



PAULO CESAR TELLES DE SOUZA

**MODELAGEM MOLECULAR DE
RECEPTORES NUCLEARES: ESTRUTURA,
DINÂMICA E INTERAÇÃO COM LIGANTES**

CAMPINAS

2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA

PAULO CESAR TELLES DE SOUZA

MODELAGEM MOLECULAR DE RECEPTORES NUCLEARES:
ESTRUTURA, DINÂMICA E INTERAÇÃO COM LIGANTES

ORIENTADOR: PROF. DR. MUNIR SALOMÃO SKAF

TESE DE DOUTORADO APRESENTADA AO
INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP PARA
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM CIÊNCIAS.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA POR PAULO
CESAR TELLES DE SOUZA, E ORIENTADA PELO PROF. DR. MUNIR SALOMÃO SKAF.

ASSINATURA DO ORIENTADOR

CAMPINAS
2013

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR SIMONE LUCAS - CRB8/8144 -
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP**

Souza, Paulo Cesar Telles de (1982-).
So89m Modelagem molecular de receptores nucleares:
estrutura, dinâmica e interação com ligantes / Paulo
Cesar Telles de Souza. – Campinas, SP: [s.n], 2013.

Orientador: Munir Salomão Skaf

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

1. Dinâmica Molecular. 2. Proteínas. 3. Receptor
nuclear. 4. Hormônio tireoideano. 5. Hormônio
estrogênio. I. Skaf, Munir Salomão. II. Universidade
Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Molecular modeling of nuclear receptors: structure, dynamics and interaction with ligands

Palavras-chave em inglês:

Molecular dynamics

Protein

Nuclear receptor

Thyroid hormone

Estrogen Hormone

Área de concentração: Físico-Química

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora:

Munir Salomão Skaf [Orientador]

Pedro Geraldo Pascutti

Richard Charles Garratt

Carlos Henrique Inácio Ramos

Francisco Benedito Teixeira Pessine

Data da defesa: 06/02/2013

Programa de pós-graduação: Química

*The scientist is not a person who gives the right answers,
he is one who asks the right questions.
(Claude Lévi-Strauss)*

Agradecimentos

Apesar do autor de uma Tese de Doutorado ser apenas um, esse é o tipo trabalho que nunca é feito sozinho. Quando eu paro para pensar no grande número de pessoas que contribuíram com esta Tese, vejo que, na verdade, estas são as mesmas pessoas que me ajudaram a me amadurecer pessoal e profissionalmente ao longo dos anos.

Para mim, esta Tese de Doutorado representa o fim de uma dura etapa, que faz parte de uma jornada que começou na graduação, quando decidi que queria seguir a carreira acadêmica, mesmo sabendo das durezas que este caminho me levaria. Escolher a carreira acadêmica foi abdicar de muita coisa em minha vida por um período. Mas também foi a escolha de trabalhar com algo que gosto e admiro. Os agradecimentos nesta Tese, portanto, são às pessoas que possibilitaram a realização deste sonho.

- Entre tantas pessoas que contribuíram para este trabalho, gostaria de agradecer em primeiro lugar a meus pais por todo apoio irrestrito que me foi dado durante todos esses anos que estou aqui em Campinas. Sei da dificuldade que foi vir e me manter nesta universidade, além de todos os sacrifícios que fizeram. Espero poder retribuir e resgatar todo esse tempo longe de vocês.
- Quero agradecer aqui à minha avó Jovina, que me ajudou no período do vestibular e por quase um ano de graduação. Também agradeço a minha avó Odete, por sua alegria e carinho, e ao restante da família.
- Agradeço ao Munir, por ter me dado a oportunidade de aprender a fazer ciência. Por toda a paciência e orientação ao longo de quase 8 anos. Aprendi e amadureci muito como cientista e como pessoa com Munir. Tive a oportunidade de acompanhar de perto um pesquisador e seu grupo de pesquisa crescerem. Tudo isso, graças à vontade e ousadia do Munir em buscar recursos, colaborações e projetos de pesquisa de ponta. Valeu chefe!

- Ao Leandro, meu co-orientador informal ao longo destes anos. Sua inteligência, esforço, vontade em ajudar e paciência são exemplo para mim.
- Aos membros do grupo. Aos que já não mais estão aqui (Milton, Carol, Mônica, Frank, Jorge, Karen, Lucas, Ary e Anders) e a todos do grupo atual (Denise, Tati, Ivana, Thiago, Rodrigo, Júlio, Clarisse, Melina, Susan, Érica e Henrique). Obrigado ao pessoal da “sala de baixo” pela companhia diária. Também agradeço todas as discussões científicas, ajuda e também colaborações que realizamos ao longo destes anos. Não teria aprendido metade do que sei se não fosse este grupo de trabalho tão agradável e competente.
- A todos funcionários do IQ, por todo apoio que me deram. Agradeço em especial ao pessoal da CPG, que sempre me explicou e ajudou em tudo que precisei.
- Aos professores com que tive aula na graduação e pós. Em especial agradeço à Regina Buffon, Ronaldo A. Pilli e Rogério Custódio, professores com quem aprendi muito dentro e fora da sala de aula.
- Ao IQ e à UNICAMP, que foram minha segunda casa ao longo destes 10 anos aqui em Campinas.
- Ao CNPQ e principalmente à FAPESP pelo apoio financeiro ao longo de tantos anos.
- Aos amigos que fiz em todo este tempo aqui em Campinas. Em especial, eu agradeço ao Daniel, Renato, Thiagão e César, grandes amigos com quem dividi as casas mais agradáveis em que já morei. Também agradeço a tantos amigos do curso de Química.
- Ao pessoal do Triu, por me permitir fazer parte de um belo projeto de educação. Agradeço ao Chicão, ao Gustavo e especialmente ao Cabé, pela amizade. Agradeço a todos os Professores de Química que passaram pelo Triu e que tive o prazer de orientar.
- Aos amigos do SENAI (Deco, Cado, Velho, Léo, Hamilton e Victor) e aos amigos de infância (Ricardo, Marcos, Luizinho, Gustavo e ao Dedé). Amigos

que espero guardar pela vida. Obrigado por sempre me fazerem lembrar o valor das eternas amizades.

- A todas pessoas que desenvolvem programas, produzem conhecimentos e os distribuem de graça.
- Aos membros da Banca Examinadora, por todos as correções e contribuições científicas a este trabalho.
- Ao pessoal do OGrupo de dança de salão da UNICAMP. Com vocês reaprendi a me divertir e fazer amizades. Obrigado por me apresentar meu hobby preferido.
- Agradeço às várias colaborações científicas que realizei ao longo destes anos: Alana R. Figueiredo, Alexandre F. Gomes e Fábio C. Gozzo do grupo Dalton de Espectrometria de Massas do IQ-UNICAMP; Douglas H. Pereira e Rogério Custódio do Grupo de Desenvolvimento e Aplicação de Métodos Computacionais em Química do IQ-UNICAMP; Fábio Passeti do INCA; Gustavo B. Barra e Francisco A. R. Neves da UnB; Maria I. Chiamolera e Rui M. B. Maciel da UNIFESP; Ana C. M. Figueira do LNBio; Ana C. Puhl, Amanda Bernarde e Igor Polikarpov do IFSC-USP; Gabriel Jara, Marcelo A. Martí, Dário A. Estrin e todo pessoal da UBA. Espero continuar contribuindo e aprendendo muito com vocês.
- Agradeço à Mariana, por aparecer na minha vida. Por seu amor, amizade e carinho. Agradeço também por toda sua ajuda na correção do português neste trabalho.

Curriculum Vitae

- **Informações Pessoais**

Nome: Paulo Cesar Telles de Souza

Data de nascimento: 29/03/1982

- **Formação Universitária**

Bacharelado e Licenciatura em Química, Período: 03/2003 à 07/2007.

Instituto de Química, UNICAMP

Projeto de Iniciação Científica: *Introdução a Dinâmica Molecular de Proteínas.*

Orientador: Prof. Dr. Munir S. Skaf.

Período: 08/2005 à 07/2007, Bolsa FAPESP.

- **Mestrado**

Simulações de dinâmica molecular de mutantes do receptor do hormônio tireoideano.

Orientador: Prof. Dr. Munir S. Skaf, Instituto de Química, UNICAMP

Ingresso: 01/08/2007, Defesa: 30/07/2009, Bolsa FAPESP.

- **Doutorado**

Modelagem molecular de receptores nucleares: estrutura, dinâmica e interação com ligantes.

Orientador: Prof. Dr. Munir S. Skaf, Instituto de Química, UNICAMP.

Ingresso: 01/08/2009, Defesa: 06/02/2013, Bolsa FAPESP

• Prêmios e Distinções

1. Menção Honrosa pelos trabalhos “*Molecular Dynamics simulation of the nuclear receptor PPAR gamma with a new partial agonist GQ-16*” e “*New insights of Structure and Dynamics of the Thyroid Hormone Receptors without ligands*”, concedida pela Federação Latino Americana das Sociedades de Biofísica e pela Sociedade Brasileira de Biofísica, 2012.
2. *Best Poster Award*, para o trabalho “*Study of thyroid hormone receptor and its mutations*”, concedido pela Associação Brasileira de Bioinformática e Biologia Computacional, 2008.
3. Segundo colocado no exame de ingresso à pós-graduação do IQ-UNICAMP, 06/2007.
4. *Prêmio Lavoisier*, concedido pelo Conselho Regional de Química IV Região, por melhor desempenho acadêmico, 06/2007.

• Artigos publicados

1. Marcelo V. Liberato, Alessandro S. Nascimento, Ayers, S. D., Jean Z. Lin, Aleksandra Cvorc, Rodrigo L. Silveira, Leandro Martínez, Paulo C. T. de Souza, Daniel M. Saidemberg, Tuo Deng, Angélica A. Amato, Marie Togashi, Willa A. Hsueh, Kevin J. Phillips, Mário S. Palma, Francisco A. T. Neves, Munir S. Skaf, Paul Webb, Igor Polikarpov “Medium Chain Fatty Acids Are Selective Peroxisome Proliferator Activated Receptor (PPAR) γ Activators and Pan-PPAR Partial Agonists.” *Plos One*, 7: e36297, 2012.
2. Angélica A. Amato, Senapathy Rajagopalan, Jean Z. Lin, Bruno M. Carvalho, Ana C. M. Figueira, Jenny Lu, Stephen D. Ayers, Melina Mottin, Rodrigo L. Silveira, Paulo C. T. de Souza, Rosa H. V. Mourão, Mário J. A. Saad, Marie Togashi, Luiz A. Simeoni, Dulcineia S. P. Abdalla, Munir S. Skaf, Igor Polikarpov, Maria C. A. Lima, Suely L. Galidino, Richard G. Brennan, John D. Baxter, Ivan R. Pitta, Paul Webb, Kevin J. Phillips, Francisco A. T. Neves “GQ-16, A Novel PPAR γ Ligand, Promotes Insulin Sensitization Without Weight Gain.” *J. Biol. Chem.*, 287: 28169-28179, 2012.

3. Anders O. Hansson, Paulo C. T. de Souza, Rodrigo L. Silveira, Leandro Martínez, Munir S. Skaf “CHARMM force field parameterization of rosiglitazone.” *Intern. J. Quantum Chem.*, 111: 1346-1354, 2011.
4. Érica T. Prates, Paulo C. T. de Souza, Mónica A. Pickholz, Munir S. Skaf “CHARMM-based parameterization of neutral articaine-A widely used local anesthetic.” *Intern. J. Quantum Chem.*, 111: 1339-1345, 2011.
5. Paulo C. T. de Souza, Gustavo B. Barra, Lara F. R. Velasco, Isabel C. J. Ribeiro, Luiz A. Simeoni, Marie Togashi, Paul Webb, Francisco A. T. Neves, Munir S. Skaf, Leandro Martínez, Igor Polikarpov “Helix 12 dynamics and thyroid hormone receptor’s activity: experimental and molecular dynamics studies of Ile280 mutants.” *J. Mol. Biol.*, 412: 882-893, 2011.
6. Ana C. M. Figueira, Daniel M. Saidemberg, Paulo C. T. de Souza, Leandro Martínez, Thomas S. Scanlan, John D. Baxter, Munir S. Skaf, Mário S. Palma, Paul Webb, Igor Polikarpov “Analysis of Agonist and Antagonist Effects on Thyroid Hormone Receptor Conformation by Hydrogen/Deuterium Exchange.” *Mol. Endo.*, 25: 15-31, 2010.
7. Leandro Martínez, Paulo C. T. de Souza, Wanius J. Garcia, Fernanda A. H. Batista, Rodrigo V. Portugal, Alessandro S. Nascimento, Marcel Nakahira, Luis M. T. R. Lima, Igor Polikarpov and Munir S. Skaf, “On the Denaturation Mechanisms of the Ligand Binding Domain of Thyroid Hormone Receptors.” *J. Phys. Chem. B*, 114: 1529-1540, 2010.

• Artigos em preparação

1. Amanda Bernardes, Paulo C. T. Souza, João R. C. Muniz, Clarisse G. Ricci, Stephen D. Ayers, Nili M. Parekh, André S. Godoy, Daniela B. B. Trivella, Peter Reinach, Paul Webb, Munir S. Skaf and Igor Polikarpov, “Molecular Mechanism of Peroxisome Proliferator-activated Receptor α Activation by WY14643: a New Mode of Ligand Recognition and Receptor Stabilization”, 2013.

2. Maria I. Chiamolera, Rutnéia P. Pessanha, Gustavo B. Barra, Paulo C. T. Souza, Lucas Bleicher, Rosa P. M. Biscolla, Magnus R. D. da Silva, Sérgio A. Dib, Gisah A. Carvalho, Munir S. Skaf, Igor Polikarpov, Francisco A. R. Neves and Rui M. B. Maciel “A Novel TR β Mutation (P452L) in Resistance to Thyroid Hormone Plays a Critical Role in the Interaction with Corepressor and Coactivator”, 2013.
3. Paulo C. T. Souza, Ana C. Puhl, Ricardo Aparício, Ana C. M. Figueira, Alessandro N. Silva, Leandro Martínez, Paul Webb, Igor Polikarpov and Munir S. Skaf “Identification of a new hormone binding site on the surface of thyroid hormone receptor”, 2013.
4. Paulo C. T. Souza, Larissa C. Textor, Denise C. de Melo, Munir S. Skaf and Igor Polikarpov “Alternate conformation of estrogen receptor LBD raises new perspectives into the structural dynamics and regulation mechanism of nuclear receptors”, 2013.
5. Paulo C. T. de Souza, Leandro Martínez and Munir S. Skaf “Calculation of $\Delta G_{binding}$ of thyroid hormone to a new binding site of its receptor via the Jarzynski Equality and MD simulations.”, 2013.
6. Alana dos R. Figueiredo, Paulo C. T. de Souza, Munir S. Skaf and Fabio C. Gozzo “A Combined Theoretical and Experimental Study on the Effective Cross-Linker Arm Length for Use in Structural Proteomics”, 2013.
7. Alexandre F. Gomes, Paulo C. T. de Souza, Munir S. Skaf and Fábio C. Gozzo “Effect of Chemical Cross-Linking on Protein Structure Investigated by Travelling-Wave Ion Mobility Mass Spectrometry and Molecular Dynamics Simulations.”

• Resumos publicados em anais de congressos

1. Paulo C. T. de Souza, Leandro Martínez, Igor Polikarpov, Munir S. Skaf “Calculation of $\Delta G_{binding}$ of thyroid hormone to a new binding site of its receptor via the Jarzynski Equality and MD simulations.” 8th Internacional Conference of the Brazilian Association for Bioinformatics and Computational Biology, Campinas - Brasil, 2012.

2. Júlio C. A. da Silva, Paulo C. T. de Souza, Munir S. Skaf “Molecular Basis of Functional Impairment of Androgen Receptor Mutants Studied by Molecular Dynamics Simulations.” Quitel: XXXVIII Congresso de Químicos Teóricos de Expressão Latina, Natal - Brasil, 2012.
3. Melina Mottin, Paulo C. T. de Souza, Rodrigo L. Silveira, Munir S. Skaf “Molecular Dynamics simulation of the nuclear receptor PPAR gamma with a new partial agonist GQ-16.” II Latin American Federation of Biophysical Societies Congress / XXXVII Congress of the Brazilian Biophysical Society, Búzios - Brasil, 2012.
4. Denise C. de Melo, Paulo C. T. de Souza, Munir S. Skaf “Molecular Dynamics Simulations of Estrogen Receptors Mutations” II Latin American Federation of Biophysical Societies Congress / XXXVII Congress of the Brazilian Biophysical Society, Búzios - Brasil, 2012.
5. Paulo C. T. de Souza, Ana C. M. Figueira, Leandro Martínez, Igor Polikarpov, Munir S. Skaf “New insights of Structure and Dynamics of the Thyroid Hormone Receptors without ligands.” II Latin American Federation of Biophysical Societies Congress / XXXVII Brazilian Biophysical Society Congress, Búzios - Brasil, 2012.
6. Melina Mottin, Paulo C. T. de Souza, Rodrigo L. Silveira, Munir S. Skaf “Molecular Dynamics Simulations of PPAR γ with a new partial agonist FNB1.” São Paulo School of Advanced Science (ESPCA): Advanced Topics in Computational Biology - Agrochemical and Drug Design, Campinas - Brasil, 2012.
7. Melina Mottin, Paulo C. T. de Souza, Rodrigo L. Silveira, Munir S. Skaf “Studies of PPAR gamma receptor dynamics and its interaction with the new partial agonist GQ-16.” 8th Internacional Conference of the Brazilian Association for Bioinformatics and Computational Biology (X-Meeting 2012), Campinas - Brasil, 2012.
8. Paulo C. T. de Souza, Igor Polikarpov, Leandro Martínez, Munir S. Skaf “Calculation of $\Delta G_{binding}$ of thyroid hormone to a new binding site of its receptor via the Jarzynski Equality and MD simulations.”

-
- XVI Simpósio Brasileiro de Química Teórica (XVI SBQT), Ouro Preto - Brasil, 2011.
9. Fábio C. Gozzo, Alexandre F. Gomes, Paulo C. T. de Souza, Munir S. Skaf “Effect of Chemical Cross-Linking on Protein Structure Investigated by Travelling-Wave Ion Mobility Mass Spectrometry and Molecular Dynamics Simulations.” 59th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Philadelphia - Estados Unidos da América, 2011.
 10. Melina Mottin, Paulo C. T. de Souza, Rodrigo L. Silveira, Munir S. Skaf “Investigation of a new PPAR γ partial agonist by Molecular Dynamics Simulations” 7th Internacional Conference of the Brazilian Association for Bioinformatics and Computational Biology (X-Meetind 2011), Florianópolis - Brasil, 2011.
 11. Júlio C. A. da Silva, Paulo C. T. de Souza, Munir S. Skaf “Molecular Dynamics Simulations of the Androgen Receptor LBD: Molecular Basis of Structure-Function Relationship” 7th Internacional Conference of the Brazilian Association for Bioinformatics and Computational Biology (X-Meetind 2011), Florianópolis - Brasil, 2011.
 12. Paulo C. T. de Souza, Ana C. M. Figueira, Leandro Martínez, Igor Polikarpov, Munir S. Skaf “New insights of Structure and Dynamics of the Thyroid Hormone Receptors without ligands” 7th Internacional Conference of the Brazilian Association for Bioinformatics and Computational Biology (X-Meetind 2011), Florianópolis - Brasil, 2011.
 13. Paulo C. T. de Souza, Leandro Martínez, Igor Polikarpov, Munir S. Skaf “Studies of thyroid hormone receptor and its mutations” São Paulo School of Advanced Science (ESPCA): Natural Products, Medicinal Chemistry and Organic Synthesis, Campinas - Brasil, 2011.
 14. Alana dos R. Figueiredo, Paulo C. T. de Souza, Munir S. Skaf, Fábio C. Gozzo, “Evaluation of Cross-linker and Protein Dynamics in Cross-linking Coupled to Mass Spectrometry Experiments” 3rd Latin American Protein Society Meeting, Salta - Argentina, 2010.

15. Paulo C. T. de Souza, Leandro Martínez, Igor Polikarpov, Munir S. Skaf, "Studies of thyroid hormone receptor and its mutations." 3rd Latin American Protein Society Meeting, Salta - Argentina, 2010.
16. Paulo C. T. de Souza, Leandro Martínez, Igor Polikarpov, Munir S. Skaf, "Studies of thyroid hormone receptor and its mutations." 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia - Brasil, 2010.
17. Paulo C. T. de Souza ; Leandro Martínez, Gustavo B. Barra, Francisco A. R. Neves, Igor Polikarpov, Munir S. Skaf, "A Importância Funcional de Mutações no Resíduo I280 para a Atividade do Receptor do Hormônio Tireoideano: Dinâmica Molecular elucidada Ensaio Funcionais." XV Simpósio Brasileiro de Química Teórica (XV SBQT), Poços de Caldas - Brasil, 2009.
18. Alana dos R. Figueiredo, Paulo C. T. de Souza, Munir S. Skaf, Fábio C. Gozzo, "Evaluation of Cross-linker and Protein Dynamics in Cross-linking Coupled to Mass Spectrometry Experiments." 3º. Congresso Brasileiro de Espectrometria de Massas (BrMASS 2009), Campinas - Brasil, 2009.
19. Alana dos R. Figueiredo, Paulo C. T. de Souza, Munir S. Skaf, Fábio C. Gozzo, "Evaluation of Cross-linker and Protein Dynamics in Cross-linking Coupled to Mass Spectrometry Experiments." 57th ASMS Conference on Mass Spectrometry, Philadelphia - Estados Unidos da América, 2009.
20. Paulo C. T. de Souza, Leandro Martínez, Igor Polikarpov, Munir S. Skaf, "Study of thyroid hormone receptor and its mutations." X-Meeting 2008, 4th International conference of the Brazilian association for bioinformatics and computational biology, Salvador - Brasil, 2008.
21. Paulo C. T. de Souza, Leandro Martínez, Igor Polikarpov, Munir S. Skaf, "Molecular Dynamics show changes in structure, mobility and interactions of nuclear receptor mutants related with syndrome." Braz-MedChem2008 - The 4th Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry, Ipojuca - Brasil, 2008.

