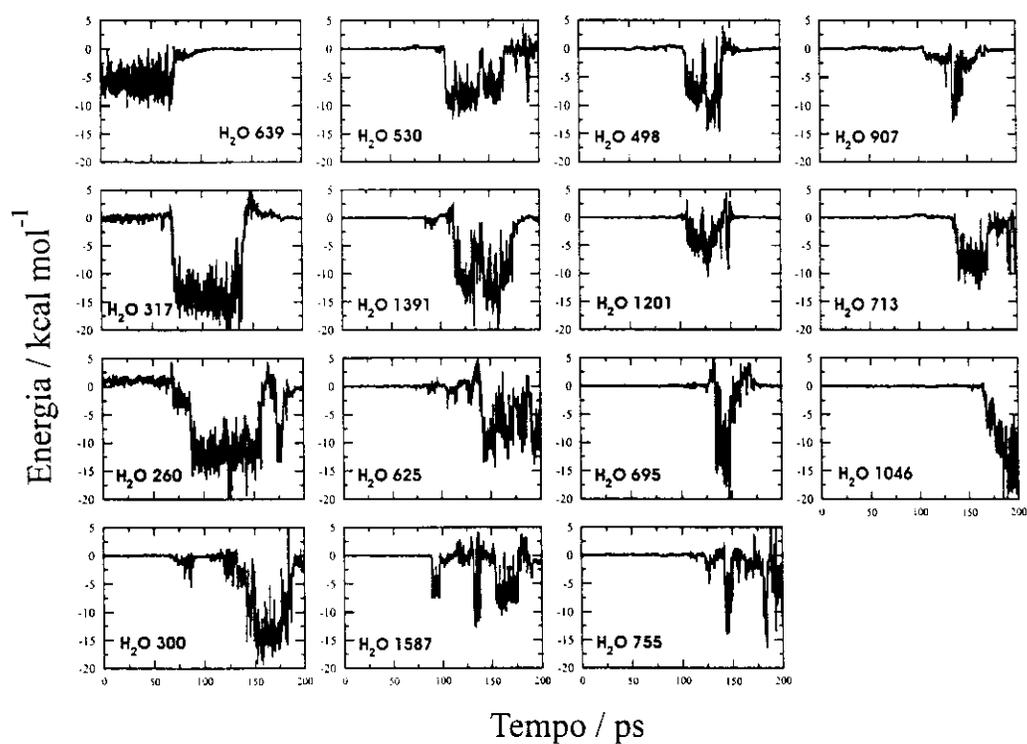


Figura A.2. Energia das interações entre moléculas de água e o ligante T3 ao longo do Caminho I.