22. Anders O. Hansson, Paulo C. T. de Souza, Igor Polikarpov, Munir S. Skaf, “Molecular Properties of the Nuclear Receptor Ligand Rosiglitazone” BrazMedChem2008 - The 4th Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry, Ipojuca - Brasil, 2008.
23. Leandro Martínez, Paulo C. T. de Souza, Igor Polikarpov, Munir S. Skaf, “Denaturation Mechanisms of the Ligand Binding Domain of Thyroid Hormone Receptors” X-Meeting 2007: 3rd International conference of the Brazilian Association for Bioinformatics and Computational Biology, São Paulo - Brasil, 2007.
24. Paulo C. T. de Souza, Leandro Martínez, Igor Polikarpov, Munir S. Skaf, “Study of thyroid hormone receptor and its mutations.” XIV Simpósio Brasileiro de Química Teórica (XIV SBQT), 2007, Poços de Caldas - Brasil. Livro de Resumos do XIV SBQT, 2007.
25. Leandro Martínez, Paulo C. T. de Souza, Igor Polikarpov, Munir S. Skaf, “Denaturation Mechanisms of the Ligand Binding Domain of Thyroid Hormone Receptors” XIV Simpósio Brasileiro de Química Teórica (XIV SBQT), Poços de Caldas - Brasil, 2007.
26. Paulo C. T. de Souza, Munir S. Skaf, “Dinâmica Molecular mostra mudanças de mobilidade na estrutura de Receptores Nucleares relacionados a Síndrome.” XV Congresso de Iniciação Científica da UNICAMP, Campinas - Brasil, 2007.
27. Paulo C. T. de Souza, Munir S. Skaf, “Introdução a Dinâmica Molecular de Proteínas” XIV Congresso de Iniciação Científica da UNICAMP, Campinas - Brasil, 2006.

• Formação na pós-graduação

1. 2010/2S - Exame Exame de Qualificação Geral
Tema: Fundamentos e aplicações de técnicas experimentais para o estudo da dinâmica molecular de proteínas,
Banca: Prof. Dr. Ricardo Aparício, Prof. Dr. Francisco Benedito Pessine e Prof. Dr. Marcelo Ganzarolli de Oliveira, Conceito: Aprovado.

2. 2010/1S - Análise Multivariada de Dados,
Ministrado por: Prof. Dr. Márcia M. C. Ferreira, Conceito: A
3. 2009/2S - Introdução à Termodinâmica Estatística,
Ministrado por: Prof. Dr. Munir S. Skaf, Conceito: A
4. 2008/1S - Química Quântica II,
Ministrado por: Prof. Dr. Nelson H. Morgon e Prof. Dr. Rogério Custódio, Conceito: A
5. 2008/1S - Mecânica e Termodinâmica dos Meios Contínuos II,
Ministrado por: Prof. Dr. Adalberto B. M. S. Bassi, Conceito: A
6. 2008/1S - Química Quântica I,
Ministrado por: Prof. Dr. Nelson H. Morgon, Conceito: A
7. 2008/1S - Mecânica e Termodinâmica dos Meios Contínuos I,
Ministrado por: Prof. Dr. Adalberto B. M. S. Bassi, Conceito: A
8. 2007/2S - Química Medicinal,
Ministrado por: Prof. Dr. Fernando A. S. Coelho, Conceito: A
9. 2007/2S - Introdução a Termodinâmica e a Cinética,
Ministrado por: Prof. Dr. Munir S. Skaf, Conceito: A

• Formação Complementar

1. Estágio no laboratório do Prof. Dr. Marcelo A. Martí, Tema: Mecanismos de Fosforilação do PPAR γ pela enzima CDK5 através de simulações computacionais híbridas QM/MM. Universidad de Buenos Aires, Carga horária: 200h, 2012
2. Química computacional aplicada a QSAR, Centro Nacional de Processamento de Alto Desempenho - SP, Carga horária: 15h, 2010.
3. Introdução ao FORTRAN 90, Centro Nacional de Processamento de Alto Desempenho - SP, Carga horária: 20h, 2005
4. Introdução às Técnicas Experimentais no LNLS, Laboratório Nacional de Luz Síncroton e Universidade Estadual de Campinas, Carga horária: 60h, 2005

Resumo

Receptores Nucleares (NRs) são proteínas que regulam a transcrição de genes, sendo alvos importantes para o desenho de fármacos. NRs são formados por quatro domínios, sendo o mais essencial deles, o Domínio de Ligação com o Ligante (LBD), responsável pelo reconhecimento seletivo de ligantes e ativação de sua função. Nesta Tese são utilizadas simulações de Dinâmica Molecular (MD) para o estudo do LBD de dois importantes NRs: Receptor do Hormônio Tireoideano (TR) e Receptor de Estrogênios (ER). Os estudos envolvendo o LBD do TR iniciaram-se pela investigação de um novo segundo sítio de ligação dos hormônios tireoideanos (T3 e T4). Foi mostrado que os hormônios se mantêm ancorados ao segundo sítio, possuindo grande mobilidade e múltiplos modos de ligação. Estimativas do ΔG de dissociação indicam que este novo sítio deve existir em solução aquosa, sendo T4 o hormônio com maior afinidade e candidato a ligante natural. O segundo objetivo da Tese foi a modelagem molecular da estrutura do LBD do TR sem ligantes (*apo*-TR) através da combinação de resultados de simulações de MD e experimentos de troca de hidrogênio/deutério. O modelo do *apo*-TR obtido mostra que a α -hélice H12 ancora-se na H3, o que explica as mudanças de hidratação nesta região apontadas pelos experimentos. O terceiro objetivo da Tese foi elucidar os mecanismos moleculares que levam a alterações da atividade em duas mutações dos TRs: M369R α e P452L β . As simulações de M369R α indicam que o resíduo mutado interage com T3 no segundo sítio, o que pode explicar o aumento de sua afinidade por este ligante. As simulações de P452L β sugeriram que esta mutação altera a posição da H12, levando a redução da cavidade de interação com co-ativadores e das interações do T3 com o primeiro sítio. O último estudo da Tese investigou uma conformação alternativa do LBD do ER β , que tem potencial para explicar como este subtipo promove repressão parcial da transcrição de genes regulada pelo ER α . Os cálculos de ΔG entre as conformações clássica e alternativa indicam que a alternativa é estável, sendo o mínimo global de energia livre.

Abstract

Nuclear receptors (NRs) are proteins that regulate the gene transcription and thus are important targets for drug development. NRs are composed of four structural domains. The most important of them is the Ligand Binding Domain (LBD), responsible for the selective recognition of ligands and activation of NR function. In this Doctoral Thesis, Molecular Dynamics (MD) Simulation are used to study two important NRs LBD: Thyroid Hormone Receptor (TR) and Estrogen Receptor (ER). Studies involving TR began by investigating a new second binding site of thyroid hormones (T3 and T4) in the TR LBD. It has been shown that hormones remain anchored to the second site and have high mobility and multiple binding modes. Estimates of dissociation ΔG indicate that this new site can exist in aqueous solution. T4 has the higher affinity and may be the natural ligand of this site. The second objective of the Thesis was the molecular modeling of the TR LBD structure without ligands (*apo*-TR) by combining results of MD simulations and hydrogen deuterium exchange experiments. The obtained model of *apo*-TR shows that H12 α -helix is anchored in H3 which explains the hydration changes in this region indicated by the experiments. The third goal was to elucidate the molecular mechanisms that lead to changes in the activity of two TR mutations: M369R α and P452L β . Simulations of M369R α indicate that the mutated residue can interact directly with T3 in the second binding site, explaining the increase of its affinity. Simulations of P452L β suggested that this mutation changes the H12 position, leading to loss of ligand interaction with the first binding site and reduction of coactivator cavity. The last study investigated a new alternative conformation of ER β LBD, which has the potential to explain how this subtype promotes the partial repression of ER α gene transcription. Calculation of ΔG between classic and alternative conformations indicate that the alternative is stable and the global minimum of free energy.

Sumário

Lista de Abreviaturas	xxxii	
Lista de Figuras	xxxv	
Lista de Tabelas	xxxix	
1	Introdução	1
2	Receptores Nucleares	3
2.1	Função e importância	5
2.2	Mecanismos de ação	7
2.3	Domínios estruturais	9
2.3.1	Domínio de ligação com o ligante	11
2.3.2	Dinâmica molecular dos LBDs	17
2.4	Receptor de hormônios tireoideanos	18
2.5	Receptor de estrogênios	21
3	Objetivos	25
4	Dinâmica molecular de proteínas	27
4.1	Simulações de Dinâmica Molecular	32
4.1.1	Configurações iniciais	33
4.1.2	Potenciais de interação	34
4.1.3	Equações de movimento	36
4.1.4	Condições periódicas de contorno, raio de corte e soma de Ewald	38
4.1.5	Escolha do ensemble	40
4.1.6	Cálculo de propriedades	41

4.2	Cálculos teóricos de diferenças de Energia Livre	42
4.2.1	Integração Termodinâmica e o Método da Força Adaptativa	43
4.2.2	Igualdade de Jarzynski e as Simulações de Dinâmica Molecular por Caminho Induzido	45
4.3	Métodos e parâmetros utilizados nas simulações	47
5	O novo sítio de ligação do TR	51
5.1	Estrutura e dinâmica dos ligantes no novo sítio	55
5.1.1	Parametrização dos ligantes e condições das simulações de MD	55
5.1.2	Mobilidade e modos de ligação no novo sítio	57
5.1.3	Relações entre o primeiro e o segundo sítios	61
5.1.4	Tirosina e mutações no segundo sítio	62
5.2	Afinidade dos ligantes pelo segundo sítio	64
5.2.1	Determinação de ΔG pelo método ABF	64
5.2.2	Determinação de ΔG pelo método JE/SMD	66
5.3	A função do novo sítio e o desenvolvimento de ligantes antagonistas	70
6	A estrutura e dinâmica do <i>apo</i>-TR	75
6.1	Condições das simulações de MD	78
6.2	Mudanças conformacionais da H12	80
6.3	Conformações do <i>apo</i> -TR	82
7	O estudo de mutações do TR	87
7.1	Síndrome de resistência ao hormônio tireoideano	89
7.2	Dinâmica molecular de mutações do TR	90
7.3	M369R: mutação com alta afinidade pelos hormônios	91
7.4	P452L: mutação com baixa afinidade pelos hormônios e co-ativadores	94
8	A conformação alternativa do ERβ	99
8.1	Estado de protonação da H498 e simulações de MD	101
8.2	Condições das simulações para o cálculo do ΔG	105

8.3	ΔG entre as conformações do ER β	106
8.4	Conformações do ER β e o pH	110
9	Conclusões	113
9.1	Perspectivas	116
A	Nomenclatura e estrutura dos aminoácidos	119
B	Topologia dos hormônios tireoideanos	121
C	Parâmetros dos hormônios tireoideanos	125
	Referências Bibliográficas	129

Lista de Abreviaturas

ΔG	Diferença de energia livre de Gibbs
ABF	<i>Adaptative biasing force</i> , traduzido como força adaptativa
AF-X	Função de ativação de número “X”
AR	Receptor de androgênios
CHARMM	<i>Chemistry at Harvard Molecular Mechanics</i>
CoA	Proteína co-ativadora ou co-ativador
CoR	Proteína correpressora ou correpressor
DBD	Domínio de ligação com o DNA
DFT	Teoria do funcional de densidade
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNE	Efeito dominante negativo
E1	Estrona, o estrogênio predominante na menopausa
E2	Estradiol, o estrogênio mais ativo, predominante nos anos reprodutivos
E3	Estriol, o estrogênio predominante na gravidez
ER	Receptor de estrogênios
FX	Folha- β de número “X”
G	Energia livre de Gibbs

GC-24	Ligante sintético agonista TR β -seletivo
GR	Receptor de glicocorticóides
H/D	Hidrogênio/Deutério
HSP	Proteína de choque térmico
HX	α -hélice de número “X”
HRE	Elementos responsivos hormonais
JE	Igualdade de Jarzynski
JE/SMD	Método de cálculo de energia livre que usa combinação de JE e múltiplas simulações SMD
K _a	Constante de associação
K _d	Constante de dissociação
LBD	Domínio de ligação com o ligante
MD	Dinâmica molecular
NAMD	<i>Not Another Molecular Dynamics</i>
NH-3	Ligante sintético antagonista dos TRs
NMR	Ressonância magnética nuclear
NR	Receptor nuclear
PDB	<i>Protein data bank</i>
PME	<i>Particle Mesh Ewald</i>
PMF	Potencial de força média (variação de energia livre com a coordenada de reação)
PPAR	Receptor ativado por proliferadores de peroxissomo

PR	Receptor de progesterona
RAR	Receptor de ácidos retinóicos
RHF	Hartree-Fock restrito
RMSD	Raiz do desvio quadrático médio
RNA	Ácido ribonucleico
RXR	Receptor X-retinóide
RTH	Síndrome da resistência ao hormônio tireoideano
SAXS	Espalhamento de raios-X a baixo ângulo
SMD	<i>Steered Molecular Dynamics</i> , traduzido como Dinâmica Molecular por Caminho Induzida
SERM	Modulador seletivo do receptor de estrogênios
T3	3,5,3'-triiodo-L-tironina ou simplesmente triiodo-tironina, o hormônio tireoideano na forma mais ativa.
T4	3,5,3',5'-tetraiodo-L-tironina ou tiroxina, o hormônio tireoideano produzido na tireóide
TI	Integração Termodinâmica
TR	Receptor de hormônios tireoideanos
TRIAC	Ácido triiodo-tiroacético, metabólito do T3
VDR	Receptor de vitamina D
VMD	<i>Visual Molecular Dynamics</i>

Lista de Figuras

2.1	Do complexo à ordem: três tipos de representações de um dímero de receptores nucleares associados a um segmento de DNA	4
2.2	Alguns exemplos de hormônios naturais e fármacos que interagem com NRs.	6
2.3	Mecanismo geral de ação de receptores nucleares.	8
2.4	Representação esquemática da organização estrutural de um exemplo de NR	9
2.5	Estrutura do domínio de ligação com o DNA do receptor de estrogênicos	10
2.6	O LBD e o sítio de ligação de alguns NRs	13
2.7	A conformação da H12 e a influência de ligantes agonistas, antagonistas e co-reguladores	16
2.8	Representação dos possíveis caminhos de dissociação e associação em NRs.	18
2.9	As três formas de hormônio tireoideano: T4, T3 e TRIAC.	19
2.10	As três formas dos hormônios estrogênicos: E1, E2 e E3.	21
4.1	Dinâmica molecular de proteínas	29
4.2	Representação de um sistema periódico bidimensional	39
5.1	Estruturas do LBD do TR α com ligantes no segundo sítio	52
5.2	GC-24 no segundo sítio de ligação no LBD do TR β	54
5.3	Comparação dos ensaios de atividade transcricional do TR β nativo e de quatro mutações em resíduos do segundo sítio	55
5.4	Representação do análogo de T3 e T4 utilizado para a parametrização e varredura dos três diedros.	57
5.5	Mobilidade dos hormônios	58

5.6	Energia de interação hormônio-LBD e modos de ligação	60
5.7	Duas conformações da R228 observadas nas simulações de MD e nas estruturas cristalográficas com ligantes no segundo sítio.	62
5.8	Teste do aminoácido tirosina como ligante no segundo sítio de ligação.	63
5.9	ΔG de dissociação dos ligantes T3 e T4 do segundo sítio de ligação obtida pelo método ABF	66
5.10	ΔG de dissociação do ligante T3 do segundo sítio de ligação obtida pelo método JE/SMD.	68
5.11	Estrutura do LBD do AR com seu domínio F e o T3 no segundo sítio de ligação.	71
5.12	Diferenças entre o ligante T3 no primeiro e no segundo sítio de ligação.	72
6.1	Resultados dos experimentos de troca H/D e modelo estrutural do <i>apo</i> -TR	77
6.2	Ilustração do procedimento utilizado para induzir mudanças conformacionais no LBD do TR	79
6.3	Mudanças conformacionais da H12	81
6.4	Comparação entre a estrutura do <i>holo</i> -TR agonista e as conformações após resfriamento - Ângulo I	83
6.5	Hidratação da do C-terminal da H3 nas simulações de MD	85
6.6	Comparação entre a estrutura do <i>holo</i> -TR agonista e as conformações após resfriamento - Ângulo II	86
7.1	Localização dos resíduos do LBD importantes para a dimerização	88
7.2	A mobilidade de ligante no segundo sítio da mutação M369R	93
7.3	As interações do ligante no segundo sítio da mutação M369R	93
7.4	Alterações conformacionais da H12 no mutante P452L.	97
7.5	Mutação P452L provoca perda de interações do T3 com resíduo I330.	98
8.1	As conformações clássica e alternativa do ER β	100

8.2	A mobilidade de ambos estados de protonação da H498 na conformação alternativa.	102
8.3	A interação entre H498 ⁺ e D303 na conformação alternativa.	103
8.4	Mobilidade de ambos os estados de protonação da H498 na conformação clássica.	104
8.5	Mapa do perfil de energia livre entre ambas as conformações no estado desprotonado de H498.	107
8.6	Mapa do perfil de energia livre entre ambas as conformações no estado protonado de H498.	108
8.7	Comparação entre as conformações alternativa, clássica e intermediárias.	109

Lista de Tabelas

5.1	Resultados obtidos nos cálculos do ΔG de dissociação dos ligantes do segundo sítio de ligação.	69
7.1	Efeito de mutações na região de dimerização nas funções do TR β	88
8.1	Estimativas do pK_a do resíduo H498 a partir das estruturas cristalográficas e simulações de MD.	105
8.2	ΔG entre as conformações nos diferentes estados de protonação	109

Capítulo 1

Introdução

Nesta Tese são mostrados os principais estudos realizados ao longo de três anos e seis meses de pesquisa desenvolvida pelo autor em seu programa de Doutorado. O texto foi dividido em nove Capítulos, sendo esta introdução apenas um guia, explicando o modo como foi organizada a Tese. No Capítulo 2 inicia-se a Tese propriamente dita, sendo realizada uma introdução sobre o tema da pesquisa, os Receptores Nucleares. Em seguida, o Capítulo 3 destaca rapidamente quais foram os objetivos da pesquisa dentro deste tema. No Capítulo 4 é feita uma fundamentação teórica sobre a dinâmica de proteínas, simulações de dinâmica molecular e cálculos teóricos de diferenças de energia livre. Ao final deste capítulo também são descritos de maneira geral os métodos e parâmetros utilizados ao longo do trabalho.

Finalmente, os Capítulos 5, 6, 7 e 8 descrevem separadamente os resultados obtidos de cada um dos quatro objetivos da Tese. Aspectos específicos da metodologia utilizada e também discussões dos resultados obtidos são realizadas junto destes quatro Capítulos. Como todo trabalho de pesquisa, esta Tese de Doutorado termina com algumas respostas às questões levantadas nos objetivos, além de novas perguntas. O Capítulo 9 cumpre este papel, descrevendo as conclusões finais obtidas e as perspectivas futuras.

Capítulo 2

Receptores Nucleares

Receptores nucleares são proteínas. Dizer isto implica, para o autor deste texto ao menos, que são estruturas intrigantes e importantes. E isso não é pouco para um químico, dado que estamos acostumados a estudar moléculas e suas utilidades desde que despertamos interesse por esta Ciência. O que me intriga sempre em proteínas são elas possuírem complexidade e, ao mesmo tempo, ordem. Faça uma experiência: tente observar a estrutura atômica de uma proteína utilizando uma representação de todos os átomos que a compõe. Será difícil observar algum sentido, alguma característica que se sobressaia (Figura 2.1A). Se tentarmos representar apenas sua superfície então (talvez a maneira mais próxima do que seria “ver uma proteína”), a imagem que temos é de uma forma geométrica das mais complexas, que nem artistas plásticos poderiam imaginar (Figura 2.1B). Nestas representações, mesmo especialistas no estudo de determinadas classes de proteínas podem ter dificuldade em sequer identificá-las.

Porém, a partir do momento que utilizamos nosso conhecimento científico acumulado para observá-las novamente, não se vê mais apenas a complexidade, mas também a ordem. Ordem em uma sequência de aminoácidos precisa, que possibilita o encaixe perfeito entre os átomos que a compõe, num enovelamento específico. Ordem nas α -hélices e folhas- β posicionadas em harmonia, mas que só podem ser visualizadas com o conhecimento da conectividade de suas ligações químicas e também dos ângulos de diedro típicos que identificam suas estruturas secundárias (Figura 2.1C).