## Interações ao longo do Caminho II

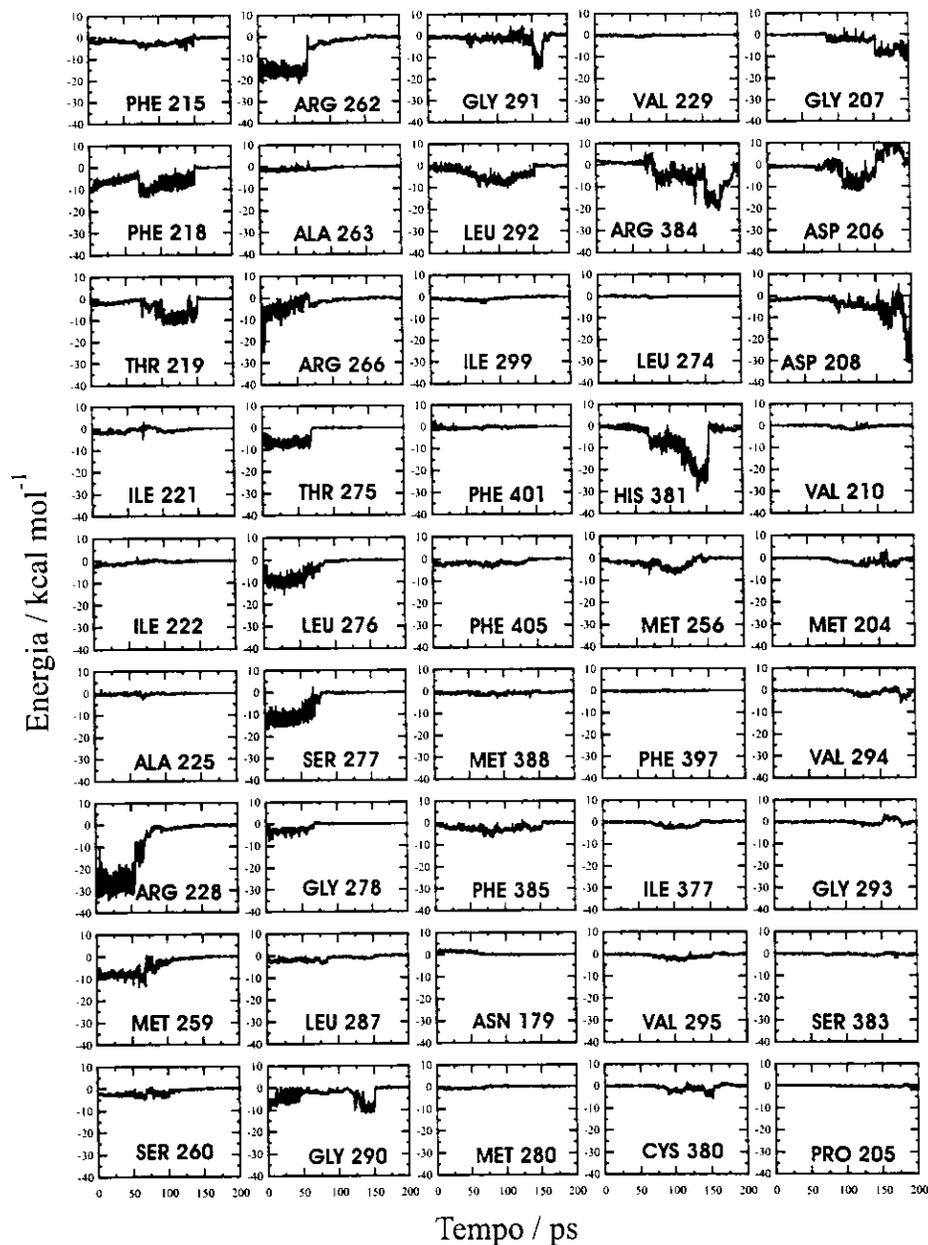


Figura A.3. Energia das interações entre o ligante T3 e os aminoácidos ao longo do Caminho II.

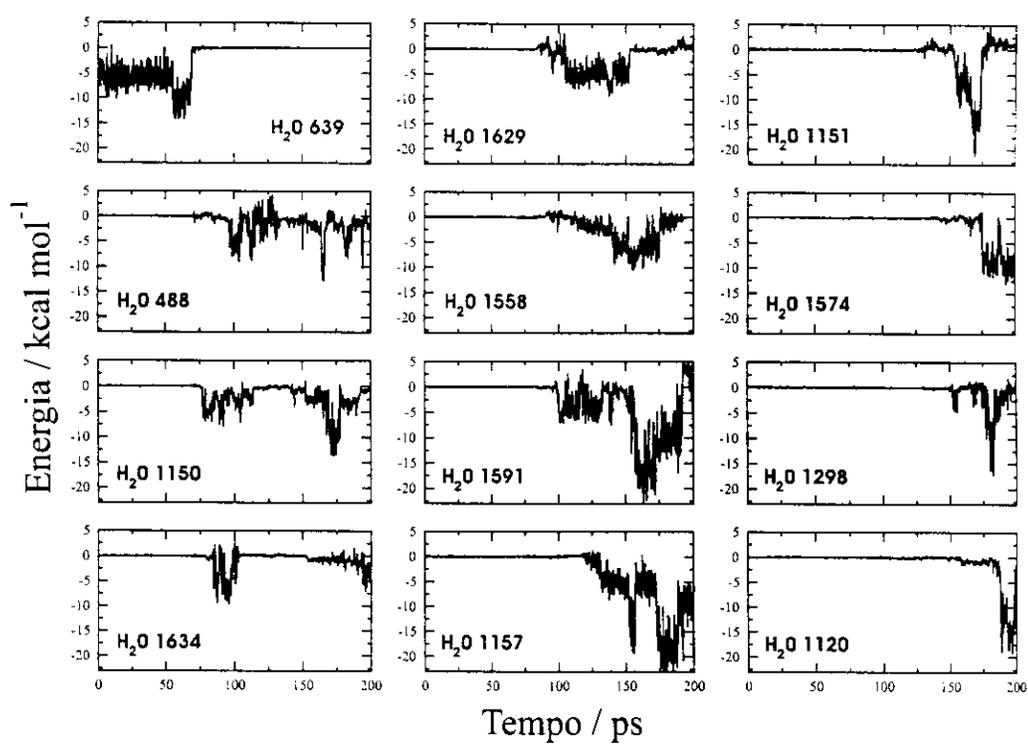


Figura A.4. Energia das interações entre moléculas de água e o ligante T3 ao longo do Caminho II.

## Interações ao longo do Caminho III

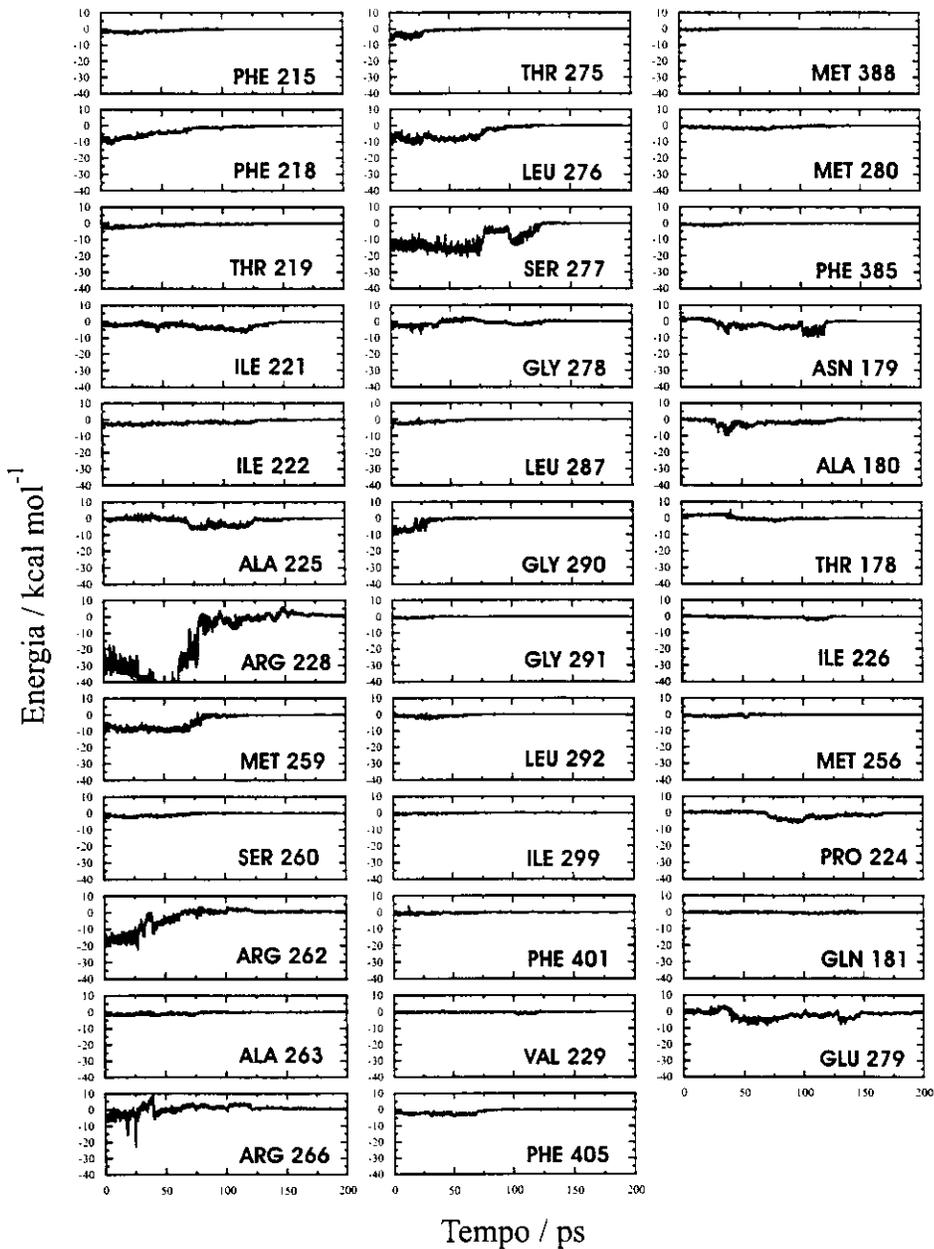


Figura A.5. Energia das interações entre o ligante T3 e os aminoácidos ao longo do Caminho III.