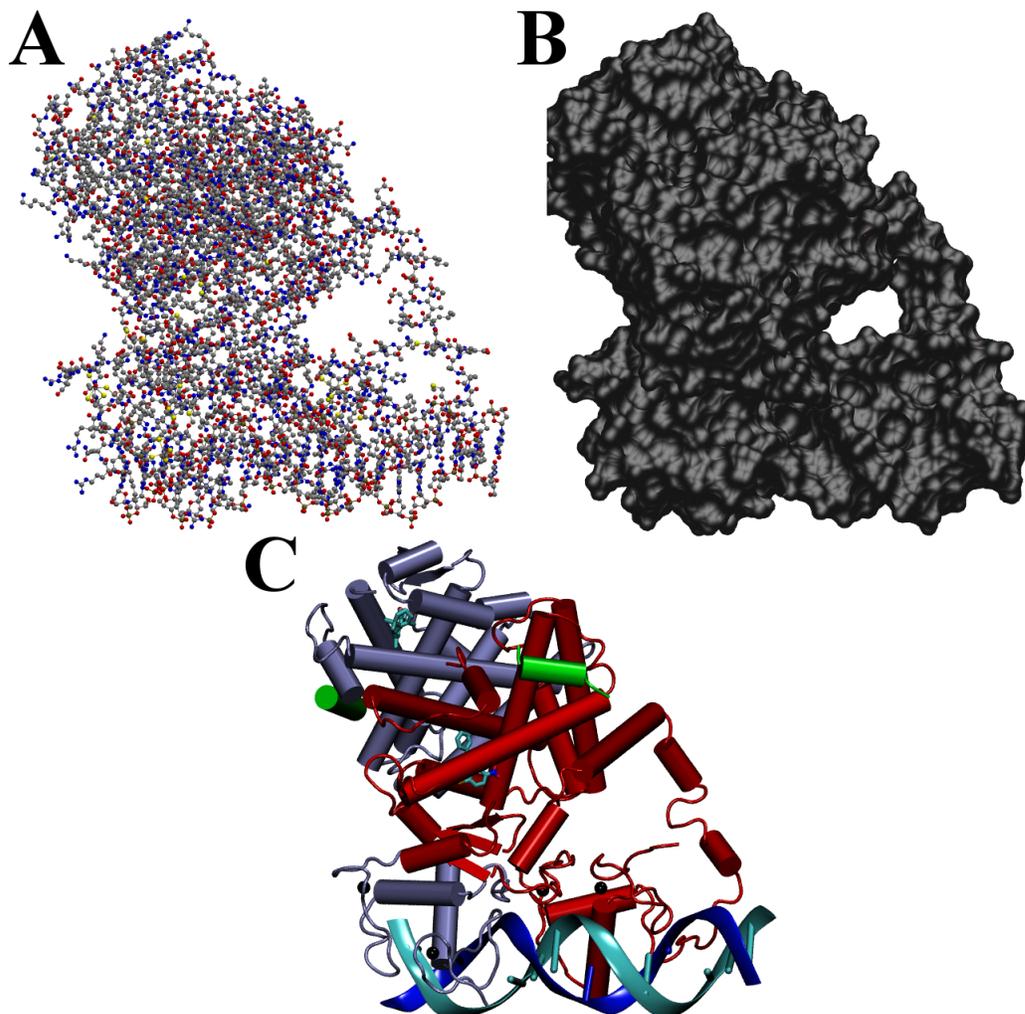


Figura 2.1. Do complexo à ordem: três tipos de representações de um dímero de receptor nuclear associado a um segmento de DNA: A) Átomos da estrutura; B) Superfície acessível ao solvente; C) Estrutura secundária, com as α -hélices representadas como cilindros, folhas- β como setas e regiões sem estrutura como tubos, conectando os elementos de estrutura secundária. O DNA é representado por duas fitas entrelaçadas. (código no *Protein Data Bank* - PDB: 3E00).

Se não bastassem estas (e outras) características físico-químicas intrigantes para interessar um cientista, as proteínas são também importantes para os organismos que as possuem. Toda a ordem e complexidade citadas acima estão a serviço da execução de uma função biológica. Em geral, se por alguma razão, uma determinada proteína não é produzida ou possui mal funcionamento, isto pode implicar

em problemas ao organismo ou mesmo na morte deste. Dado estas características, não é por acaso que elas se constituem os principais alvos para o desenvolvimento de novos fármacos. Assim, proteínas são importantes para a saúde e a doença, para a vida e a morte.

Voltando à frase inicial desta seção: Receptores Nucleares são proteínas. Logo, este capítulo inicial desta Tese de Doutorado tem como proposta mostrar como Receptores Nucleares são intrigantes e importantes, ou seja, será feita uma introdução sobre sua complexa e ordenada estrutura bem como de suas importantes funções no organismo e aplicações no desenvolvimento de fármacos. Será dado especial destaque aos receptores de hormônios tireoideanos e aos receptores de estrogênios, proteínas que foram o foco da pesquisa desta Tese. Além disso, será descrito ao longo do capítulo como o intrigante e o importante se correlacionam, o que caracteriza o principal paradigma da Biofísica e Bioquímica de Proteínas atual: a relação entre estrutura e função biológica. Por fim, será introduzida uma nova palavra ao centro deste paradigma: dinâmica.

2.1 Função e importância

Receptores nucleares (NR¹) pertencem a uma superfamília de proteínas intracelulares que têm a função de regular a transcrição de genes específicos [1–6], controlando o desenvolvimento, a homeostase e o metabolismo de organismos pertencentes ao reino Animalia² [7, 8]. NRs são fatores de transcrição, ou seja, proteínas que se ligam diretamente ao DNA, regulando a ação da RNA polimerase. Na grande maioria dos casos, sua função é desencadeada pela sua associação a uma biomolécula pequena e hidrofóbica, denominada hormônio. Alguns exemplos conhecidos de hormônios que se ligam a NRs são: estrogênios, androgênios, ácidos retinóicos e os hormônios tireoideanos.

Dada à função biológica desta superfamília e as características de seus ligantes, não é surpresa os NRs serem importantes para o desenvolvimento de fármacos. Estatísticas do mercado farmacêutico americano indicam que cerca de 13% dos

¹Nesta Tese de Doutorado foi feita a opção de serem utilizadas siglas referentes as palavras em inglês, dado seu uso comum na comunidade científica brasileira.

²Não existem NRs em bactérias, protozoários, algas, fungos e plantas. Em humanos, foram identificados 48 NRs diferentes.

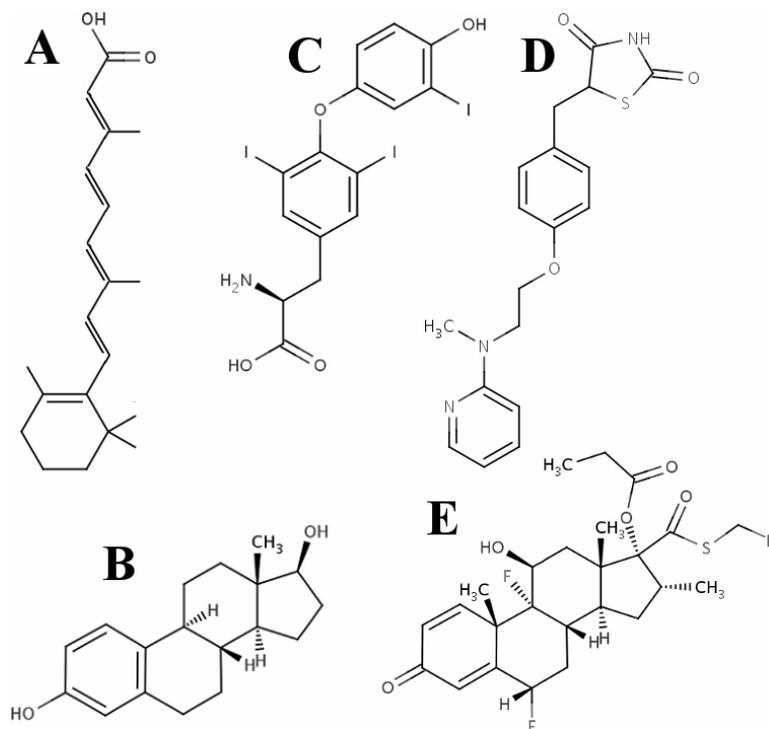


Figura 2.2. Alguns exemplos de hormônios naturais (A-C) e fármacos (D-E) que interagem com NRs: (A) tretinoína, um dos ácidos retinóicos; (B) estradiol, um dos estrogênios; (C) triiodo-tironina, um dos hormônios tireoideanos; (D) Rosiglitazona, fármaco antidiabético que atua como agonista de um dos receptores ativados por proliferador de peroxissomo; (E) Fluticasona, fármaco usado no tratamento antiasmático que atua como agonista do receptor de glicocorticóide.

fármacos aprovados para venda tem como alvo receptores nucleares. Dos 200 principais medicamentos prescritos, 15 deles atuam nesta classe de proteínas, representando 27,5 bilhões dólares de receita de vendas em 2009 [9, 10]. O fármaco mais vendido nesta categoria é o *Advair*³ da empresa *GlaxoSmithKline* [11, 12], com vendas de 7,8 bilhões de dólares em 2009 [10]. As principais indicações para fármacos que atuam em NRs incluem asma, doença pulmonar obstrutiva crônica, diabetes melitus tipo II, hiperlipidemia, contracepção, terapia de reposição hor-

³Conhecido como Seretide no mercado brasileiro, este fármaco trata-se de uma mistura de dois princípios ativos: fluticasona e salmeterol. A fluticasona é o ligante que tem como alvo um NR, o receptor de glicocorticóide. Ele é utilizado para o tratamento de asma e da doença pulmonar obstrutiva crônica, doença que leva a destruição do alvéolos pulmonares e que ocorre especialmente em pacientes fumantes e/ou que tiveram tuberculose.

monal, câncer de próstata e osteoporose [10]. Alguns exemplos de estruturas de hormônios naturais e de fármacos que atuam em NRs são mostrados na Figura 2.2.

2.2 Mecanismos de ação

Não se conhece completamente como os NRs executam a regulação da transcrição. Em geral, estas proteínas encontram-se dentro das células na forma de dímeros, podendo estar localizados no citoplasma ou no núcleo. Os ligantes (endógenos ou exógenos) são transportados pela corrente sanguínea até as células em que atuam, atravessando a membrana plasmática provavelmente por transporte passivo [1–6]. Dependendo da classe a que pertencem, os mecanismos de ação dos NRs podem ser bem distintos, em especial no que se refere à distribuição dos NRs sem ligante dentro da célula e ao tipo de dimerização (homo ou heterodímeros).

NRs da classe I, chamada de classe dos receptores esteroidais, permanecem inativos no citoplasma na ausência de ligantes. Geralmente estes NRs encontram-se ligados a proteínas que colaboram com a manutenção de seu enovelamento, chamadas de proteínas de choque térmico (HSP). O ligante se liga ao receptor ainda no citoplasma, induzindo a dissociação do NR da HSP. Um homodímero de receptores esteroidais é formado, migra para o núcleo e finalmente liga-se ao DNA, promovendo a transcrição. A Figura 2.3A ilustra este mecanismo de ação. Exemplos de receptores da classe I são receptores de androgênios (AR), de estrogênios (ER), de glicocorticóides (GR) e de progesterona (PR).

NRs da classe II, também conhecida como classe do receptor do hormônio tireoideano (TR), permanecem, na ausência de ligantes, dimerizados com o receptor de retinóide X (RXR) e ligados ao DNA, o que resulta na repressão da transcrição de determinado gene, tal como mostra a Figura 2.3B. Neste caso, o ligante chega ao núcleo provavelmente por difusão e se liga ao receptor. A ligação do hormônio provoca mudanças estruturais no receptor, que passa a atuar como um ativador da transcrição. Além do próprio TR, outros exemplos de NRs da classe II são o receptor de ácidos retinóicos (RAR), os receptores ativados por proliferador de peroxissomo (PPAR) e o receptor de vitamina D (VDR).

A regulação da transcrição promovida pelos NRs também envolve uma classe de proteínas chamadas de co-reguladores [3–6]. Os co-reguladores são proteínas que

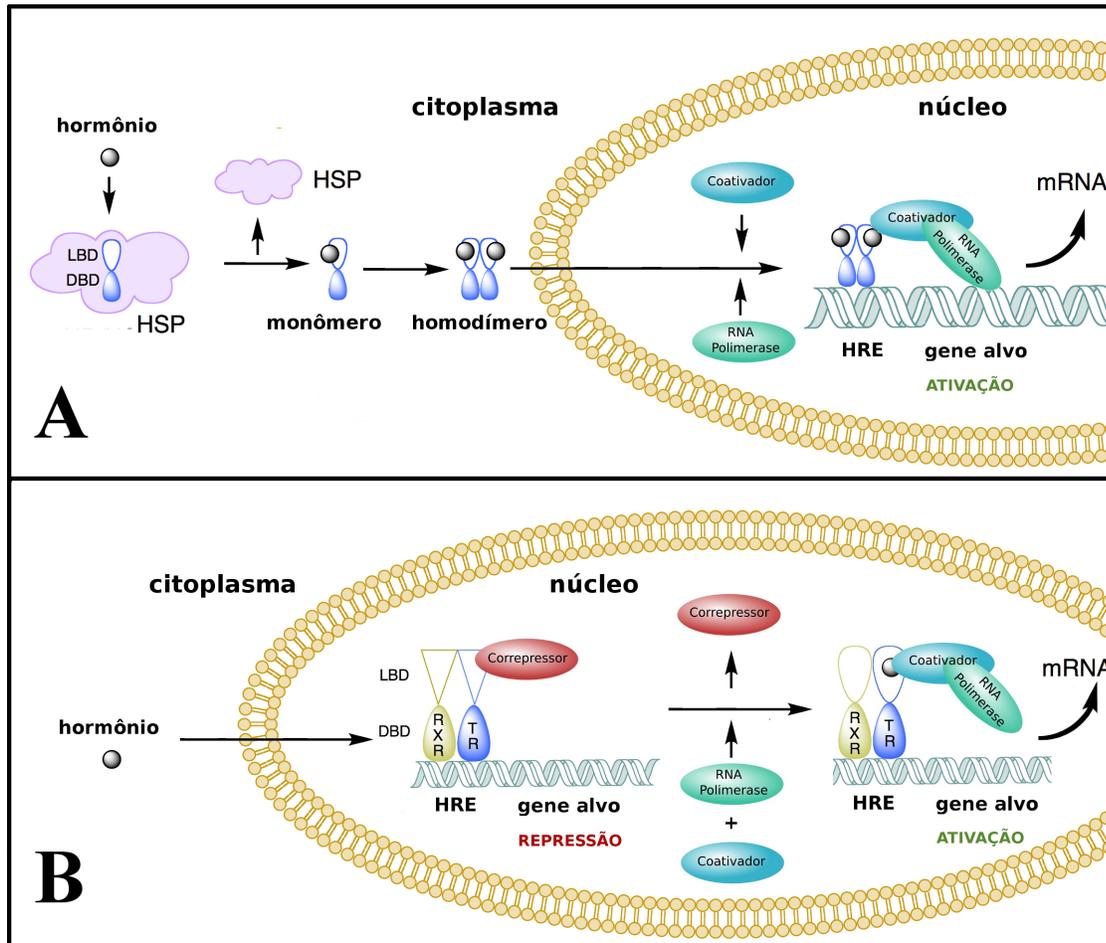


Figura 2.3. Mecanismo geral de ação de receptores nucleares: (A) Classe I e (B) Classe II. Figura foi adaptada à partir do site Wikipedia [13].

se associam aos NRs, facilitando ou inibindo a transcrição do gene alvo. A maneira como estes co-reguladores atua é variada e inclui a remodelação da cromatina (variando assim a acessibilidade do gene alvo à transcrição) ou a estabilização da ligação de outras proteínas, tal como a RNA polimerase, entre outras funções. Existem co-reguladores repressores da transcrição (correpresores, CoR) e co-reguladores ativadores da transcrição (co-ativadores, CoA).

Nos receptores da classe dos TRs, por exemplo, os NRs permanecem ligados a um correpresor na ausência do ligante. A associação do ligante promove alterações conformacionais no NR, levando a dissociação do correpresor e a associação do

co-ativador, dando início à transcrição. A concentração e o tipo de co-reguladores existentes nas células de diferentes tecidos pode influir no controle e na especificidade da transcrição dos genes alvo regulada por cada NR.

A forma pela qual o complexo proteico contendo os NRs passa de inibidor a ativador da transcrição parece estar fundamentalmente relacionada à conformação do NR e à associação destes com co-reguladores [3–6, 14], de maneira que para melhor compreendê-lo é necessário o conhecimento da estrutura e das interações intermoleculares realizadas por estas biomoléculas.

2.3 Domínios estruturais

Um típico NR é formado por até quatro domínios estruturais distintos, ligados covalentemente uns aos outros. Dois destes domínios apresentam estrutura e funções bem estabelecidas, sendo conhecidos como Domínio de Ligação com o DNA (DBD) e Domínio de Ligação com o Ligante (LBD). Além destes, existem outros dois domínios menos compreendidos, chamados de domínio N-terminal e domínio F [3–6, 14, 15]. Uma representação das estruturas primária e terciária de um exemplo de NR é mostrada na Figura 2.4.

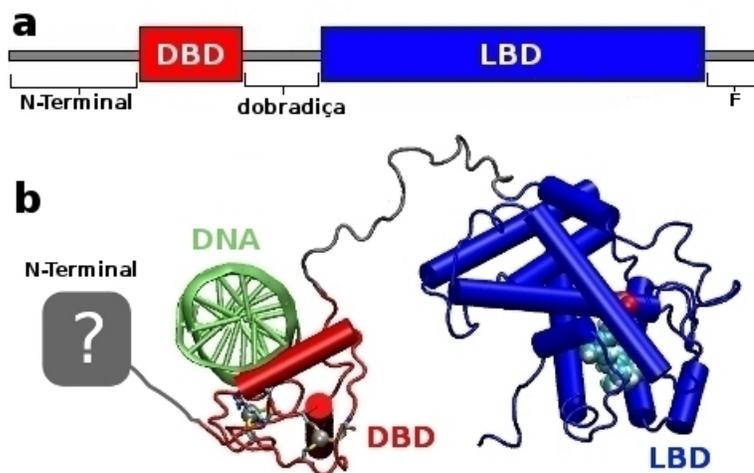


Figura 2.4. Representação esquemática da organização estrutural do RXR, um exemplo de NR: a) Estrutura primária; b) Estrutura terciária do RXR (código PDB: 3E00).

O domínio N-terminal é altamente variável entre diferentes classes de receptores e possui uma região ativadora da transcrição, independente da associação a ligantes. Tal região é conhecida como função de ativação-1 (AF-1). Localizado no início da sequência de resíduos, a estrutura terciária desse domínio não pôde ainda ser determinada e há indícios de que seja intrinsecamente desestruturada [3–6, 14, 15].

Seguindo a estrutura primária, logo após o domínio N-terminal encontra-se o DBD. Este domínio tem como principal função o reconhecimento e a ligação com sequências específicas de nucleotídeos do DNA, através de interações não covalentes. Estas sequências estão próximas aos genes regulados por cada NR e são conhecidas como elementos responsivos hormonais (HRE). Em alguns receptores, este domínio também participa da dimerização com outro NR. Porém, as interações entre DBDs não são fortes, sendo o LBD o principal domínio para a execução desta função. O DBD possui em torno de 70 resíduos, sendo sua estrutura caracterizada por duas α -hélices, duas a quatro folhas- β e dois motivos conhecidos como dedos de zinco. Tipicamente encontrados em proteínas que se associam ao DNA [16, 17], os dedos de zinco contêm quatro cisteínas coordenando um íon Zn^{2+} num arranjo tetraédrico. A Figura 2.5 mostra uma representação da estrutura do DBD do $ER\alpha$, sendo destacado os dedos de zinco.

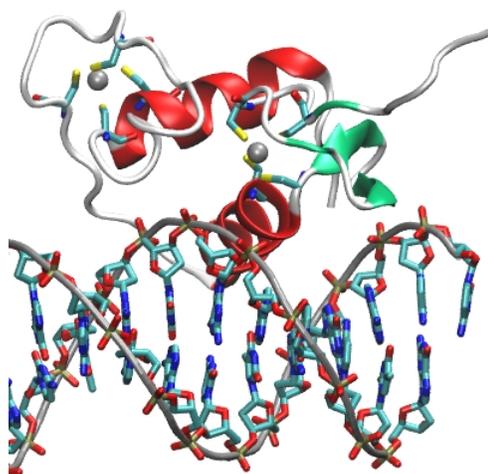


Figura 2.5. Estrutura do domínio de ligação com o DNA do receptor de estrogênios (código PDB: 1HCQ). Destaca-se na estrutura dois dedos de zinco, cada um deles formado por um íon Zn^{2+} (esfera cinza) coordenado por quatro resíduos cisteína

Após o DBD, chega-se ao LBD, o maior domínio e o que possui as funções mais diversificadas. Além de reconhecer os hormônios seletivamente através de interações não covalentes, ele atua diretamente na dimerização dos NRs, ligação com co-reguladores (CoR e CoA) e no silenciamento de genes (inibição da transcrição). A ligação de proteínas CoR e CoA ocorre através da mesma região do LBD. Esta região passa por mudanças conformacionais após a associação do ligante, sendo conhecida como função de ativação-2 (AF-2). O LBD é um domínio pouco conservado entre os NRs, o que reflete a grande variedade de hormônios com os quais se ligam. Unindo o DBD e o LBD, existe uma região que supostamente age como uma “dobradiça”, permitindo o movimento relativo entre estes domínios [3–6, 14, 15].

Existindo em apenas alguns NRs, tal como PR, GR e AR, o domínio F é a última região da sequência de resíduos de um NR. Existem poucas estruturas cristalográficas contendo este domínio, sendo ele pequeno, composto em geral por apenas um *loop* e uma folha- β , que se dobram sobre a superfície do LBD [18–20]. Acredita-se que sua função seja modular a ativação dos NRs. Isto pode ser feito através de mudanças no padrão de transcrição dos próprios NRs (via *splicing* alternativo), o que leva a manutenção ou deleção deste domínio [14].

Até pouco tempo atrás, não havia estruturas cristalográficas de NRs completos, existindo apenas modelos baseadas em resultados experimentais de espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS) [21, 22]. Entretanto, nos últimos anos têm sido obtidos complexos diméricos do LBD e DBD (sem o domínio N-terminal), com ambos NRs ligados a um fragmento de DNA, a ligantes e a pequenos peptídeos representativos dos motivos de interação dos CoAs [23, 24]. A representação de uma destas estruturas é mostrada na Figura 2.4B, enquanto o complexo inteiro já foi apresentado na primeira figura deste Capítulo (Figura 2.1).

Dada à importância do LBD nos estudos desta Tese de Doutorado, maiores detalhes deste domínio serão discutidos na seção seguinte.

2.3.1 Domínio de ligação com o ligante

Com exceção da interação específica com o HRE do DNA, o LBD dos NRs participa ativamente de quase todo mecanismo de regulação, possuindo regiões específicas em sua estrutura para cada função. Um grande número de estruturas cristalográficas

do LBD de NRs, com alta resolução, tem sido determinado ao longo dos últimos anos. As primeiras estruturas determinadas foram do RXR, RAR e TR, no ano de 1995 [25–27]. Atualmente existem em torno de 300 estruturas depositadas no PDB [28]. Todas elas mostram que o LBD é geralmente formado por 12 α -hélices distribuídas em três camadas, além de duas folhas- β que formam um grampo ($\text{grampo-}\beta$), tal como mostram as estruturas a Figura 2.6 [3–6, 15].

As α -hélices externas (H1, H3, H8 e H11), estão numa posição quase ortogonal em relação às internas (H5, H6 e H9), numa disposição que se assemelha a um “sanduíche”. Além destas, existem outras pequenas α -hélices localizadas nas extremidades deste domínio, entre *loops* (H2, H4 e H7) ou na região C-terminal do LBD (H12). Dentro do sanduíche, logo abaixo das α -hélices internas encontra-se o sítio de ligação. A grande maioria das estruturas obtidas encontra-se com ligantes ancoradas neste sítio.

Apesar de o LBD ser um domínio pouco conservado, sua arquitetura geral nos diferentes receptores é muito similar. A Figura 2.6 destaca a semelhança entre os LBDs de $\text{TR}\beta$, $\text{ER}\alpha$ e $\text{PPAR}\gamma$. Uma característica que diferencia os LBDs é o volume de seu sítio de ligação, que pode variar bastante. Por exemplo, o ER possui uma cavidade de 450 \AA^3 , enquanto o PPAR chega a possuir mais de 1400 \AA^3 , podendo variar de volume dependendo do ligante a que se associa [6, 29]. Grande parte do sítio de ligação dos NRs é composto por resíduos apolares (superfície bege nos sítios de ligação representados na Figura 2.6), em concordância com a hidrofobicidade dos hormônios naturais. Alguns poucos resíduos hidrofílicos localizam-se nas extremidades do sítio de ligação, junto ao grampo- β (resíduos polares do lado direito da Figura 2.6), e próximos da H12 e C-terminal da H11 (lado esquerdo da Figura 2.6). Nos PPARs, o grande volume de sítio de ligação é coerente com sua capacidade em reconhecer diferentes tipos de ligantes, podendo possuir até mais deles e também várias moléculas de água dentro do sítio [30, 31]. Já o sítio de ligação dos ERs caracteriza-se por poucas interações hidrofílicas com o LBD e com o meio aquoso externo em comparação aos TRs e PPARs.

Outra região que se destaca e se diferencia nos NRs é a região que envolve as hélices H2, H3 e o grampo- β . Alguns receptores apresentam um grande *loop* entre estas hélices, conhecido como Ω -*loop*, além de outra hélice, chamada H2'⁴. Este é

⁴Foi usado o símbolo H2' de modo a não alterar a numeração padrão das α -hélices nos NRs.

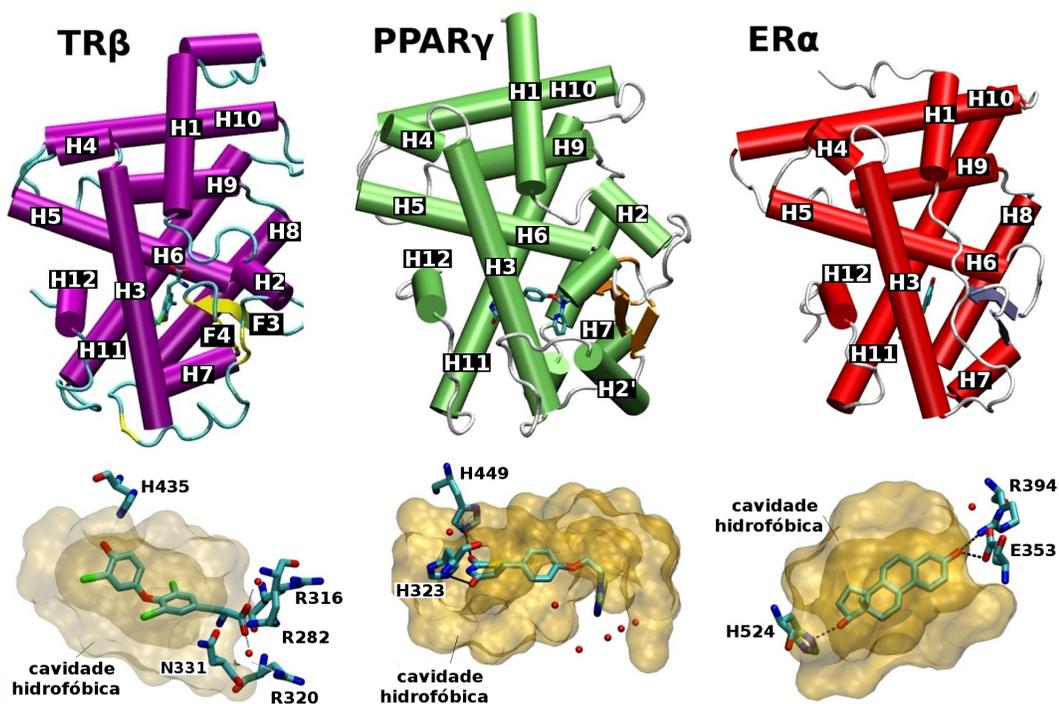


Figura 2.6. LBD e sítio de ligação de alguns NRs: TR β ligado ao hormônio tireoideano triiodo-tironina (código PDB: 3GWS), PPAR γ ligado ao fármaco rosiglitazona (código PDB: 2PRG) e ER α ligado ao estradiol (código PDB: 1QKU). São destacados no sítio de ligação destes NRs as interações com resíduos hidrofílicos e moléculas de água (esferas vermelhas). Os resíduos hidrofóbicos são representados pela superfície bege.

o caso dos PPARs, enquanto o TR possui apenas o Ω -loop. Já o ER não possui este motivo, nem mesmo a α -hélice H2, presente na maioria dos NRs. Estas diferenças levam a mudanças conformacionais relacionadas à hidrofobicidade do sítio de ligação, dado que através desta região, o sítio de ligação dos PPARs e TRs faz contato direto com o solvente, enquanto no caso dos ERs não existe esse contato. Dadas estas características, é muito provável que a região entre H3, Ω -loop e grampo- β seja o caminho preferencial de associação e dissociação de ligantes nos receptores da classe II (como TR e PPAR), enquanto nos NRs da classe I (tal com o ER), ligantes sigam por outros caminhos. Isto tem sido demonstrando por inúmeros estudos utilizando simulações de dinâmica molecular (MD) [32–38].

Uma região relativamente semelhante nos LBDs dos NRs é a superfície de dimerização. Grande parte das estruturas e de estudos funcionais indica que ela é composta pelas α -hélices H8, H10 e H11 tanto nos receptores da classe I (que formam homodímeros) como nos receptores da classe II (heterodímeros). Sabe-se que na ausência de ligantes, os NRs tendem a formar monômeros, apesar de também formarem, em menor concentração, homodímeros [20, 39–42]. Já foram encontrados até tetrâmeros de TR na ausência de ligantes [21, 22]. A associação do ligante leva à formação dos dímeros característicos da classe do NR. Até hoje, não estão claras quais as mudanças conformacionais decorrentes da associação de ligantes que levam à formação de dímeros. Tão pouco se conhece as diferenças essenciais entre NRs de classe distintas que levem à homo ou à heterodimerização.

Na região C-terminal do LBD encontra-se a H12, talvez a região mais importante e estudada dos NRs. Ela faz parte da região AF-2, junto com α -hélices onde ela se ancora que são H3, H5 e H11. H12 possui uma conformação dependente da associação aos ligantes e papel central na interação do LBD com co-reguladores. Em geral, H12 é uma pequena α -hélice composta por 4 a 6 resíduos. Uma exceção importante é o AR, que possui uma H12 maior (em torno de 10 resíduos), além do domínio F ligado diretamente a ela [19].

O mecanismo clássico de ação dos NRs, conhecido como mecanismo da “ratoeira”, propõe que na ausência de ligantes (*apo*-NR) a H12 permanece aberta, livre no solvente. A associação de ligantes agonistas, através desta mesma região, levaria a mudanças conformacionais nos NRs fazendo a H12 passar para a posição fechada. Esta nova posição seria favorecida por interações promovidas pelo ligante, que podem ser diretas com a H12 ou intermediadas por outros resíduos do próprio LBD do NR. Este modelo da ratoeira foi baseado nas primeiras estruturas de NRs obtidas [26, 27, 43], sendo representado na Figura 2.7A.

A obtenção de estruturas de LBDs com co-reguladores permitiu explicar como estas modificações na posição da H12 poderiam favorecer a associação de CoAs em detrimento de interações com CoRs [20, 44–46]. O LBD de *apo*-NRs se associaria aos CoRs através de interações do motivo LXXXIXXX(I/L)⁵ destes co-

⁵As letras “L” e “I” referem-se aos resíduos leucina e isoleucina, respectivamente. A letra “X” indica que qualquer resíduo de aminoácido pode estar nesta posição do motivo. Uma lista de todos os aminoácidos, bem como de suas estruturas e siglas encontra-se no Apêndice A.

reguladores com resíduos hidrofóbicos de H3 e H5, que estariam expostos na conformação aberta da H12. Ao se associar ao ligante, a H12 fechar-se-ia sobre o LBD ocupando parcialmente a mesma região, numa posição ortogonal em relação ao motivo LXXXIXXX(I/L). Neste estado, a interação com os CoRs passaria a ser desfavorável. Como os CoAs possuem um motivo LXXLL, um motivo menor que o encontrado nos CoRs, é possível sua interação com a pequena cavidade formada pelas α -hélices H3, H5 e H12 [3–6, 15]. A Figura 2.7 mostra LBDs de NRs associados a CoAs e CoRs, bem como a mudança conformacional da H12.

Além do menor tamanho do motivo LXXLL, CoAs também permitem interação precisa e direcional com o LBD dos NRs através de dois resíduos carregados em *pH* fisiológico: uma lisina no C-terminal da H3 e um ácido glutâmico na H12. Estes resíduos formam a chamado “braçadeira de carga” (tradução livre de *charge clamp*) [44, 47, 48]. Eles interagem diretamente com o *backbone* do motivo LXXLL, fazendo com que a H12 fechada não seja apenas um fator estérico, impedindo a interação com CoRs, mas também importante para a interação com CoA.

O desenvolvimento de ligantes antagonistas baseou-se nestas ideias, sendo sintetizadas moléculas com grupos funcionais mais volumosos na extremidade que interage com H12. As estruturas cristalográficas com antagonistas mostram que tais ligantes realmente levam a mudanças na posição da H12 explicando, assim, sua perda de atividade (Figura 2.7B). Estudos estruturais com ligantes agonistas parciais, antagonistas e também com mutações de NRs têm apoiado a ideia de que a conformação da H12 é de fato importante para associação com CoAs [46, 49–57].

Apesar do sucesso do mecanismo da ratoeira, vários aspectos deste modelo têm sido revistos. Um questionamento importante é a ideia de existir apenas uma conformação específica, estática que caracterize os estados do LBD com e sem ligante. Se isso de fato ocorre, esperar-se-ia que, na ausência de ligantes, não existisse atividade transcricional ativada por NRs. A observação experimental vai contra isto e mostra que existe atividade, mesmo que reduzida, em relação aos experimentos com NRs contendo ligantes agonistas [58]. Chamada de atividade basal (ou constitutiva), esta transcrição pode inclusive ser reduzida por ligantes de NRs conhecidos como agonistas inversos [59].

Estes argumentos se fortalecem pelo fato de existir apenas uma estrutura cristalográfica NR sem ligantes com H12 na conformação aberta: a própria estrutura

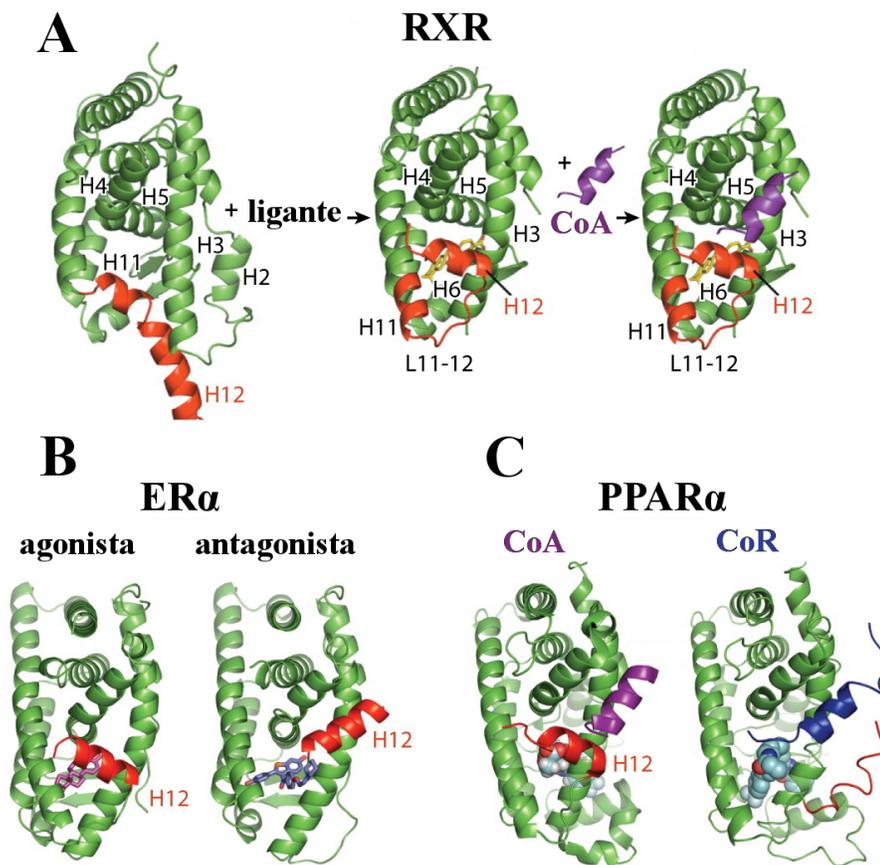


Figura 2.7. A conformação da H12 e a influência de ligantes agonistas, antagonistas e co-reguladores: (A) Mecanismo da Ratoeira: a hélice H12 (vermelha) estaria aberta em solução. A adição de um ligante agonista faz com que a H12 feche-se sobre o LBD permitindo a interação com CoA (violeta); (B) Ligantes antagonistas não permitem que H12 se ancore sobre o LBD na posição agonista, mas numa posição similar à do peptídeo CoA; (C) Comparação entre as região de interação de um CoR (azul) e de um CoA (violeta). Destaca-se na estrutura do LBD com CoR a presença de um ligante antagonista e a conformação da H12, fechada sobre o LBD. Figura adaptada da referência [6].

do RAR utilizada na criação do mecanismo da ratoeira. Todas as outras estruturas cristalográficas de LBDs sem ligantes obtidas mostraram a H12 em posição semelhante às observadas nos LBDs com ligantes agonistas. Apenas outra estrutura, do receptor ER α , foi obtida com a H12 aberta e sem ligante [60]. Porém, neste caso, foi comprovado que esta posição se deve ao empacotamento cristalino.

Para explicar a existência da atividade basal em NRs, bem como entender os mecanismos de associação e dissociação de ligantes e co-reguladores, é imprescindível ampliar o modelo do mecanismo da ratoeira, ou mesmo, refutá-lo e criar um novo. Nesse sentido, é necessária uma visão dinâmica e não estática das estruturas dos LBDs dos NRs.

2.3.2 Dinâmica molecular dos LBDs

Pouco se conhece sobre a dinâmica do LBD dos NRs. Tal como os estudos estruturais, o estudo de sua dinâmica tem se focado na hélice H12. Atualmente, acredita-se que exista um equilíbrio entre diferentes conformações da H12 no LBD, de maneira que todas elas sejam acessíveis em condições fisiológicas. Na ausência de ligantes, as conformações que favorecem interação com CoRs seriam mais populadas. A associação com um ligante agonista deslocaria o equilíbrio para conformações da H12 fechada, formando assim a superfície de interação com CoA e favorecendo a transcrição. Tal modelo possibilitaria explicar a existência de atividade basal, dado que mesmo sem ligantes, uma parcela reduzida de NRs poderia estar em conformação agonista, e logo se associar ao CoA, permitindo a transcrição. Ligantes antagonistas poderiam perturbar a dinâmica, fazendo com que outras conformações da H12, inativas, sejam estabilizadas. Estudos computacionais e experimentais têm sustentado essa visão dinâmica da H12 [56, 58, 61–65].

Recentemente, outros dois aspectos dinâmicos importantes do LBD passaram a ser estudados: a dissociação e a associação dos ligantes. Vários estudos têm apontado para a existência de até três caminhos de dissociação e associação possíveis [32–38], mostrados na Figura 2.8. O caminho I seria semelhante ao anteriormente sugerido pelo mecanismo da ratoeira, porém envolvendo deslocamentos mais sutis da hélice H12. O caminho II baseia-se na separação de H8 e H11, numa região próxima da superfície de dimerização. Por fim, o caminho III envolveria uma abertura entre a hélice H3, o grampo- β e o *loop* entre as hélices H2 e H3, região onde os sítios de ligação de NRs da classe II fazem contato direto com o solvente. Os ligantes em NRs poderiam associar ou dissociar-se pelos três caminhos, variando qual deles seria o mais favorável conforme a identidade do NR, dos ligantes e do co-regulador. Além destes fatores, a dimerização do NR também pode influir. Por

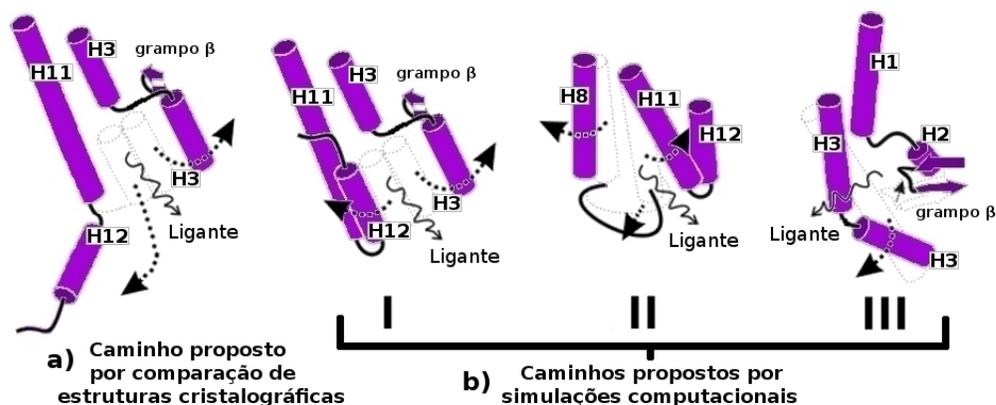


Figura 2.8. Representação dos possíveis caminhos de dissociação e associação em NRs. Em (a) é mostrado o caminho proposto pelo mecanismo da ratoeira. Em (b) são mostradas propostas mais recentes, obtidas por simulações computacionais. São representados apenas os elementos de estrutura secundária do LBD envolvidos nos caminhos de dissociação.

exemplo, foi mostrado que para dissociação de ligantes no TRs, o caminho III é mais favorável [35]. Já para o ER α , os caminhos I e II se mostraram mais frequentes, sendo o caminho I o mais provável para a dissociação quando ER se encontra dimerizado [38].

Realizada a introdução geral sobre NRs, a seguir é apresentado um resumo mais específico das principais características de dois NRs importantes para esta Tese de Doutorado: receptor de hormônios tireoideanos e receptor de estrogênios.

2.4 Receptor de hormônios tireoideanos

TR atua em todos os órgãos e vias metabólicas, influenciando tanto na diferenciação celular e no desenvolvimento de tecidos de organismos jovens (como do sistema nervoso central), como no controle de vários processos metabólicos, entre eles: consumo de oxigênio, regulação da temperatura corporal, frequência cardíaca, controle do nível de colesterol, e também no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídeos [66–68].

Existem dois grupos de subtipos do TR, conhecidos como TR α e TR β . Eles apresentam alta similaridade nas estruturas primária e terciária, mas estão presentes em concentrações diferentes nos tecidos do organismo onde este receptor atua. O TR α é mais encontrado no coração, sendo um dos responsáveis pelo controle da frequência cardíaca. O TR β tem maior concentração no fígado, sendo sua atuação mais relacionada ao metabolismo de lipídeos.

A regulação de ambos os subtipos do TR é efetuada pela ligação dos hormônios tireoideanos que existem, principalmente, em três formas: tiroxina (T4), triiodotironina (T3) e ácido triiodo-tiroacético (TRIAC). Suas estruturas são mostradas na Figura 2.9. O T3 é a forma mais ativa, sendo formado pela 5' desiodação do T4, forma produzida na glândula tireóide e de maior concentração no organismo. O TRIAC é formado na primeira etapa de oxidação do T3, necessário para eliminação dos hormônios tireoideanos do corpo. O TRIAC possui maior afinidade pelo TR β que pelo TR α , sendo assim β -seletivo. Os hormônios T3 e T4 não apresentam seletividade por nenhum dos subtipos.