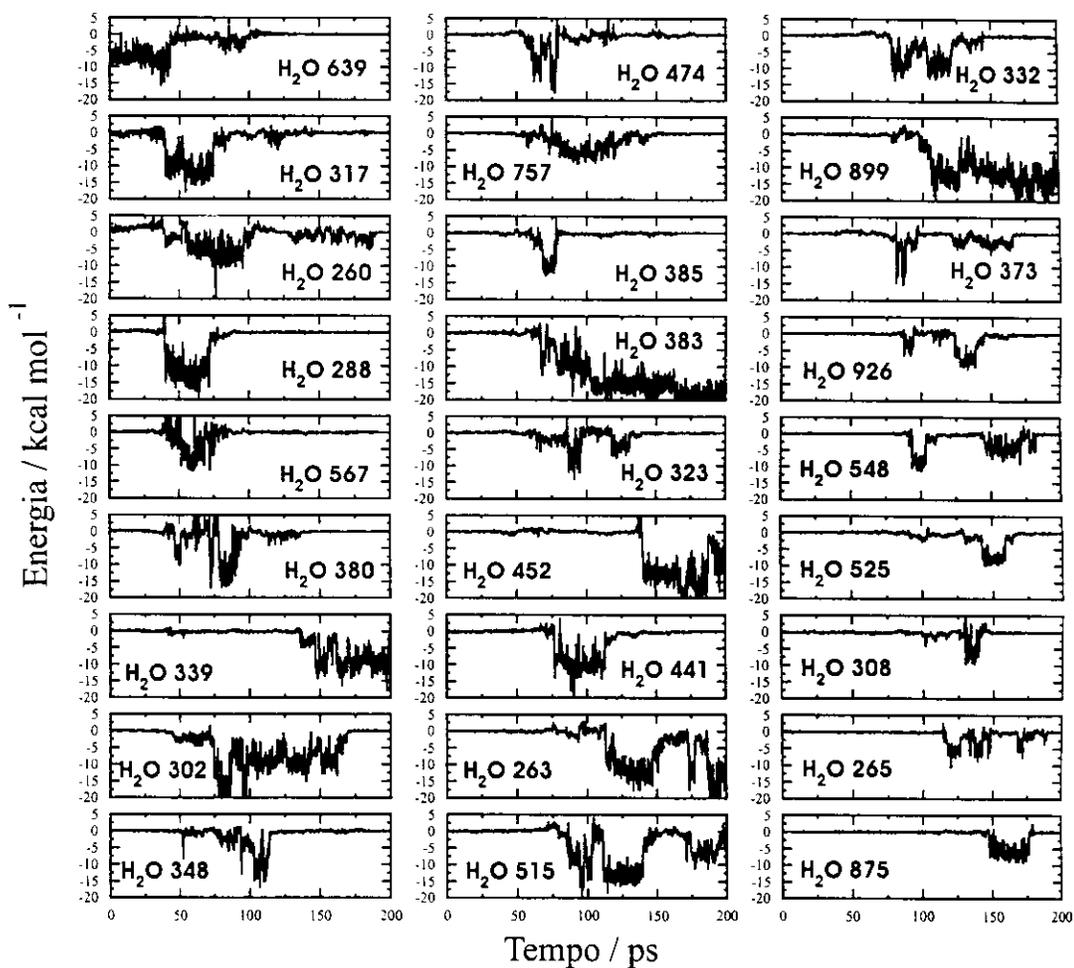


Figura A.6. Energia das interações entre moléculas de água e o ligante T3 ao longo do Caminho III.