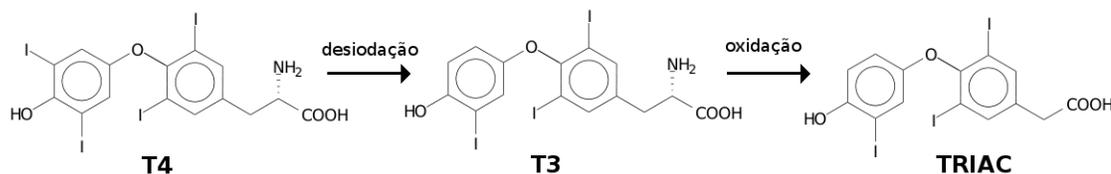


Figura 2.9. As três formas de hormônio tireoideano: T4, a forma mais abundante, produzida na tireóide; T3, a forma mais ativa, produzida pela 5'-desiodação do T4; TRIAC, metabólito β -seletivo formado na oxidação do T3.

O sítio de ligação do LBD do TR é formado essencialmente por resíduos hidrofóbicos, além de poucas, mas importantes interações hidrofílicas nas extremidades do ligante, mostradas na Figura 2.6. Todo este conjunto de interações forma uma cavidade de volume e forma específicas com alta afinidade aos pelos hormônios tireoideanos (K_d da ordem 10^{-9} M) [69–71]. Apenas um resíduo de aminoácido neste sítio distingue TR α do TR β : no TR α existe uma serina na posição 277 (S277), já no TR β a posição correspondente, 331, é ocupada por um resíduo de asparagina (N331). Esta única alteração provoca alterações no volume do sítio de ligação, bem como nas interações e na mobilidade dos ligantes, que podem explicar a seletividade por um dos subtipos [69, 72–75].

Vários estudos envolvendo TR estão focados no desenvolvimento de ligantes agonistas β -seletivos, que poderiam ser utilizados no tratamento de obesidade e de hipercolesterolemia (colesterol alto) [70, 76–81]. Já ligantes antagonistas para ambos os subtipos podem ser importantes para tratamento de outras disfunções tireoideanas, em especial doença de Graves e hipertireoidismo [52, 53, 82]. As pesquisas de ligantes agonistas β -seletivos e antagonistas ainda não resultaram numa aplicação concreta, de maneira que não existem fármacos no mercado que têm TR como alvo [83]. Na verdade, as exceções são os próprios hormônios tireoideanos naturais, utilizados para terapias de reposição hormonal em pacientes com hipotireoidismo.

Além dos estudos relacionados à afinidade e seletividade de ligantes, problemas mais fundamentais a respeito da estrutura, dinâmica e função do TR são extremamente importantes, não só ao desenho de novos fármacos, mas ao maior entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na atuação desta proteína na regulação da transcrição. Neste contexto, uma questão ainda sem resposta é a elucidação da estrutura do TR sem ligantes (*apo*-TR) [84], conhecimento essencial para o entendimento das alterações decorrentes da associação dos hormônios e que, por consequência, levam à dissociação de CoRs e a associação de CoAs.

Outra recente e ainda não publicada descoberta que também pode revolucionar o conhecimento sobre TRs, e mesmo outros NRs, é a existência de um segundo sítio de ligação dos hormônios tireoideanos, verificado através de estruturas cristalográficas do LBD do TR α , obtidas pelo grupo do Prof. Dr. Igor Polikarpov (USP-SC). Ainda não se sabe se este sítio apresenta importância funcional, especialmente porque não foi possível determinar experimentalmente sua afinidade.

Por último, mas não menos importante, é o estudo de mutações do TR. Mutações são utilizadas para melhor entendimento funcional dos domínios e motivos estruturais de NRs [39, 41, 42, 85, 86]. Além dessa importância, mutações naturais estão relacionadas a uma doença hereditária conhecida como síndrome de resistência ao hormônio tireoideano, caracterizada pela resposta reduzida de diferentes tecidos aos hormônios tireoideanos, apesar das suas concentrações séricas elevadas [68, 87, 88]. A maioria dos indivíduos com esta síndrome possui mutações no LBD do TR β . Pouco se conhece como as mutações da RTH alteram a estrutura e a dinâmica do LBD do TR β , já que poucas estruturas cristalográficas foram obtidas.

2.5 Receptor de estrogênios

A associação dos hormônios estrogênicos aos ERs regula a transcrição de diversos genes especialmente importantes à vida da mulher, tal como os envolvidos no desenvolvimento das características sexuais durante a puberdade e no controle da gestação, amamentação e menopausa [89–91]. Existem três principais tipos de estrogênios naturais: estrona (E1), estradiol (E2) e estriol (E3). Suas estruturas estão representadas na Figura 2.10. Todos eles são hormônios esteroidais, tal como a progesterona e a testosterona. A numeração nas siglas refere-se ao número de hidroxilas existente na molécula.

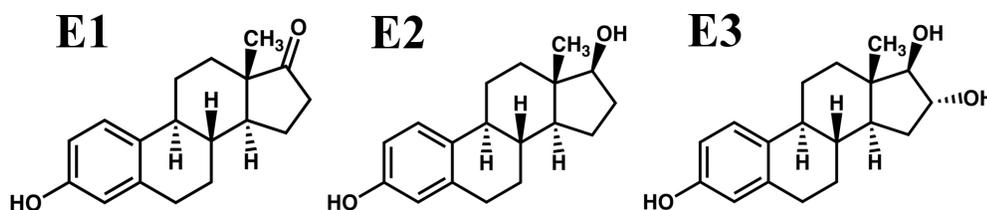


Figura 2.10. As três formas de hormônios estrogênio: E1, forma mais abundante na menopausa; E2, forma mais ativa, presente durante os anos reprodutivos; E3, forma mais predominante na gravidez.

E2 é o estrogênio mais importante, sendo o hormônio predominante em termos de concentração sérica durante os anos reprodutivos. Durante a gravidez, o E3 passa a ser predominante, enquanto E1 é o mais abundante na menopausa. Independente das concentrações ao longo da vida, E2 é o estrogênio de maior atividade, tendo cerca de 50 vezes mais afinidade que a estrona e 20 vezes mais que a estriol [92]. Os estrogênios E1 e E2 são sintetizados principalmente nos ovários por aromatasas, a partir dos androgênios androstenediona e testosterona, respectivamente.

Os estrogênios são utilizados em pílulas anticoncepcionais (em conjunto ao hormônio progesterona), dado que estão relacionados com o ciclo menstrual. A baixa concentração destes hormônios no corpo é responsável pelos sintomas desagradáveis da menopausa (osteoporose, insônia, aumento na taxa de colesterol, ondas de calor, irritabilidade, entre outros). A terapia de reposição hormonal e a complementação alimentar à base de soja (rica em fitoestrogênios) têm sido

utilizadas no controle destes sintomas. No entanto, estrogênios estimulam a multiplicação das células do útero e da mama e a ingestão continuada destes pode levar ao aparecimento de câncer [89–91].

O desenvolvimento de fármacos para tratamento de câncer de mama (tal como o tamoxifeno) baseia-se na síntese de moléculas que se associem ao ER, mas que tenham atividade repressora (antagonismo), o que acarreta na redução da multiplicação de células tumorais. Por outro lado, no desenvolvimento de fármacos para tratamento de osteoporose, comum no período pós-menopausa da mulher, procura-se sintetizar moléculas agonistas (por exemplo, o fármaco raloxifeno), que estimulem a multiplicação do tecido ósseo. É de fundamental importância entender os mecanismos de ação no nível molecular destes ligantes para o desenvolvimento de novos fármacos que tenham atividades receptor/tecido-específicas [46, 49, 91, 93, 94].

Um aspecto inusitado do desenvolvimento de fármacos para ERs são os chamados moduladores seletivos do receptor de estrogênios (SERM). Eles constituem uma classe de ligantes capazes de agir tanto como agonistas ou antagonistas, dependendo do tecido em que atuam [49, 91, 93, 94]. Uma das possíveis explicações para tal comportamento pode ser diferenças nas concentrações predominantes de CoRs e CoAs nos diferentes tecidos [91, 95], além da localização destes nos diversos compartimentos celulares.

Existem basicamente dois subtipos de ERs, denominadas $ER\alpha$ e $ER\beta$. Suas estruturas tridimensionais são muito parecidas apesar de haver apenas 47% de identidade entre as estruturas primárias. Existem apenas dois resíduos hidrofílicos no sítio de ligação dos ERs, sendo eles localizados nas extremidades da cavidade, tal como mostra a Figura 2.6. O restante dos resíduos do sítio de ligação é hidrofóbico e extremamente conservado entre os dois subtipos do ER. Existem apenas dois resíduos que se diferenciam no sítio de ligação: L384 e M421 no $ER\alpha$ são trocados por M336 e I373 no $ER\beta$. Estas trocas de resíduos levam a pequenas mudanças no formato e volume da cavidade, o que tem se mostrado suficiente para o desenvolvimento de ligantes seletivos [65, 91, 96, 97].

Até pouco tempo atrás pouco se conhecia sobre a função do subtipo β . Estudos recentes têm demonstrado que, na presença de ligantes considerados agonistas, este subtipo tem a função de reprimir parcialmente alguns genes ativados pelo $ER\alpha$ [98].

O ER β pode ser assim um importante alvo para desenvolvimento de fármacos, em especial, para o tratamento de câncer.

O fato do ER β reprimir a transcrição de genes é intrigante. Isto indica que mesmo quando associado a ligantes ditos agonistas, de alguma forma o receptor tem menor interação com os CoAs. A estrutura cristalográfica do ER β associada à E2 (código PDB: 3OLS) mostra a H12 em posição fechada, semelhante a observada em todos os NRs com ligantes agonistas, tal com o ER α . Como então ER β poderia inibir a transcrição?

Uma nova estrutura cristalográfica obtida pelo grupo do Prof. Dr. Igor Polikarpov poderia responder essa questão. Nesta estrutura, o LBD do ER β ligado ao E2 está numa conformação alternativa, que impediria a associação com CoAs. Porém, existe a séria possibilidade desta conformação ter sido induzida pelo empacotamento cristalino. Seria esta conformação estável ou um artefato cristalográfico? Simulações computacionais envolvendo esta estrutura, de maneira a verificar a estabilidade desta conformação frente à conhecida estrutura agonista, podem ajudar a responder esta questão.

Capítulo 3

Objetivos

Como foi descrito em boa parte do Capítulo anterior, NRs têm sido estudados tanto para o desenvolvimento de fármacos, como para o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na execução de suas funções biológicas. Esta Tese de Doutorado visou contribuir com ambos os aspectos, tendo como objetivos a realização dos seguintes estudos:

1. Contribuir para maior entendimento da importância de um novo sítio de ligação no LBD do TR.
 - a) Estudar a estrutura e a dinâmica do novo sítio de ligação, através de simulações de MD.
 - b) Determinar a afinidade (ΔG de dissociação) dos hormônios T3 e T4 pelo segundo sítio de ligação, através de duas metodologias:
 - b.1) Integração Termodinâmica e o método da Força Adaptativa.
 - b.2) Igualdade de Jarzynski e múltiplas simulações de Dinâmica Molecular por Caminho Induzido.
2. Obter um modelo estrutural para o LBD do *apo*-TR através de simulações de MD guiadas por resultados experimentais de troca de hidrogênio/deutério.
3. Elucidar as razões moleculares envolvidas nas alterações da atividade transcritucional de duas mutações do TR, M369R e P452L, através de simulações de MD.

4. Determinar a estabilidade relativa (ΔG conformacional) entre a conformação agonista (clássica) e a nova conformação (alternativa) do ER β através de Integração Termodinâmica e do método da Força Adaptativa.

A seguir é descrita uma fundamentação teórica da dinâmica molecular de proteínas e das técnicas computacionais utilizadas nesta Tese.

Capítulo 4

Dinâmica molecular de proteínas

A constatação de que desnaturação de uma proteína acarreta também à perda de sua função mostra que a estrutura tridimensional é essencial para que estas biomoléculas desempenhem seu papel nos processos biológicos [16, 17, 99]. As primeiras duas estruturas de proteína determinadas foram mioglobina e hemoglobina, obtidas por Kendrew [100, 101] e Perutz [102, 103], respectivamente, o que lhes rendeu o prêmio Nobel de Química de 1962. Desde então, o entendimento da função das proteínas em nível atômico foi revolucionado pela difração de raios-X, resultando em um extraordinário aumento dos estudos da relação estrutura-função [104]. Porém, a visualização da estrutura de proteínas pode ser enganosa sugerindo que uma única estrutura nativa é a resposta final para o entendimento da função. Para entender completamente as proteínas em ação, a quarta dimensão, o tempo, deve ser adicionada às imagens estáticas desta biomolécula.

Nas décadas de 70 e 80, a atividade biológica das proteínas começou a ser relacionada à sua dinâmica molecular e não apenas à sua estrutura [105]. Os estudos deste período ajudaram a esclarecer a natureza, a cinética e a função de suas flutuações estruturais. Como as proteínas são grandes estruturas densamente agrupadas, seus movimentos atômicos foram comparados, inicialmente, aos de outros materiais densos. Flutuações pequenas e locais, que ocorrem em tempos curtos (na ordem de *ps* à *ns*), teriam comportamento semelhante ao das moléculas de um líquido. Em geral, estes movimentos se caracterizam por rotações de cadeias laterais da superfície (*ps*) ou do interior (*ns*) da proteína, além do movimento de

loops (ns), sendo as barreiras energéticas envolvidas de até um $1 k_B T$ ⁶ (Figura 4.1A) [105, 106].

Já movimentos de maior amplitude e coletivos, que ocorrem contra as forças que estabilizam as estruturas nativas e em tempos maiores (de μs à ms), foram comparados aos do estado sólido. Eles se caracterizam pelo movimento coletivo de um grande número de átomos, tal como os contidos em motivos ou mesmo domínios inteiros da proteína, com barreiras energéticas de vários $k_B T$ (Figura 4.1A). De especial importância, é na verdade, o forte acoplamento observado entre deslocamentos locais e coletivos. Acredita-se que este acoplamento pode governar o caráter de muitos processos de ligação a outras biomoléculas (substratos, hormônios, etc.), além de outras transformações estruturais essenciais para a função biológica [105, 106]. Apesar dos avanços obtidos por essa perspectiva, o estudo de proteínas não se limita apenas ao entendimento do comportamento no equilíbrio termodinâmico. A dinâmica molecular de proteínas (ou de qualquer sistema), de um ponto de vista mais amplo, pode ser separada em dois tipos de movimentos: flutuações no equilíbrio e processos de relaxação (ambos podendo envolver movimentos locais e/ou coletivos) [106].

Os processos de relaxação envolvem alterações estruturais de um sistema fora de equilíbrio termodinâmico. Nesta condição, o sistema move-se em direção ao equilíbrio. Sistemas fora do equilíbrio podem ser gerados, por exemplo, por reações químicas, por alterações de temperatura ou de pressão. Além disso, vale salientar que sistemas vivos estão sempre fora do equilíbrio (já que a condição de equilíbrio é a morte). Entre os exemplos deste tipo de movimento, destacam-se as alterações durante o enovelamento (processo onde a proteína adquire sua estrutura terciária ou quaternária típica) e a desnaturação, além dos movimentos decorrentes da dissociação e associação a ligantes ou de reações químicas catalisadas por enzimas (processos da ordem de ms à s) (Figura 4.1A).

Atualmente, a teoria moderna que fundamenta a dinâmica molecular de proteínas é chamada Teoria da Paisagem Energética (*Energy Landscape Theory*) [107–110]. Curiosamente, esta teoria também se inspirou na comparação das proteínas com

⁶ $k_B T$ é o produto da constante de Boltzmann, k_B , e da temperatura, T . Este produto é usado na Física e na Química como um factor de escala para os valores de energia em sistemas atômico-moleculares, sendo igual a $0,593 \text{ kcal.mol}^{-1}$

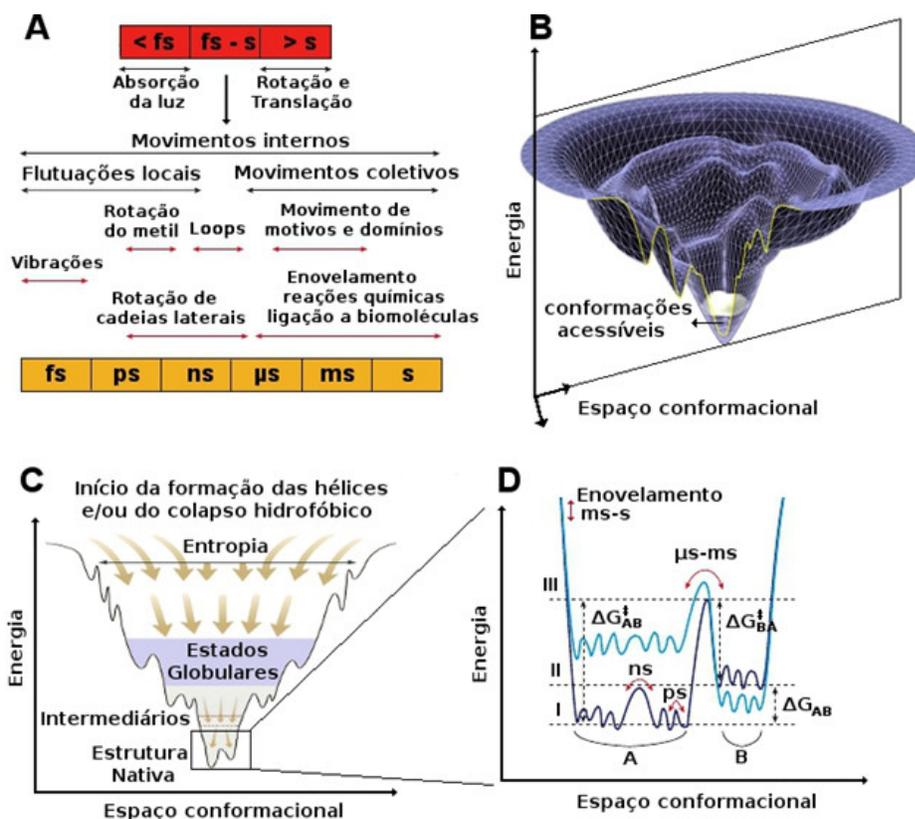


Figura 4.1. (A) Escala de tempo dos principais tipos de movimentos em proteínas; (B) Exemplo de topografia da superfície de energia potencial de uma proteína. As conformações acessíveis nas condições fisiológicas de temperatura e pressão estão em branco; (C) Um corte da superfície de energia global mostrada em (B), destacando as principais etapas do enovelamento; (D) Ampliação da região da superfície contendo os estados enovelados (estado nativo) acessíveis nas condições fisiológicas. Diferentes níveis de energia estão envolvidos com movimentos em diferentes escalas de tempo.

um dos estados densos da matéria, o estado vítreo [107]. A paisagem energética de um proteína corresponde à topografia de sua superfície de energia potencial contendo todos os estados conformacionais acessíveis, desde os estados desenovelados até a estrutura nativa (ou melhor, ao conjunto de estruturas acessíveis nas condições fisiológicas). Em geral, para a grande maioria das proteínas, esta topografia se assemelha a um “funil rugoso” onde cada ponto sobre esta superfície representa uma conformação específica possível para a proteína (Figuras 4.1B e

4.1C). Quanto mais próxima a estrutura encontra-se do estado nativo, mais baixas são as energias dessas estruturas.

Quanto mais longe do estado nativo, maior o número de conformações com a mesma energia e, conseqüentemente, maior a entropia do sistema. A temperatura determina quantas conformações desta superfície são acessíveis e a população em cada um dos estados. Mudanças no volume (logo, na densidade), no meio líquido (por exemplo, na força iônica) ou a própria ligação às outras moléculas (substratos, hormônios, cofatores, proteínas, etc.) resultam em alterações dessa superfície. Mutações ou outras alterações pós-transcricionais também têm este efeito [106, 110, 111]. A região da superfície que caracteriza uma proteína enovelada, em geral, pode ser caracterizada por diferentes níveis de energia, como destacado nas Figuras 4.1C e 4.1D. Os níveis I, II e III destacados na Figura 4.1D caracterizam os estados acessíveis a uma proteína sob condições fisiológicas específicas. Um estado é definido como um mínimo na superfície de energia, enquanto que um estado de transição é o máximo entre os poços de mínimo [106, 110, 111].

O nível III caracteriza poucos estados discretos de uma proteína como, por exemplo, as conformações características da proteína livre (A) e as conformações características da proteína quando ancorada a um ligante (B). As populações dos estados A e B são definidas pelas distribuições de Boltzmann com base na sua diferença em energia livre (ΔG_{AB}). A barreira entre esses estados determina a taxa de interconversão, sendo caracterizada por movimentos coletivos e lentos (μs à ms). Os níveis I e II descrevem flutuações mais rápidas (ps à ns) entre um grande número de subestados intimamente relacionados dentro de cada estado do nível III. Dado o enorme número de subestados, estes são melhor descritos de maneira estatística e contínua e não discreta como no nível III. Os níveis I e II estão intimamente relacionados à associação e dissociação de ligantes, processo em que é necessária a difusão desta biomolécula pelo interior da proteína [106, 108].

Uma mudança no sistema, como a associação de um ligante, irá alterar a topografia da superfície, de maneira a deslocar o equilíbrio entre os estados A e B, como exemplificado na Figura 4.1D (alteração da curva azul escuro para a azul claro, ou vice-versa). Conclusões importantes de recentes estudos experimentais mostram que os estados A e B existem tanto na proteína livre como na ancorada a um ligante. O ligante pode apenas deslocar o equilíbrio na direção de um dos

estados, como consequência da alteração da superfície de energia [106, 110, 111].

Abaixo do nível I, ainda existem outros níveis como os envolvendo vibrações das ligações covalentes [106, 110, 111]. Acima do nível III encontram-se os estados intermediários e de transição do próprio enovelamento da proteína (Figura 4.1C). O enovelamento, que pode ocorrer por múltiplos caminhos após a síntese de uma proteína, sendo espontâneo ou auxiliado por grandes complexos proteicos chamados chaperonas [16, 17, 99]. As características afunilada e rugosa da paisagem energética de proteínas são atribuídas a pressões evolucionárias opostas sobre suas estruturas primárias, tais como estabilidade e enovelamento rápido (afunilada) e flexibilidade para exercer a função (rugosa) [109, 110].

A dinâmica molecular de uma proteína é assim caracterizada pelo “navegar” da estrutura sobre sua superfície de energia ao longo do tempo. Apesar do astronômico número de conformações possíveis à cadeia polipeptídica, as proteínas se enovelam e realizam suas funções em uma escala de tempo biologicamente possível e não varrendo aleatoriamente as conformações (problema conhecido como paradoxo de Levinthal) [16, 17, 99]. Isso ocorre devido à existência de interações não aleatórias, mas direcionais (efeito hidrofóbico, ligações de hidrogênio, etc) que acabam por limitar o espaço conformacional realmente acessível, fazendo com que a proteína siga por caminhos preferenciais sobre esta superfície de energia.

Grande parte dos estudos atuais envolvendo proteínas encontra-se dentro deste contexto e faz uso de inúmeros métodos para desvendar as flutuações no equilíbrio dentro de um único estado ou mesmo entender os caminhos percorridos por parte de sua paisagem energética. Existem métodos experimentais capazes de acessar informação sobre diferentes estados de uma proteína, com resolução atômica, porém com apenas informações indiretas de sua dinâmica. Um exemplo típico neste sentido são os estudos de difração de raios X ou ressonância magnética nuclear de proteínas com e sem ligantes. Outros métodos, tal como as espectroscopias de dicroísmo circular e de fluorescência, fazem exatamente o oposto: podem possuir resolução temporal da ordem de *ns* à *fs*, mas fornecem apenas informações espaciais indiretas (ou seja, de baixa resolução atômica) do ponto de vista estrutural [106, 112]. A maioria destes experimentos é realizada obtendo resultados médios de um grande número de proteínas (da ordem do número de Avogadro), apesar de alguns poucos métodos já possibilitarem o estudo de uma única proteína (chamados

métodos *single molecule*, tal como os utilizados e associação com a espectroscopia de Transferência de Energia de Ressonância Förster) [106, 112, 113].

Dada à complexidade dos sistemas biológicos, os grupos de pesquisa têm optado por uma abordagem colaborativa e multidisciplinar, tentando explorar a complementaridade das técnicas experimentais disponíveis junto de estudos funcionais *in vivo*, levando esta área a um novo paradigma: as relações entre estrutura-dinâmica-função. Além do grande uso de experimentos, tal abordagem tem cada vez mais se apoiado em métodos teóricos de modelagem molecular onde, entre eles, destaca-se a técnica conhecida como simulação de MD. Simulações de MD são a única maneira de obter simultaneamente informações de uma única molécula, com alta resolução atômico e temporal de uma proteína em solução aquosa. É feito a seguir uma descrição sucinta desta técnica.

4.1 Simulações de Dinâmica Molecular

O primeiro estudo que idealizou e utilizou as simulações de MD foi realizado em 1957, por Alder e Wainwright [114]. Durante anos a técnica foi aplicada com sucesso para o estudo de gases e líquidos [115, 116]. Cerca de vinte anos depois destas pesquisas pioneiras, esta técnica passou a ser também utilizada para o estudo de proteínas. Curiosamente, os primeiros artigos já envolviam temas de pesquisas até hoje de extrema relevância, como: enovelamento de proteínas [117], flutuações no equilíbrio [118, 119] e associação de pequenas moléculas ao sítio de ligação de proteínas [120].

Atualmente, as técnicas de simulações computacionais por MD são de uso comum nas ciências naturais e nas engenharias, estando consolidadas na literatura [115, 116, 121–124]. A técnica baseia-se na determinação do movimento dos átomos constituintes do sistema de interesse a partir de conhecimento de uma configuração inicial, dos potenciais de interação e das equações de movimento. Além disso, a correta representação do sistema em um determinado estado termodinâmico exige uma série de aproximações, tal como o uso de condições periódicas de contorno, somas de Ewald, termostatos, entre outros. A seguir é realizada uma fundamentação teórica sucinta desta técnica, dando ênfase em alguns aspectos importantes envolvidos nas simulações de MD de sistemas proteicos.

4.1.1 Configurações iniciais

Uma das primeiras etapas para simular um sistema de partículas através de MD é a geração das configurações (coordenadas e velocidades) iniciais que estejam o mais próximo possível da representação de uma configuração do estado termodinâmico de interesse.

Isso é feito normalmente distribuindo as moléculas do sistema numa “caixa de simulação”, onde são consideradas restrições de proximidades (em torno de 2 Å, em líquidos à temperatura ambiente) para que não ocorra sobreposição de átomos, evitando assim forças extremamente repulsivas que dificultem a integração das equações de movimento. Em casos bem simples, como a simulação de um fluido isotrópico puro e homogêneo, o procedimento mais usual é colocar N moléculas em posições aleatórias dentro de um volume V , de maneira que as dimensões da caixa reproduzam a densidade numérica N/V , correspondente ao sistema real nas condições termodinâmicas desejadas [116].

Nos casos de misturas homogêneas ou heterogêneas também é importante que a caixa seja representativa do sistema macroscópico quanto à concentração das espécies presentes. A construção de caixas de simulação de sistemas mais complexos, como soluções de proteínas, não é possível sem o conhecimento prévio da estrutura inicial.

As estruturas terciárias de uma proteína podem ser obtidas a partir de diferentes técnicas, como cristalografia de proteínas, espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR) e estudos computacionais de modelagem por homologia. As estruturas determinadas experimentalmente são divulgadas no PDB, de livre acesso na internet. Normalmente, na obtenção de proteínas ou domínios grandes, tais como o LBD dos NRs, utiliza-se as estruturas obtidas por cristalografia de proteínas, já que apresentam altas resoluções, além de serem as únicas disponíveis para tais sistemas. As estruturas atômicas completas só podem ser obtidas nos casos em que a proteína apresenta estrutura bem rígida e quando forma cristais bem ordenados a partir de uma solução aquosa saturada [125]. Por outro lado, quando há regiões muito móveis, tal como *loops* muito desordenados e cadeias laterais de resíduos expostos ao solvente, apenas parte da estrutura proteica é determinada com resolução satisfatória. Os átomos de hidrogênio da estrutura que, além da

alta mobilidade, têm baixa densidade eletrônica, também não são capturados pela técnica.

Para a realização da MD de proteínas, problemas na estrutura terciária devem ser conhecidos e corrigidos da melhor maneira possível. A falta dos átomos de hidrogênio não é considerado um problema, sendo estes normalmente adicionados de acordo com a geometria usual dos resíduos (distâncias, ângulos e diedros de mínimo de energia) e das condições de pH que se deseja simular. Os *loops* e cadeias laterais faltantes podem ser obtidos a partir de uma estrutura de proteína homóloga à estudada ou serem modelados a partir da estrutura primária. Conhecida e corrigida a estrutura terciária da proteína em estudo, são adicionadas moléculas do solvente e contra-íons, de maneira a reproduzir a densidade do estado termodinâmico estudado, a concentração iônica da solução fisiológica onde se encontra a proteína e de manter a eletroneutralidade do sistema.

Além das coordenadas, o método de MD requer velocidades iniciais para todos os átomos na caixa de simulação. Uma maneira de obter estas velocidades é atribuí-las de forma aleatória a todos os átomos, através da distribuição de Maxwell-Boltzmann em que a energia cinética do sistema é determinada pela temperatura, segundo o vínculo

$$\frac{3}{2}Nk_B T = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N m_i v_i^2, \quad (4.1)$$

em que N é o número de átomos, k_B é a constante de Boltzmann e T é a temperatura. As variáveis m_i e v_i correspondem as massas e a velocidade escalar de cada átomo i , respectivamente [116, 124]. É importante ainda garantir que a soma dos momentos de todas as partículas do sistema seja um vetor nulo evitando, assim, o deslocamento da caixa de simulação.

4.1.2 Potenciais de interação

A descrição mais exata do movimento e das interações entre as partículas de um sistema atômico viria da resolução da equação de Schrödinger dependente do tempo [116]. A resolução desta equação ainda é inviável computacionalmente para sistemas grandes e complexos, tais como os de interesse químico e biológico. Problemas como estes são em geral tratados por modelos físicos de função potencial mais

simples. Nestes modelos, as interações intra e intermoleculares são representadas por potenciais efetivos clássicos entre átomos individuais (*all-atoms models*) ou entre grupos específicos de átomos (*united-atoms models* ou *Coarse-Grain models*) [116, 124].

Estes potenciais são dados por uma somatória de termos que descrevem as interações entre pares de átomos ligados (V^{intra}) e não ligados (V^{inter}) covalentemente, sendo conhecidos no conjunto como campo de força. A seguir, é mostrado, como exemplo, os típicos potenciais utilizados em campo de força clássico:

$$V^{total} = V^{intra} + V^{inter} \quad (4.2)$$

com

$$V^{intra} = \underbrace{\frac{1}{2} \sum_{est} K_r (r - r_0)^2}_{V^{est}} + \underbrace{\frac{1}{2} \sum_{ang} K_\theta (\theta - \theta_0)^2}_{V^{ang}} + \underbrace{\frac{1}{2} \sum_{n,died} K_\varphi [1 + \cos(n\varphi - \delta)]}_{V^{died}} \quad (4.3)$$

e

$$V^{inter} = \underbrace{\sum_{i,j} 4\varepsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right]}_{V^{LJ}} + \underbrace{\sum_{i,j} \frac{q_i q_j}{4\pi\varepsilon_0 r_{ij}}}_{V^{elec}}. \quad (4.4)$$

O primeiro e segundo termos na Equação 4.3 representam potenciais harmônicos de estiramento (V^{est}) e de deformação angular (V^{ang}) de ligações covalentes, enquanto o terceiro termo corresponde aos potenciais de torção diedral (V^{died}). As interações entre pares atômicos não diretamente ligados na molécula, bem como entre átomos em moléculas distintas são descritas pela soma de potenciais de Lennard-Jones e de Coulomb (Equação 4.4). O primeiro representa bem as interações repulsivas e dispersivas (V^{LJ}), de curto alcance, e o último as interações eletrostáticas (V^{elec}), segundo cargas parciais pré-determinadas.

Estas cargas e todos os outros parâmetros constantes destes potenciais, tal como distância de equilíbrio entre dois átomos (r_0) e constante de força elástica de estiramento (K_r), são calibrados de maneira a reproduzir algumas propriedades

do sistema em estudo. No campo de força CHARMM [126, 127], por exemplo, K_r e r_0 são obtidos através de informações experimentais (como Espectroscopia no Infravermelho e Raman) e, principalmente, de informações geradas em cálculos quânticos de pequenas moléculas que, em geral, representam grupos de moléculas maiores (tal como cadeias laterais de um resíduo de aminoácido de uma proteína). O processo de obtenção destes parâmetros é conhecido como parametrização, sendo diferente para cada campo de força. Existem diversos potenciais efetivos clássicos e parâmetros já desenvolvidos especificamente para proteínas, sendo OPLS [128, 129], GROMOS96 [130], CHARMM e AMBER [131] os mais utilizados.

Vale destacar que apesar de os campos de força serem potenciais efetivos simples, em muitos casos eles possibilitam melhor representação de propriedades macroscópicas que cálculos quânticos [132]. Apesar disso, sua aplicabilidade é limitada apenas para sistemas onde não ocorram a quebra e/ou formação de ligações químicas ou ainda grandes alterações na polarização da densidade eletrônica das moléculas.

4.1.3 Equações de movimento

Uma vez geradas as configurações iniciais e definidos os potenciais de interação a serem utilizados, o princípio das simulações de MD através de uma descrição de mecânica clássica é bem simples e formalmente tão correto quanto a mecânica quântica, uma vez que a maioria dos átomos têm massa relativamente pesada⁷ e que as propriedades do sistema em estudo sejam governadas por processos que envolvem energias da ordem de $k_B T$, sem ocorrerem reações químicas ou transições eletrônicas [116].

Dado um conjunto de coordenadas para todos os átomos do sistema, é possível calcular as forças que atuam sobre cada um deles pelas equações que descrevem os potenciais de interação, onde $\vec{F}_i(t) = -\nabla_{r_i} \vec{V}^{total}(t)$. De acordo com a segunda lei de Newton, podemos calcular as acelerações (\vec{a}) de cada átomo, a partir dos

⁷Isso não é verdade para uma descrição satisfatória das vibrações de ligações envolvendo o átomo de hidrogênio. Esta é uma das razões pelo qual, usualmente, são consideradas-se rígidas as distâncias e ângulos de ligação envolvendo este átomo nas simulações

potenciais de interação (\vec{V}^{total}) e da massa (m), através da Equação 4.5.

$$-\nabla\vec{V}^{total}(t) = m\vec{a}_i(t). \quad (4.5)$$

Com um conjunto definido de coordenadas ($\vec{r}_i(t)$), velocidades ($\vec{v}_i(t)$) e acelerações ($\vec{a}_i(t)$) iniciais para cada partícula (subscrito i), é possível determinar as configurações no instante seguinte, $t + \delta t$. Existem vários métodos de integração das equações de movimento adequados para obtenção destas novas configurações, sendo o mais utilizado o algoritmo *Velocity-Verlet* [133–135]. Neste algoritmo, as novas posições ($\vec{r}(t + \delta t)$) são determinadas pela Equação 4.6.

$$\vec{r}_i(t + \delta t) = \vec{r}_i(t) + \vec{v}_i(t)\delta t + \frac{\vec{a}_i(t)\delta t^2}{2} \quad (4.6)$$

A partir das novas coordenadas ($\vec{r}_i(t + \delta t)$), novas acelerações ($\vec{a}_i(t + \delta t)$) podem ser obtidas pela Equação 4.5. Das novas coordenadas e acelerações, é possível obter novas velocidades ($\vec{v}_i(t + \delta t)$) através da Equação 4.7.

$$\vec{v}_i(t + \delta t) = \vec{v}_i(t) + \frac{[\vec{a}_i(t) + \vec{a}_i(t + \delta t)]\delta t}{2} \quad (4.7)$$

Obtidas as novas coordenadas, velocidades e acelerações, é possível reiniciar o ciclo [115, 116, 124]. A repetição deste procedimento leva à obtenção da trajetória de todas as partículas do sistema ao longo do tempo. Tanto os erros de truncagem⁸, como os de arredondamento⁹ são reduzidos com a redução do δt . Entretanto, a redução de δt também aumenta o custo computacional, sendo necessário um compromisso deste com exatidão do resultado obtido. Em geral, valores de δt de 0,5 à 2,0 *fs* são os mais utilizados neste compromisso.

⁸Erros de truncagem estão relacionados a exatidão do método de integração das equações de movimento utilizado, que são baseados em expansões em séries de Taylor truncadas. Eles são assim intrínsecos do algoritmo utilizado. No caso do algoritmo *Velocity-Verlet*, tais erros são da ordem de $O(t^4)$.

⁹Erros de arredondamento estão relacionados com implementação particular do algoritmo e com a compilação utilizada.

4.1.4 Condições periódicas de contorno, raio de corte e soma de Ewald

Com tudo o que foi descrito até aqui já seria possível, em teoria, realizar a simulação de MD de um sistema atômico de várias partículas, até mesmo da ordem do número de Avogadro ($6,023 \times 10^{23}$), durante o tempo que se quisesse. Todavia, limitações computacionais não permitem isso, sendo necessário impor limitações espaciais (nas dimensões da caixa de simulação), temporais (no tamanho da trajetória obtida) e aproximações para representação do sistema no estado termodinâmico de interesse.

Do ponto de vista prático, para simular um sistema através de MD, inicialmente é preciso criar uma caixa de simulação que encerre um número de moléculas N que varia entre 10^3 e 10^7 átomos, dependendo do problema a ser estudado e dos recursos computacionais disponíveis ao grupo de pesquisa. São números muito pequenos se comparados às amostras que são analisadas em laboratório. Com isso, a presença de moléculas nas fronteiras da caixa é bastante significativa. Em termos do número médio de interações, as partículas nos limites da caixa de simulação são distintas das partículas cercadas por outras, no seu interior. Assim, quando se deseja conhecer as propriedades no seio de uma amostra, algumas técnicas específicas devem ser aplicadas.

Condições periódicas de contorno são frequentemente empregadas para eliminar os efeitos de superfície. A caixa de simulação é envolta por cópias idênticas em todas as direções, infinitamente, formando um sistema que, embora periódico, tenda ao limite termodinâmico. As partículas nas réplicas se movimentam de maneira igual a célula original. Não existem barreiras nas fronteiras das células e, portanto, não há moléculas na superfície [116, 124].

O cálculo de interações entre átomos é a parte mais cara de simulações de MD. A princípio, é preciso incluir todas as interações entre uma dada molécula na caixa de simulação com todas as demais, inclusive nas réplicas ao redor. Isto implicaria em um número infinito de termos, o que seria de impossível resolução na prática. Se as forças envolvidas forem de curto alcance, pode ser aplicada a convenção da imagem mínima. Considera-se que determinada molécula ocupa a posição central em uma região de mesmo tamanho e forma da caixa de simulação. Esta molécula interage apenas com as $N - 1$ demais moléculas situadas no interior desta região.

Para reduzir ainda mais o custo computacional da simulação, emprega-se também a aproximação do raio de corte esférico (chamado de *cutoff*). Isto é, o potencial decai a zero quando a distância entre os pares é maior que o raio de corte pré-estabelecido. É preciso que este seja grande o suficiente para não introduzir erros significativos, mas não maior do que metade do lado da caixa de simulação, por consistência com a convenção da imagem mínima. A Figura 4.2 mostra uma representação bidimensional de um sistema periódico, esquematizando a aplicação da convenção da imagem mínima e de um raio de corte para as interações de curto alcance.

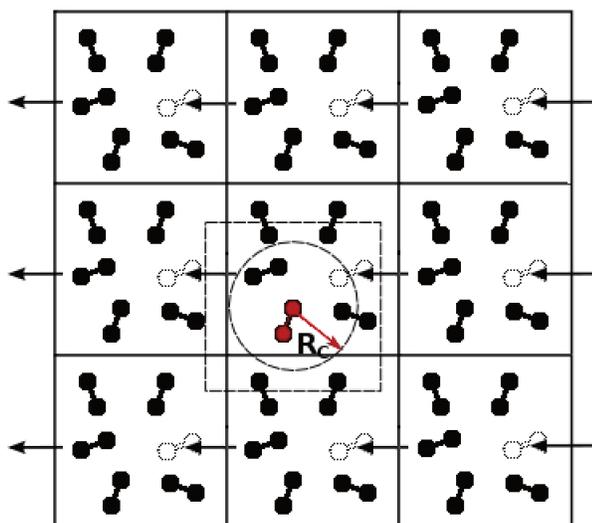


Figura 4.2. Representação de um sistema periódico bidimensional. As partículas podem entrar ou sair de cada caixa atravessando qualquer um dos lados. Na caixa central destaca-se a condição da imagem mínima (quadrado tracejado) e o raio de corte (circunferência tracejada) em relação ao átomo de uma das moléculas.

Para o tratamento de interações de longo alcance, como as interações coulômbicas, a imposição de um raio de corte é problemática, especialmente em líquidos associativos, como soluções aquosas. Uma opção muito empregada é a substituição das forças de interação entre pares por uma força efetiva, segundo o método de soma de Ewald. Neste método, são calculadas as interações de cada partícula com todas as outras da caixa de simulação e com todas as imagens em um sistema periódico

infinito. A Equação 4.8

$$V = \frac{1}{2} \sum_n^{\infty} \left(\sum_{i,j}^N \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 |r_{ij} + n|} \right). \quad (4.8)$$

mostra a soma sobre n que abrange todas as células cúbicas, $n = (n_x L, n_y L, n_z L)$ (sendo L a dimensão de uma caixa cúbica), excluindo aquela em que $i = j$ quando $L = 0$. À medida que os termos vão sendo adicionados, o sistema tende, no infinito, a ser quase esférico. No método de soma de Ewald, a somatória das imagens descrita pela Equação 4.8 é reorganizada em camadas esféricas concêntricas, podendo ser resolvida desde que o sistema seja eletricamente neutro. Para o conhecimento mais aprofundado do tema, remete-se o leitor às referências [115, 122, 124].

4.1.5 Escolha do ensemble

Para especificar as condições termodinâmicas sob as quais a “experiência” no computador é executada, alguns parâmetros macroscópicos podem ser mantidos constantes, como temperatura, T , pressão, P , volume, V , número de partículas, N , e potencial químico μ . Sendo a simulação uma amostragem ampla de configurações do sistema, conjuntos desses parâmetros definem diferentes *ensembles*.

A trajetória gerada apenas pelas Equações 4.5, 4.7 e 4.6 descreve um sistema conservativo, o que sem mudanças de concentração dos componentes corresponde ao *ensemble NVE* (ou microcanônico - número de partículas, volume e energia total do sistema são mantidos constantes). Uma simulação neste *ensemble* corresponde a um processo adiabático totalmente reversível, sem troca de calor com o meio externo. Assim, o sistema evolui no tempo com variações de energia potencial e cinética, mas mantém-se a energia total conservada.

Entretanto, para que a energia E corresponda ao estado termodinâmico de interesse, é necessário termalizar (ou equilibrar) o sistema com simulações preliminares com ajuste de temperatura no *ensemble* canônico, *NVT*, ou no *ensemble* isotérmico-isobárico, *NPT*. Neste último, além de um termostato, acopla-se um barostato à simulação. Além da equilibração, o *ensemble NPT* tem ampla aplicabilidade, uma vez que a maioria dos processos químicos e biológicos são estudados experimentalmente sob pressão e temperatura constantes. Existem vários algorit-

mos para o controle da temperatura e/ou da pressão, sendo os mais utilizados o de Berendsen, Nöse-Hoover e Langevin [115, 121–124].