## Apêndice B

# Packmol

Durante o projeto, foi desenvolvido, em colaboração com o professor José Mario Martínez (IMECC-UNICAMP) um pacote computacional para a geração de configurações iniciais para dinâmica molecular, denominado Packmol [64]. De forma resumida, a estratégia para gerar as configurações iniciais consiste em empacotar as moléculas em uma determinada região do espaço garantindo que nenhum átomo de moléculas diferentes esteja a uma distância menor que uma tolerância desejada. Esta condição garante que não há, no início da simulação, nenhum potencial demasiadamente repulsivo que possa causar um colapso da caixa de simulação.

A estratégia utilizada para o empacotamento foi a definição de uma função objetivo nula sempre que os pares de átomos de moléculas diferentes estão a uma distância maior que a tolerância desejada  $d_{tol}$  e que cresce quadraticamente à medida que os átomos se aproximam, se estão a uma distância menor que  $d_{tol}$ . Desta forma, como esta função é nula na solução do problema (isto é, se não há nenhum par de átomos mais próximo que a tolerância desejada) e positiva em qualquer outra situação, pode-se buscar as soluções minimizando a função objetivo, sendo o reconhecimento da solução trivial. A função objetivo definida dessa forma é minimizada utilizando um algoritmo de otimização bem estabelecido (BOX-QUACAN), desenvolvido pelo grupo do Prof. José Mario Martínez [72–74] com algumas heurísticas adaptadas ao problema. O pacote foi programado de forma a ser compatível com os arquivos de entrada do programa Tinker e com arquivos de coordenadas genéricos (formato Molden). Diferentes tipos de moléculas podem ser colocados em diferentes regiões do espaço, assim como é possível manter fixas algumas moléculas.

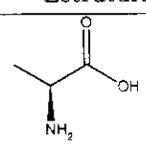
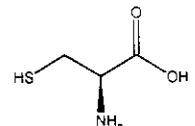
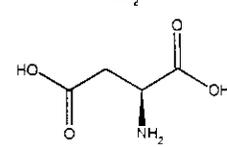
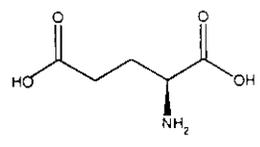
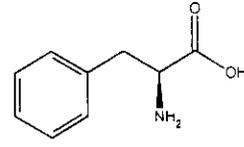
las. Estes recursos permitem a geração de interfaces líquidas, zeólitas hidratadas, proteínas solvatadas, por exemplo. O programa está sendo usado com frequência pelo grupo de dinâmica molecular do Prof. Munir S. Skaf.

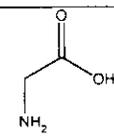
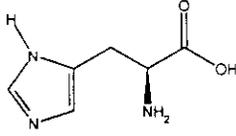
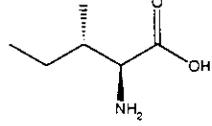
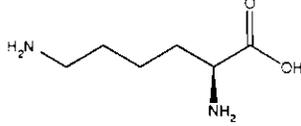
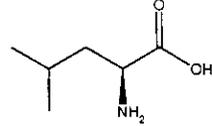
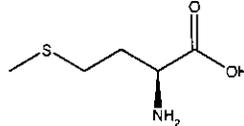
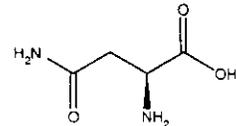
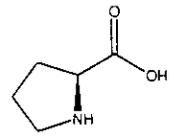
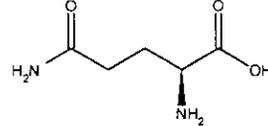
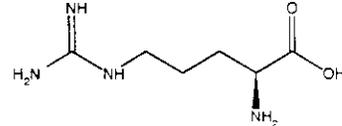
O trabalho que descreve com detalhes o método e suas aplicações foi publicado na revista *Journal of Computational Chemistry* em Maio de 2003 [64]. O pacote *Packmol* é de domínio público e pode ser obtido, com instruções de uso, na página <http://www.ime.unicamp.br/~martinez/packmol>

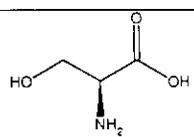
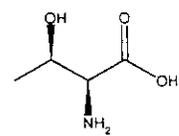
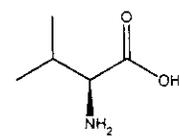
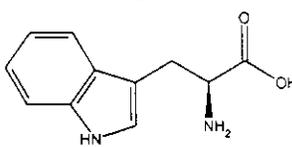
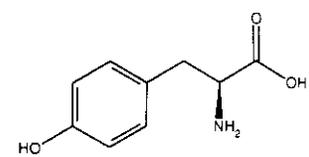
## Apêndice C

# Nomenclatura e estrutura dos aminoácidos

A compreensão das discussões neste trabalho requer o conhecimento das nomenclaturas utilizadas para os aminoácidos, assim como suas estruturas. Este apêndice pretende ser uma base para uma consulta frequente durante a leitura do texto. Em seguida, então, listam-se todos os aminoácidos naturais, as abreviações de 3 letras e 1 letra usadas e suas estruturas.

Aminoácido	Abrev. de 3 letras	Abrev. de 1 letra	Estrutura
Alanina	Ala	A	
Cisteína	Cys	C	
Ácido Aspártico	Asp	D	
Ácido Glutâmico	Glu	E	
Fenilalanina	Phe	F	

Aminoácido	Abrev. de 3 letras	Abrev. de 1 letra	Estrutura
Glicina	Gly	G	
Histidina	His	H	
Isoleucina	Ile	I	
Lisina	Lys	K	
Leucina	Leu	L	
Metionina	Met	M	
Asparagina	Asn	N	
Prolina	Pro	P	
Glutamina	Gln	Q	
Arginina	Arg	R	

Aminoácido	Abrev. de 3 letras	Abrev. de 1 letra	Estrutura
Serina	Ser	S	
Treonina	Thr	T	
Valina	Val	V	
Triptofano	Trp	W	
Tirosina	Tyr	Y	

## Referências

- [1] R. C. J. Ribeiro et al. The nuclear hormone receptor gene superfamily. *Ann. Rev. Med.*, 46:443–453, 1995.
- [2] R. Kumar and E. B. Thompson. The structure of the nuclear hormone receptors. *Steroids*, 64:310–319, 1999.
- [3] J. W. Apriletti et al. Molecular and structural biology of thyroid hormone receptors. *Clinic. Exper. Pharm. Phys.*, 25:S2–S11, 1998.
- [4] P. Chambon. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J.*, 10:940–954, 1996.
- [5] J. P. Renaud and D. Moras. Structural studies on nuclear receptors. *CMLS Cell. Mol. Life Sci.*, 57:1748–1769, 2000.
- [6] D. Voet, J. G. Voet, and C. W. Pratt. *Fundamentals of Biochemistry*. John Wiley & Sons, Inc., 1999.
- [7] J. M. González-Sancho et al. Thyroid hormone receptors/THR genes in human cancer. *Cancer Lett.*, 192:121–132, 2003.
- [8] M. J. Schlesinger. Heat Shock Proteins. *J. Biol. Chem.*, 295:12111–12114, 1990.
- [9] W. B. Pratt. The role of heat shock proteins in regulating the function, folding, and trafficking of the glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.*, 268: 21455–21458, 1993.

- [10] S. A. Kliewer, M. J. Lehmann, and T. M. Willson. Orphan nuclear receptors: shifting endocrinology into reverse. *Science*, 284:757–760, 1999.
- [11] Z. Wang et al. Structure and function of Nurr1 identifies a class of ligand-independent nuclear receptors. *Nature*, 423:555–560, 2003.
- [12] N. Nguyen et al. Rational design and synthesis of a novel thyroid hormone antagonist that blocks coactivator recruitment. *J. Med. Chem.*, 45:3310–3320, 2002.
- [13] R. L. Wagner et al. Hormone selectivity in thyroid hormone receptors. *Mol. Endocr.*, 15:398–410, 2001.
- [14] 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.
- [15] S. M. Holmbeck et al. High-resolution solution structure of the retinoid X receptor DNA-binding domain. *J. Mol. Biol.*, 281:271–284, 1998.
- [16] 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.
- [17] W. Bourget et al. Crystal structure of the ligand-binding domain fo the human nuclear receptor RXR- $\alpha$ . *Nature*, 375:377–382, 1995.
- [18] 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.
- [19] R. L. Wagner et al. A structural role for hormone in the thyroid hormone receptor. *Nature*, 378:690–697, 1995.
- [20] S. P. Williams and P. B. Sigler. Atomic structure of progesterone complexed with its receptor. *Nature*, 393:392–396, 1998.
- [21] A. C. U. Steinmetz, J-P Renaud, and D. Moras. Binding of ligands and activation of transcription by nuclear receptors. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 30:329–359, 2001.