4.1.6 Cálculo de propriedades

Terminada uma simulação, dispõe-se de um conjunto de coordenadas (e velocidades, caso tenham sido armazenadas) que representam a evolução temporal do sistema, nas condições termodinâmicas que se deseja representar. A partir da média temporal de uma grandeza calculada ao longo de uma trajetória de MD suficientemente extensa é possível obter várias propriedades microscópicas e macroscópicas do sistema.

Na prática, isso só pode ser feito para sistemas simples ou para propriedades que convergem rapidamente. Nas simulações de MD de equilíbrio envolvendo sistemas proteicos, as trajetórias obtidas usualmente limitam-se ao cálculo de médias e flutuações de propriedades estruturais e dinâmicas microscópicas de um determinado estado do sistema, tal como a proteína enovelada. Entre estas propriedades, é usual o cálculo do raio de giração, conteúdo da estrutura secundária, solvatação e, especialmente, da raiz do deslocamento médio quadrático (RMSD, para *root mean square deviation*) dos átomos do sistema. O RMSD é comumente utilizado em proteínas como uma medida da mobilidade dos átomos (se calculado em relação a média estrutural) ou ainda com uma medida das diferenças estruturais em relação a uma referência específica [116]. Além destas propriedades, vários outros parâmetros geométricos e energéticos relacionados ao problema particular em estudo são utilizados, como distâncias, ângulos e energia de interação entre grupos de átomos.

Para o cálculo de propriedades termodinâmicas (macroscópicas) seriam necessárias trajetórias envolvendo escalas de tempo de μs à s (dependo da proteína em estudo), logo, muito longas para a atual capacidade computacional dos grupos de pesquisa. Do ponto de vista da Teoria da Paisagem Energética de proteínas, isto seria equivalente a obter todas as conformações da superfície de energia que sejam acessíveis a uma dada condição de temperatura e pressão. Nestes casos, em geral é necessário o uso de uma série de novas metodologias para aumentar a amostragem, além do atual limite computacional das simulações de MD tradicionais [124, 136].

A diferença de energia livre de Gibbs (ΔG) ao longo de um processo é uma das propriedades em que se necessita uma amostragem ampliada do espaço de fase, sendo este tema descrito à seguir.

4.2 Cálculos teóricos de diferenças de Energia Livre

Como seria possível prever se um hormônio liga-se a determinado sítio de seu receptor? Ou ainda, como saber qual conformação de uma proteína seria mais estável? Se a variação da entropia é o conceito básico da termodinâmica para o entendimento do sentido das mudanças espontâneas entre dois estados num sistema, a variação da energia livre (ΔG para *ensemble NPT*) poderia ser considerada o conceito “prático”, que permite obter experimental ou teoricamente estas respostas. Durante qualquer graduação em ciências naturais e engenharias, é mostrado na termodinâmica clássica algumas maneiras de obter ΔG entre dois estados, umas mais úteis que outras dependendo do sistema estudado. Para uma transformação que não envolva expansão ou compressão volumétricas do sistema, é possível demonstrar que ΔG é igual trabalho (W) para transformar um estado (ξ_0) em outro (ξ_1), desde que este seja feito através de um processo reversível [137, 138], como expresso pela Equação 4.9.

$$\Delta G = W_{rev} = \int_{\xi_0}^{\xi_1} \vec{F} \cdot d\vec{\xi} \quad (4.9)$$

As questões levantadas no início do parágrafo anterior são exemplos de processos que podem ocorrer através de trabalhos não expansivos (sem variação de volume). Um exemplo teórico de aplicação direta da equação 4.9 é o cálculo do ΔG para afastar duas partículas no vácuo (ou em solvente implícito). Isto pode ser feito calculando-se o trabalho reversível analiticamente, ao igualar a força \vec{F} ao valor negativo da derivada do potencial de interação entre as partículas na Equação 4.9.

Para sistemas mais complexos, como líquidos e soluções de biomoléculas, não existe maneira analítica de obter \vec{F} . Uma possibilidade numérica seria através de simulações de MD adaptadas para amostrar a \vec{F} ao longo da coordenada de reação $\vec{\xi}$ (que se refere a um dos possíveis “caminhos” que leva de um estado a outro). De fato, já existem metodologias baseadas em formalismos similares a Equação 4.9,

umas mais adaptadas que outras ao problema que se deseja estudar [136].

Para os objetivos desta Tese, onde se buscou obter o ΔG em problemas onde não existe qualquer dado experimental de referência (que podem ser utilizados para calibração de algumas metodologias [139]), dois novos conjuntos de métodos têm se destacado: método da Força Adaptativa [140–143] e os métodos de não-equilíbrio baseados na igualdade de Jarzynski [144, 145] e nas simulações de MD por Caminho Induzido [33, 146–148]. Apesar de basearem-se em concepções teóricas bem distintas, ambas podem ser consideradas maneiras de obter o trabalho da transformação entre dois estados e relacioná-lo a ΔG , tal como o descrito na Equação 4.9. A seguir, apresenta-se uma descrição sucinta de ambos os métodos.

4.2.1 Integração Termodinâmica e o Método da Força Adaptativa

O método da Força Adaptativa (ABF, tradução livre de *Adaptative Biasing Force*) faz parte do conjunto de métodos conhecidos como integração termodinâmica (TI, *Thermodynamic Integration*), onde ΔG é obtido pela integração da derivada de G em função de uma coordenada de reação ξ [136],

$$\Delta G = G(\xi_1) - G(\xi_0) = \int_{\xi_0}^{\xi_1} \frac{\delta G}{\delta \xi} d\xi \quad (4.10)$$

onde $\delta G/\delta \xi$ é obtido pela derivada da função de partição clássica por ξ^{10} , que resulta em

$$\frac{\delta G}{\delta \xi} = \left\langle \frac{\delta H}{\delta \xi} \right\rangle_{\xi} \quad (4.11)$$

onde H se refere à hamiltoniana do sistema. O subscrito ξ do lado direito da Equação 4.11 é colocado para frisar que a média da derivada de H do sistema em função de ξ ($\langle \delta H/\delta \xi \rangle_{\xi}$) é calculada para cada valor de ξ fixo e não entre todos os valores de ξ da coordenada de reação. Em processos onde não há mudanças de massa e de temperatura, a média $\langle \delta H/\delta \xi \rangle_{\xi}$, refere-se a média da derivada da energia potencial V em função de ξ ($\langle \delta V/\delta \xi \rangle_{\xi}$), dado que a média da derivada da

¹⁰Uma descrição formal pode ser encontrada em [136]

energia cinética em função de ξ ($\langle \delta K / \delta \xi \rangle_\xi$) é zero¹¹. A média $\langle \delta V / \delta \xi \rangle_\xi$ é expressa aproximadamente pela força média exercida pelo meio ($\langle \vec{F}_{sist} \rangle_\xi$) em cada ponto ξ da coordenada de reação (Equação 4.12).

$$\left\langle \frac{\delta H}{\delta \xi} \right\rangle_\xi = \left\langle \frac{\delta K}{\delta \xi} \right\rangle_\xi + \left\langle \frac{\delta V}{\delta \xi} \right\rangle_\xi \cong \langle \vec{F}_{sist} \rangle_\xi \quad (4.12)$$

Do ponto de vista prático, os valores de $\langle \vec{F}_{sist} \rangle_\xi$ são amostrados sob vários pequenos intervalos $\Delta\xi$ finitos. A diferença do método ABF frente a outros métodos baseados em TI é que a força aplicada (\vec{F}_{ABF}) para levar os sistemas de ξ_0 à ξ_1 , a fim de superar as barreiras de energia livre do processo, é definida em termos da própria força média, como mostrado na Equação 4.13.

$$\vec{F}_{ABF} = R_\xi(n, N_{amost}) (-\langle \vec{F}_{sist} \rangle \nabla_\xi \xi) \quad (4.13)$$

A força \vec{F}_{ABF} (somada ao restante das forças na Equação 4.5) garante que no intervalo centrado sobre cada $\Delta\xi$, a força média atuando ao longo da coordenada de reação tenda a zero, já que ela é contrária à força gerada pelo potencial do sistema ($-\langle \vec{F}_{sist} \rangle$), mas na direção da coordenada de reação ($\nabla_\xi \xi$). A evolução do sistema ao longo de ξ é, portanto, regida principalmente por suas propriedades de autodifusão. Isso faz com que o método ABF não seja caracterizado como uma simulação de MD com vínculos, opção normalmente utilizada em outros métodos de TI, o que facilita a convergência do ΔG obtido [136].

A função $R_\xi(n, N_{amost})$ da Equação 4.13 controla o número mínimo de passos em que o sistema permanecerá em cada $\Delta\xi$ sem a completa aplicação de F_{ABF} . Se o número de passos de simulação (n) em determinado $\Delta\xi$ for menor ou igual ao valor de N_{amost} (parâmetro arbitrário definido no início da simulação), $R_\xi(n, N_{amost}) = n / (n, N_{amost})$. Se n for maior que N_{amost} , então $R_\xi(n, N_{amost}) = 1$. Dessa forma, a escolha do parâmetro N_{amost} definirá a amostragem mínima em cada $\Delta\xi$. Estas características da função $R_\xi(n, N_{amost})$ permitem que a \vec{F}_{sist} seja amostrada por mais tempo nas regiões importantes da coordenada de reação (por exemplo, um ligante no sítio de ligação), onde $\langle \vec{F}_{sist} \rangle$ manteria o sistema naturalmente preso

¹¹Nos casos onde ocorre mudança de temperatura, o termo cinético da Equação 4.12 é exato, dado que pode ser obtido analiticamente na função de partição clássica.

em determinada ξ . Nas regiões onde $\langle \vec{F}_{sist} \rangle$ é nulo (por exemplo, um ligante no seio da solução), o sistema se moverá difusivamente, sem necessidade de esperar a aplicação \vec{F}_{ABF} . Desta forma, uma das vantagens do método ABF frente a outras metodologias é a possibilidade da realização de uma amostragem não uniforme da coordenada de reação, privilegiando as regiões onde $\langle \vec{F}_{sist} \rangle$ possui valor alto.

4.2.2 Igualdade de Jarzynski e as Simulações de Dinâmica Molecular por Caminho Induzido

Após a introdução da igualdade de Jarzynski (JE, *Jarzynski equality*) [136, 144, 145], o campo dos métodos teóricos de cálculo de energia livre estendeu-se às simulações computacionais fora do equilíbrio. A igualdade de Jarzynski relaciona o ΔG com a média exponencial de um conjunto qualquer de trabalhos (W) realizados para a transformação entre dois estados de equilíbrio de um sistema, de acordo com a Equação 4.14 (onde $\beta = 1/k_B T$).

$$e^{-\beta \Delta G} = \langle e^{-\beta W} \rangle \quad (4.14)$$

O conjunto de trabalhos pode ser obtido por meio de processos irreversíveis (fora do equilíbrio) ou por um processo reversível (equilíbrio), sendo a Equação 4.9 um caso particular de JE. Computacionalmente, isto em geral é feito através do uso de múltiplas Simulações de MD por Caminho Induzido (tradução livre de *Steered Molecular Dynamics*, SMD) [33, 146–148]. Esta técnica consiste basicamente na aplicação de uma força a um conjunto de átomos da simulação de modo a acelerar um determinado processo ou mecanismo de interesse de maneira controlada. Esta força externa (\vec{F}_{ext}) aplicada nas simulações de SMD tem a forma da Equação 4.15,

$$\vec{F}_{ext}(t, \Delta \vec{\xi}) = k(\vec{v}t - \Delta \vec{\xi}) \quad (4.15)$$

sendo k uma constante (similar a uma constante elástica de mola), \vec{v} a velocidade de aplicação da força e $\Delta \vec{\xi}$ o vetor deslocamento da coordenada de reação, sendo puxado em relação à sua posição inicial. A direção da força \vec{F}_{ext} é definida pelo \vec{v} com base no caminho sendo analisado. A direção e magnitude da velocidade, bem como a constante de força k , são parâmetros constantes que podem ser ajustados.

A força \vec{F}_{ext} possui a interessante propriedade de estar, em todo instante de tempo, sendo modulada pela resistência que o meio exerce sobre o movimento, por exemplo, ao ligante ao ser puxado do seu receptor para o solvente. Quando o ligante se desloca facilmente, o termo $\Delta\vec{\xi}$ aumenta rapidamente, diminuindo a \vec{F}_{ext} aplicada. Por outro lado, se o ligante não está se deslocando facilmente ao longo do caminho escolhido (digamos, devido a fortes interações com a proteína), o termo $\vec{v}t$ garante que \vec{F}_{ext} aumente até que resistências sejam vencidas e o ligante se mova. Isto promove aumento de $\Delta\vec{\xi}$ e a consequente diminuição de \vec{F}_{ext} .

À partir de diferentes configurações iniciais, um conjunto de trabalhos W pode ser gerado através de simulações SMD, sendo possível obter diretamente ΔG a partir do logaritmo natural da Equação 4.14

$$\Delta G = -\beta^{-1} \ln \langle e^{-\beta W} \rangle. \quad (4.16)$$

O valor obtido do ΔG através da Equação 4.16 pode apresentar erros de arredondamento ao se realizar o cálculo numérico da média $\langle e^{-\beta W} \rangle$. Uma maneira de evitar estes erros seria utilizar uma expansão em série de Taylor do $\ln \langle e^{-\beta W} \rangle$, que resulta na abordagem de cumulantes para o cálculo ΔG através da igualdade de Jarzynski (Equação 4.17).

$$\Delta G = \langle W \rangle - \beta \frac{\langle W^2 \rangle - \langle W \rangle^2}{2} + O(W^3) + \dots \quad (4.17)$$

Caso o conjunto de trabalhos siga uma distribuição gaussiana, todos os cumulantes de ordem maior que $O(W^2)$ serão iguais a zero, sendo apenas necessário o cálculo da média $\langle W \rangle$ e do termo $\langle W^2 \rangle - \langle W \rangle^2$, que se refere a variância dos trabalhos obtidos (σ_w^2). Nestes casos, além de reduzir os erros de arredondamento em relação à abordagem exponencial, a abordagem de cumulantes possibilita verificar o quão próximos de um regime reversível estão os processos de transformação fora do equilíbrio de ξ_0 em ξ_1 , possibilitando, assim, uma interpretação direta dos resultados obtidos.

Sendo grande o valor F_{ext} aplicada nas simulações de SMD, mais rápido será a transformação $\xi_0 \rightarrow \xi_1$. Consequentemente, maior será a dispersão dos valores de W e consequentemente, maior será a média $\langle W \rangle$, de maneira a manter a igualdade

de Jarzynski. Já numa transformação realizada bem lentamente, ou seja, com valor de F_{ext} pequeno, o ΔG será cada vez mais próximo de $\langle W \rangle$, sendo σ_w^2 cada vez menor. Numa transformação infinitamente lenta, o ΔG será igual à $\langle W \rangle$, sendo esta média o próprio W_{rev} , previsto pela termodinâmica clássica de equilíbrio na Equação 4.9.

As vantagens de usar método JE/SMD para obter o ΔG são: o método e as análises realizadas são mais simples e fáceis de entender quando comparados a métodos de equilíbrio; o método realiza uma amostragem uniforme de todos os pontos da coordenada de reação [147]. Do ponto de vista prático, a escolha de qual método é mais adequado depende do problema em estudo. No caso do método JE/SMD, a escolha do conjunto de parâmetros que definem os trabalhos realizados (que envolve \vec{v} e k) deve ser feita de maneira a acelerar a convergência do valor de ΔG , o que implica em compromisso entre o custo computacional e a obtenção de um conjunto de trabalhos com média o mais próxima possível de um W_{rev} , de baixa dispersão e que, se possível, siga uma distribuição gaussiana [136].

4.3 Métodos e parâmetros utilizados nas simulações

Nesta seção, serão descritos os métodos e parâmetros utilizados nas simulações de MD (convencionais e para cálculo do ΔG), tal como detalhes da construção dos sistemas e das simulações, descrição das etapas de minimização de energia, campo de força utilizado, entre outros. Aspectos da metodologia especificamente relacionados aos problemas em estudo serão descritos junto dos capítulos de resultados.

Construção dos sistemas

Em uma primeira etapa, construiu-se caixas de simulações com estrutura do LBD dos NRs estudados. Nos casos com algum resíduo ou *loop* faltante, este foi reconstruído a partir de outra estrutura cristalográfica contendo o mesmo receptor ou um homólogo mais próximo (em geral um subtipo do NR em estudo). Para isso, as estruturas dos LBDs foram alinhadas e as coordenadas atômicas do *loop* adicionadas ao PDB utilizado. Todas as moléculas de água já contidas na estrutura cristalográfica (chamadas comumente de “águas estruturais”) foram mantidas com a proteína.

Todos os átomos de hidrogênio do sistema foram adicionados usando o programa *psfgen* do pacote *NAMD* [149]. Os resíduos básicos (R e K) e ácidos (D e E) da proteína foram considerados na forma carregada, predominante no pH fisiológico (7,4), com exceção das histidinas consideradas neutras nestas condições. Isto foi conferido através do cálculo do pKa dos grupos ionizáveis, através dos servidores *H++* [150] e *PROPKA* [151]. Adicionados os átomos de hidrogênio e *loops*, foi construída a caixa de simulação através do programa *Packmol* [152]. O LBD e as águas estruturais foi então solvatados por cerca de 16.000 moléculas de água, numa caixa cúbica de aproximadamente 80 Å de lado. O tamanho da caixa e a quantidade de moléculas de água foi definida de maneira a reproduzir a densidade de 1,04 g/mL¹² e de existir, em torno de três camadas de solvatação em volta da proteína, no mínimo. Também foram adicionados íons sódio e cloreto para manter a eletroneutralidade do sistema e concentração iônica semelhante à do meio fisiológico¹³. Cada sistema contém de 54.000 a 60.000 átomos.

Para a construção dos sistemas contendo mutações (como os sistemas do capítulo 7 ou em *loops* reconstruídos), foi utilizada a caixa de simulação da estrutura nativa já pronta, sendo substituída a cadeia lateral do resíduo a ser mutado e, se necessário, adicionado ou retirado um íon de carga oposta ao resíduo mutado, de maneira a manter a eletroneutralidade. A cadeia lateral foi trocada através do programa *psfgen*, enquanto no caso de adição de um contra-íon, uma molécula de água foi substituída manualmente.

Com as caixas de simulação prontas, foi necessária a realização de uma minimização de energia, de maneira a evitar “maus contatos” (forças extremamente repulsivas) no início das simulações de MD e promover a formação das ligações de hidrogênio possíveis no sistema. A minimização clássica de energia foi efetuada através do seguinte esquema:

1. **Primeira minimização:** 700 passos de minimização, onde são mantidas as posições fixas de toda proteína, exceto as regiões que foram modeladas (*loop*, mutação e região a sua volta) e solvente (as moléculas de água e os íons);

¹²O valor de densidade foi determinado em simulações prévias de uma solução aquosa contendo LBD do TR β e contraíons a 298 K e 1 bar.

¹³A concentração de sódio e cloro nos fluidos fisiológicos é da ordem de 0,15 mol.L⁻¹ [16].

2. **Segunda minimização:** 500 passos de minimização, onde apenas o *backbone* da proteína é mantido fixo. Cadeias laterais, solvente e regiões modeladas (incluindo neste caso o *backbone*) estão livres.
3. **Terceira minimização:** 300 passos de minimização, com todo sistema livre.

Este esquema permitiu a retirada de “maus contatos” locais, em especial nos estudos envolvendo mutações, sem levar grandes alterações no restante da proteína. Foi utilizado para a minimização o método dos gradientes conjugados do programa *NAMD*.

Simulações de MD

Todas as simulações de MD foram feitas usando o programa *NAMD*, sendo realizadas no *ensemble NPT* (298 K e 1 bar). A temperatura foi controlada com o banho térmico de Langevin, adotando um coeficiente de fricção de 5 ps^{-1} . A pressão foi mantida constante com o algoritmo de Nosé-Hoover, com flutuação do pistão por dinâmica de Langevin. O período de oscilação e o tempo de decaimento do pistão foram de 200 *fs* e 100 *fs*, respectivamente.

Todos os átomos foram considerados explicitamente, utilizando o campo de forças CHARMM para a proteína e TIP3P para a água. Foi estabelecido o raio de corte de 14 Å para as interações de curto alcance, enquanto as interações coulômbicas foram tratadas com somas de Ewald através do método *Particle Mesh Ewald* (PME). As ligações covalentes envolvendo átomos de hidrogênio da proteína e ligantes foram consideradas rígidas. As moléculas de água tiveram tanto as ligações covalente como o ângulo HOH mantidos rígidos. Para a integração das equações de movimento foi utilizado o algoritmo *Velocity-Verlet* e passo de simulação de δt igual a 2 *fs*, sendo as coordenadas da simulação salvas a cada 1 *ps*.

Os primeiros passos de uma simulação de MD constituem o que se denomina fase de equilíbrio, um período onde as propriedades do sistema não se mantêm constantes. A fase posterior à de equilíbrio pode ser chamada fase de produção, onde de fato são coletados os resultados. A duração da fase de equilíbrio é variável e depende do sistema em estudo. Utilizou-se a variação temporal de propriedades estruturais (como Raio de Giração e RMSD em relação à estrutura cristalográfica) com objetivo de verificar a relaxação e estabilidade dos LBDs ao longo

da simulação. Em geral, foram necessários de 2 à 5 *ns* de tempo de simulação para a equilibração dos sistemas, sendo esta efetuada após a terceira etapa de minimização.