- [22] R. C. J. Ribeiro et al. X-ray crystallographic and functional studies of thyroid hormone receptor. *J. Steroid. Biochem.*, 65:133–141, 1998.
- [23] D. M. Tanenbaum et al. Crystallographic comparison of the estrogen and progesterone receptor's ligand binding domains. *Proc. Natl. Acc. Sci. USA*, 95:5998–6003, 1998.
- [24] W. Bourget et al. Crystal structure of a heterodimeric complex of RAR and RXR ligand-binding domains. *Mol. Cell*, 5:289–298, 2000.
- [25] R. V. Weatherman, R. J. Fletterick, and T. S. Scanlan. Nuclear-receptor ligands and ligand-binding domains. *Annu. Rev. Biochem.*, 68:559–581, 1999.
- [26] M. A. Lazar. Editorial: A sweetheart deal for thyroid hormone. *Endocrinology*, 141:3055–3056, 2000.
- [27] 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.
- [28] T. Takeda et al. Triiodothyroacetic acid has unique potential for therapy of resistance to thyroid hormone. *J. Clin. End. Met.*, 80:2033–2040, 1995.
- [29] G. Chiellini et al. A high-affinity subtype-selective agonist ligand for the thyroid hormone receptor. *Chemistry & Biology*, 5:299–306, 1998.
- [30] J. D. Baxter et al. Structure-based design and synthesis of a thyroid hormone receptor (TR) antagonist. *Endocrinology*, 143:517–524, 2002.
- [31] W. Lim et al. A thyroid hormone antagonist that inhibits thyroid hormone action *in vivo*. *J. Biol. Chem.*, 277:35664–35670, 2002.
- [32] A. M. Brzozowski et al. Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature*, 389:753–758, 1997.
- [33] 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.

- [34] P. Webb et al. Design of thyroid hormone receptor antagonists from first principles. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 83:59–73, 2003.
- [35] A. Caffisch and M. Karplus. Acid and thermal denaturation of Barnase investigated by molecular dynamics simulations. *J. Mol. Biol.*, 252:672–708, 1995.
- [36] T. E. Creighton. Protein folding. *Biochem. J.*, 270:1–16, 1990.
- [37] R. Jaenicke. Protein folding: local structures, domains, subunits, and assemblies. *Biochemistry*, 30:3147–3161. 1991.
- [38] S. Ringhofer et al. X-ray structure and conformational dynamics of the HIV-1 protease in complex with the inhibitor SDZ283-910: Agreement of time-resolved spectroscopy and molecular dynamics simulations. *J. Mol. Biol.*, 286:1147–1159, 1999.
- [39] K. Wong et al. Towards a complete description of the structural and dynamic properties of the denatured state of barnase and the role of residual structure in folding. *J. Mol. Biol.*, 296:1257–1282, 2000.
- [40] 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.
- [41] 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.
- [42] D. Frenkel and B. Smit. *Understanding Molecular Simulations*. Academic Press, 2001.
- [43] T. E. Cheatham and B. R. Brooks. Recent advances in molecular dynamics simulation towards the realistic representation of biomolecules in solution. *Theor. Chem. Acc.*, 99:279–288, 1998.

- [44] W. F. van Gunsteren, P. K. Weiner, and A. J. Wilkinson. *Computer Simulation of Biomolecular Systems, vol 1-3*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht,, 1997.
- [45] B. R. Brooks et al. Charmm - a program for macromolecular energy, minimization and dynamics calculations. *J. Comput. Chem.*, 4:187–217, 1983.
- [46] W. L. Jorgensen and N. A. McDonald. Development of an all-atom force field for heterocycles. Properties of liquid pyridine and diazenes. *THEOCHEM-J. Mol. Struct.*, 424:145–155, 1998.
- [47] D. A. Pearlman et al. Amber, a package of computer-programs for applying molecular mechanics, normal-mode analysis, molecular-dynamics and free-energy calculations to simulate the structural and energetic properties of molecules. *Comput. Phys. Comm.*, 91:1–41, 1995.
- [48] 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.
- [49] B. Isralewitz, M. Gao, and K. Schulten. Steered molecular dynamics and mechanical functions of proteins. *Curr. Op. Struct. Biol.*, 11:224–230, 2001.
- [50] 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.
- [51] J. W. Ponder. *TINKER Software Tools for Molecular Design*. Version 3.8, Oct., 2000.
- [52] A. Sali and T. L. Blundell. Comparative protein modeling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.*, 234:779–815, 1993.
- [53] D. C. Liu and J. Nocedal. On the limited memory BFGS method for large-scale optimization. *Math. Prog.*, 45:503–528, 1989.
- [54] 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.

- [55] N. A. McDonald and W. L. Jorgensen. Development of an all-atom force field for heterocycles. properties of liquid pyrrole, furan, diazoles, and oxazoles. *J. Phys. Chem. B*, 102:8049–8059, 1998.
- [56] D. S. Maxwell, J. Tirado-Rives, and W. L. Jorgensen. A comprehensive study of the rotational energy profiles of organic systems by *ab-initio* MO theory, forming a basis for peptide torsional parameters. *J. Comput. Chem.*, 16:984–1010, 1995.
- [57] 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.
- [58] H. C. Andersen. Rattle: A ‘velocity’ version of the shake algorithm for molecular dynamics calculations. *J. Comput. Phys.*, 52:24–34, 1983.
- [59] M. J. Frisch et al. *Gaussian 98 (Revision A.10)*. Gaussian Inc., Pittsburgh PA, 2001.
- [60] Laboratório de Robert Fletterick em <http://www.msg.ucsf.edu/flett/>.
- [61] R. L. Wagner et al. Structure and specificity of nuclear receptor: Coactivator interactions. *Genes Dev.*, 12:3343–3356, 1998.
- [62] J. M. Blaney et al. Molecular mechanics simulation of protein-ligand interactions: Binding of Thyroid Hormone analogues to prealbumin. *J. Am. Chem. Soc.*, 104:6424–6434, 1982.
- [63] D. Beeman. Some multistep methods for use in molecular dynamics calculations. *J. Comput. Phys.*, 20:130–139, 1976.
- [64] 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.
- [65] M. S. Balsera et al. Reconstructing potential energy functions from simulated force-induced unbinding processes. *Biophys. J.*, 73:1281–1287, 1997.

- 
- [66] B. Izrailev et al. Molecular dynamics study of unbinding of the avidin-biotin complex. *Biophys. J.*, 72:2972–2979, 1997.
- [67] A. Varshney, F. P. Brooks, and M. V. Wright. Computing smooth molecular-surfaces. *IEEE Comput. Graph. Appl.*, 14:19–25, 1994.
- [68] W. Humphrey, A. Dalke, and K. Schulten. VMD: Visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.*, 14:33–42, 1996.
- [69] S. Fischer and M. Karplus. Conjugate peak refinement: an algorithm for finding reaction paths and accurate transition-states in systems with many degrees of freedom. *Chem. Phys. Lett.*, 194:252–261, 1992.
- [70] G. Hummer and A. Szabo. Free energy reconstruction from nonequilibrium single-molecule pulling experiments. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 98:3658–3661, 2001.
- [71] C. Jarzynski. Nonequilibrium equality for free energy differences. *Phys. Rev. Lett.*, 78:2690–2693, 1997.
- [72] A. Friedlander, J. M. Martínez, and S. A. Santos. A new trust region algorithm for bound constrained minimization. *Appl. Math. and Optim.*, 30:235–266, 1994.
- [73] N. Krejić et al. Validation of an augmented lagrangian algorithm with a Gauss-Newton hessian approximation using a set of hard-spheres problems. *Comput. Optim. and Appl.*, 16:247–263, 2000.
- [74] J. M. Martínez. BOX-QUACAN and the implementation of augmented lagrangian algorithms for minimization with inequality constraints. *Comput. and Appl. Math.*, 19:31–56, 2000.