Todas as análises realizadas foram feitas através do programa *VMD* [153] e, principalmente, de programas desenvolvidos no grupo em linguagem Fortran. Os resultados foram dispostos na forma de gráficos, mostrando a variação temporal da propriedade, distribuições de frequências ou ainda médias e desvios globais. Sempre que possível, os resultados também foram mostrados na forma de figuras da estrutura atômico dos sistemas.

Capítulo 5

O novo sítio de ligação do TR

NRs podem ser considerados alvos ideais para o desenvolvimento de fármacos, tanto pelas características dos hormônios a que se associam (pequenas moléculas orgânicas) como por sua função biológica, que é regular a transcrição de genes envolvidos em uma grande variedade de processos metabólicos, muitos deles relacionados a doenças [6]. Outra característica que se sobressai nos NRs neste contexto são eles possuírem como sítio de ligação uma cavidade hidrofóbica interna, quase completamente fechada após a associação de, em geral, um único ligante. Tais características diferenciam os NRs de várias outras proteínas e enzimas que possuem sítios de ligação mais externos, na superfície exposta ao solvente.

Apesar da maioria das estruturas cristalográficas de NRs mostrarem estas características, novos estudos têm levantado à hipótese de, na verdade, existirem outros sítios de ligação. Foi verificado, por exemplo, na estrutura cristalográfica do LBD do ER β ligado ao hidroxitamoxifeno a presença de dois ligantes: um presente na cavidade hidrofóbica consensual e outro em um segundo sítio na superfície do LBD, numa região que se sobrepõe com o sulco de reconhecimento de CoAs [154]. Este segundo sítio de ligação foi anteriormente proposto em estudos de sedimentação, que demonstraram que, apesar da alta afinidade do receptor, o total de hidroxitamoxifeno ligado é quase o dobro do estradiol [155]. Foi proposto que o sítio de ligação clássico, de alta afinidade, era responsável pela atividade agonista deste ligante, enquanto o sítio secundário, de baixa afinidade, seria responsável por sua ação antagonista [156].

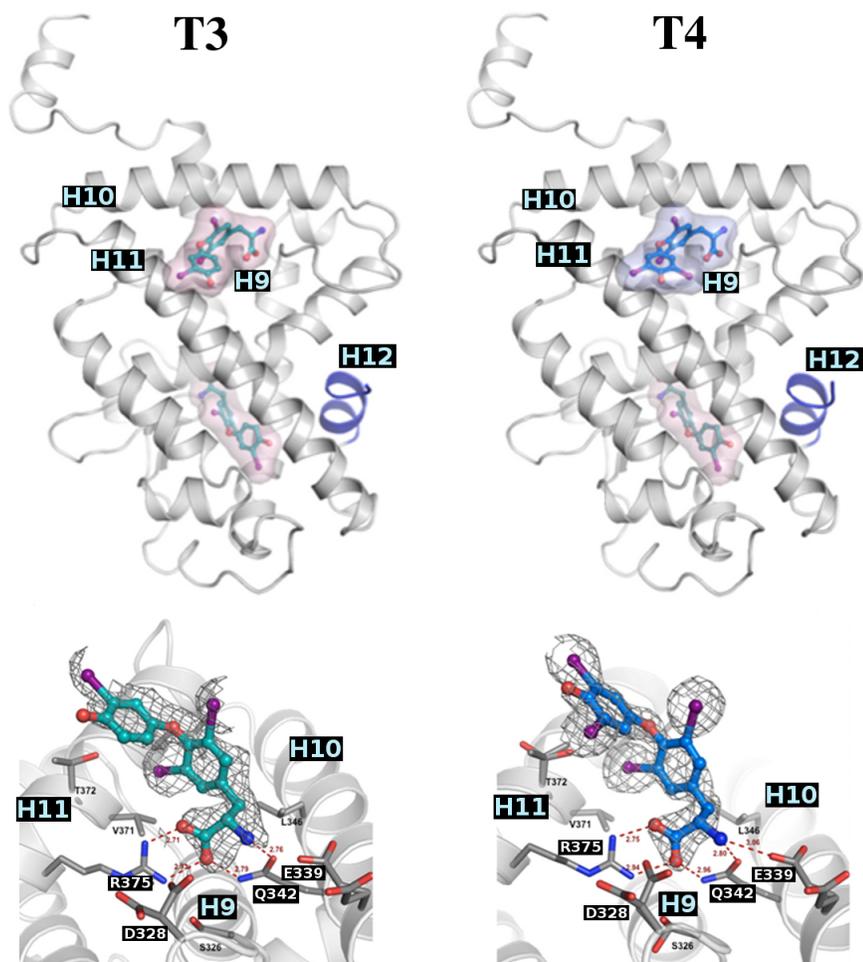


Figura 5.1. Estruturas do LBD do TR α com ligantes no segundo sítio: (A) T3 e (B) T4. São destacados os principais resíduos polares que interagem com os hormônios tireoideanos no segundo sítio: D328, E339, Q342 e R375. Os resíduos E339 e D328 apresentam dupla conformação nas estruturas. O primeiro sítio (cavidade hidrofóbica clássica) de ambas as estruturas contém o hormônio T3.

Curiosamente, um segundo sítio de ligação também foi identificado no LBD do VDR. Resultados de modelagem molecular propuseram que este novo sítio poderia explicar como este receptor e, possivelmente também os ERs, podem ter funções genômicas e não-genômicas [157]. Para os PPARs, a presença de mais de um ligante ligado ao LBD já foi claramente demonstrado por estudos de cristalografia [30, 31]. No entanto, o ancoramento dos ligantes adicionais ocorre numa extensão da grande cavidade hidrofóbica dos PPARs e não em outro sítio de ligação. Uma

exceção é o PPAR γ associado ao ácido ajulêmico. A estrutura cristalográfica deste complexo mostra o LBD associado duas moléculas deste ligante, sendo uma delas ancorada ao sulco de interação com co-reguladores [158].

Há alguns anos atrás, o grupo do Prof. Dr. Igor Polikarpov realizou estudos estruturais que levantaram a hipótese da existência de um segundo sítio de ligação no TR α . As novas estruturas obtidas por cristalografia de raios-X identificaram de maneira inequívoca um segundo sítio de ligação para T3 e T4, localizado entre as α -hélices H8, H9, H10 e H11 no LBD do TR α . A Figura 5.1 mostra as estruturas cristalográficas obtidas, destacando a densidade eletrônica observada para os hormônios e o novo sítio de ligação.

Observa-se que os ligantes T3 e T4 ancoram-se ao segundo sítio principalmente por interações polares como os resíduos D328 (H8), E339 (H10), Q342 (H10) e R375 (H11), além de contatos hidrofóbicos com os resíduos S326, V371, T372, L346 e L368. Os resíduos ácidos E339 e D328 (com carga negativa em *pH* fisiológico) apresentam duas conformações possíveis. Isto indica que provavelmente eles possuem grande mobilidade e que podem ter papel secundário em relação às interações com Q342 e R375. O restante do LBD apresenta a mesma estrutura de sanduíche típica de NRs, com a H12 (destaque em azul na Figura 5.1) encontrando-se em posição agonista.

Os resíduos do segundo sítio são conservados em ambos os subtipos TR, de modo que se existe este novo sítio no TR α , também deve existir no TR β . Já foi observado por Borngraeber e colaboradores a existência de densidade eletrônica de um segundo ligante (GC-24, ligante agonista TR β -seletivo) associado ao TR β [69]. Entretanto, a densidade eletrônica do segundo ligante foi modelada no sulco formado pelas α -hélices H9, H12 e H11, uma região diferente da observada nas novas estruturas cristalográficas do TR associado aos hormônios naturais T3 e T4 no segundo sítio. Borngraeber e colaboradores consideraram este resultado um artefato cristalográfico. Curiosamente, ao colocar esta segunda molécula de GC-24 em sua posição cristalográfica simétrica, verifica-se que este ligante passa a ocupar o mesmo segundo sítio de ligação observado para T3 e T4, como mostra a Figura 5.2. Nesta posição, o grupo fenol de GC-24 interage com o resíduo Q396 do TR β , que corresponde ao resíduo Q342 do TR α , em um modo de ligação distinto do observado nos hormônios tireoideanos no segundo sítio.

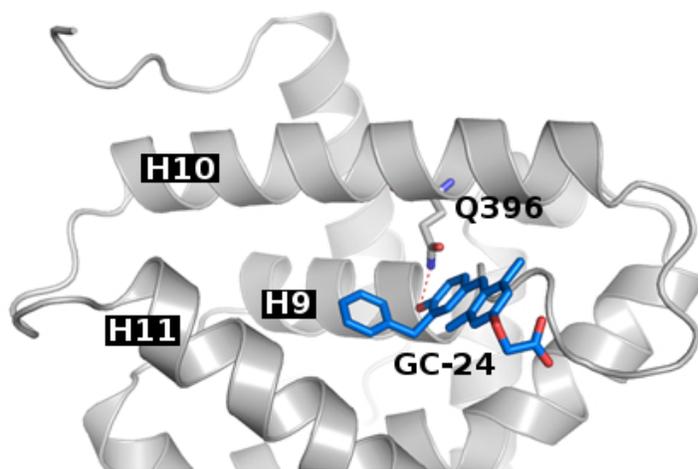


Figura 5.2. GC-24 no segundo sítio de ligação no LBD do TR β . O grupo fenol do GC-24 interage diretamente com Q396 do TR β (que corresponde ao Q342 do TR α).

Além das estruturas com T3, T4 e GC-24 no segundo sítio, nenhuma outra estrutura de TR, ou mesmo de outros NRs, apresentou até hoje algum ligante nesta mesma região. Isto poderia indicar que a presença de ligantes no novo sítio seriam artefatos do empacotamento cristalino. Ensaio da atividade transcricional de mutações nos quatro resíduos que fazem as principais interações polares do segundo sítio foram realizados para verificar se de fato esta era uma região funcional importante. Os resultados destes ensaios, realizados para TR β e mostrados na Figura 5.3, indicam que estas mutações levam a grandes alterações na atividade do receptor.

Apesar de estes resultados sugerirem, quando analisados no conjunto, que o segundo sítio deve ser relevante para a função do TR, ainda não era possível responder diversas questões: O segundo sítio existe em solução aquosa ou é apenas um artefato de cristalografia? Se ele existe em solução, qual seriam sua afinidade e sua função biológica? É possível criar ligantes seletivos a cada um dos sítios? O objetivo desta etapa da Tese de Doutorado foi contribuir na resolução destas questões, em especial realizar simulações de MD para obtenção de uma estimativa da afinidade dos hormônios tireoideanos no novo sítio.

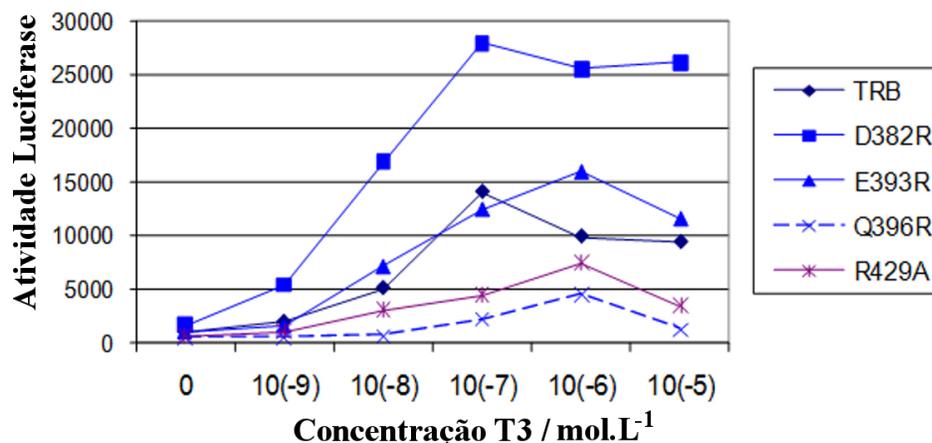


Figura 5.3. Comparação dos ensaios de atividade transcricional de células contendo TR β nativo e de quatro mutações pontuais em resíduos polares do segundo sítio: D382R, E393R, Q396R e R429A (numeração correspondente no TR α : D328R, E339R, Q342R e R375A).

5.1 Estrutura e dinâmica dos ligantes no novo sítio

A obtenção do ΔG de dissociação é uma importante etapa para verificar a possível relevância biológica do novo sítio de ligação, visto que até o momento não foi possível obter a afinidade experimental. Entretanto, para a realização deste tipo de simulação, são necessárias configurações iniciais relaxadas, obtidas a partir de simulações de MD tradicionais, contendo as flutuações deste sistema no equilíbrio. Visto que tais simulações também permitem a obtenção de maior conhecimento sobre a estrutura e a dinâmica dos ligantes neste novo sítio do TR α , foi feito a seguir uma descrição dos aspectos específicos da metodologia empregada, bem como dos resultados obtidos nesta etapa.

5.1.1 Parametrização dos ligantes e condições das simulações de MD

Um dos primeiros passos ao realizar uma simulação de MD é verificar se existem parâmetros do campo de força escolhido para todos os componentes do sistema. No estudo de proteínas, um problema recorrente é a falta de parâmetros específicos para os ligantes, cofatores ou substratos que a elas se associam. No caso dos

hormônios tireoideanos, nosso grupo já havia anteriormente realizado suas parametrizações [34]. Entretanto, naquele momento, foram consideradas apenas as características destes ligantes no primeiro sítio de ligação. Simulações preliminares de MD dos hormônios tireoideanos T3 e T4 em água e também associados ao segundo sítio do TR α mostraram que, de fato, esta parametrização não era adequada, particularmente porque não mantinha a conformação destes ligantes tal como observado no segundo sítio. Além disso, nas simulações com LBD, os ligantes no segundo sítio dissociavam-se espontaneamente após aproximadamente 2 ns.

Estudos de NMR comprovam que existem duas conformações principais para T3 e T4 em água: cisóide e transóide [159, 160]. Observa-se nas estruturas cristalográficas que quando ligados ao TR, os hormônios adotam conformações diferentes, dependendo do sítio: cisóide no segundo sítio e transóide no primeiro. Dada à importância de parâmetros que reproduzam o modo de ligação correto em ambos os sítios, especialmente para simulações destinadas a cálculos de ΔG de dissociação, optou-se pela realização de uma nova parametrização.

Neste novo procedimento, foi utilizado um protocolo similar ao recentemente implementado por nosso grupo de pesquisa para outras biomoléculas [161, 162], porém baseado tanto em dados experimentais das barreiras torsionais [159, 160] como em estimativas obtidas à partir de cálculos quânticos e analogia a biomoléculas já parametrizadas. Foi obtido um conjunto de novos parâmetros que representa razoavelmente a geometria molecular, as barreiras torsionais e as cargas parciais atômicas em solução aquosa. Os cálculos quânticos foram realizados com o programa *Gaussian 03* [163], utilizando os métodos Hartree-Fock restrito (RHF) [164] e teoria do funcional de densidade (DFT) com funcional de troca e correlação B3LYP [165], ambos com funções de base CEP-31 [166, 167].

A Figura 5.4 mostra, como exemplo, parte dos resultados utilizados nesta parametrização, referentes aos diedros. São mostrados os resultados de cálculos quânticos da energia em função do ângulo diedral de um análogo de T3 para os três principais diedros destes hormônios. Tanto as conformações presentes no primeiro sítio como no segundo são aproximadamente mínimos de energia (pontos -90° e $+90^\circ$ dos diedros 2 ou 3), sendo um conjunto de funções cossenoidais no formato CHARMM (V^{died}) da Equação 4.3 utilizadas para representação destes diedros.

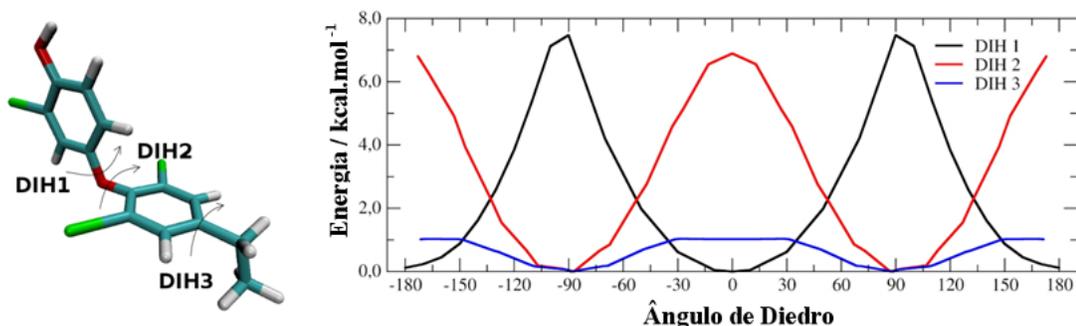


Figura 5.4. Representação do análogo de T3 e T4 utilizado para a parametrização e varredura dos três diedros.

Os arquivos de topologia e de parâmetros obtidos para T3 e T4, no formato CHARMM, estão descritos nos Apêndices B e C, respectivamente. Finalizada a parametrização, foram construídas caixas de simulação para o LBD do TR α a partir das estruturas cristalográficas obtidas pelo grupo do Prof. Dr. Igor Polikarpov com T3 (resolução de 1,90 Å) e T4 (resolução de 2,05 Å) no segundo sítio e também a partir do LBD do TR α sem ligante no segundo sítio (código PDB: 3GWS; resolução de 2,20 Å), sendo estudados três sistemas com T3 no primeiro sítio: TR α -LBD ligado à T3 no segundo sítio (TR α -T3-T3), TR α -LBD ligado à T4 no segundo sítio (TR α -T3-T4), TR α -LBD sem ligantes no segundo sítio (TR α -T3). Para cada sistema, após etapas de minimização de energia e equilíbrio, foram feitas 6 simulações independentes de MD, de 6 ns cada uma.

5.1.2 Mobilidade e modos de ligação no novo sítio

Inicialmente, foi observado nas simulações de MD a mobilidade dos ligantes. Os resultados mostraram que T4 é muito menos móvel que T3 no segundo sítio de ligação, tal como ilustrado nas Figuras 5.5A e 5.5B. Também observou-se que ambos os ligantes no segundo sítio têm maior mobilidade que o hormônio T3 no primeiro sítio de ligação (Figura 5.5C). Isso já era esperado, dado que no primeiro sítio o ligante está preso dentro de uma cavidade.

O anel fenólico é a parte mais móvel do T3 e T4 no segundo sítio. Ao contrário do que ocorre no primeiro sítio, o grupo hidroxila do anel fenólico não faz interações polares com o LBD dos TRs. A Figura 5.5D mostra quantitativamente

esses resultados através da frequência do RMSD dos átomos do ligante (sem considerar os átomos de hidrogênio). Este cálculo foi realizado alinhando os passos da simulação em relação à posição média do *backbone* da proteína, sendo o RMSD calculado em relação à posição média do ligante. Feito desta maneira, o cálculo do RMSD inclui tanto os movimentos de translação, como os movimentos internos (vibrações e diedros) do ligante. Vale por fim destacar que estes resultados são coerentes com o fator de temperatura experimental observado para os ligantes nas estruturas cristalográficas¹⁴.

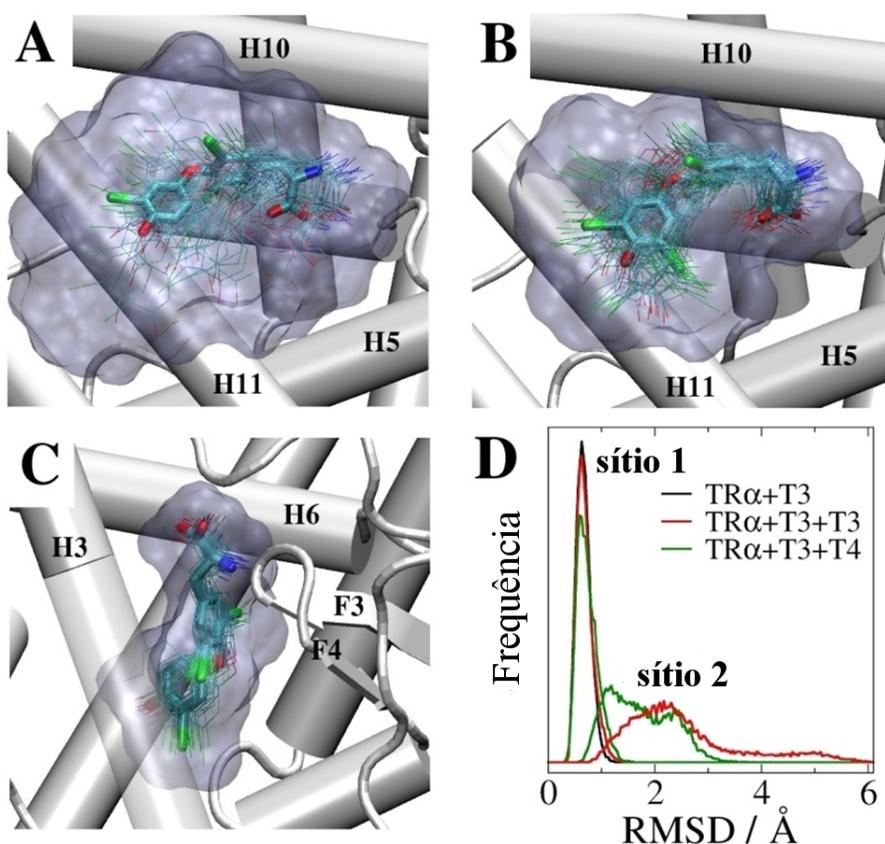


Figura 5.5. Mobilidade dos hormônios: (A) e (B) mostram as estruturas sobrepostas e o volume máximo ocupado por T3 e T4 no segundo sítio de ligação, respectivamente; (C) mostra as estruturas sobrepostas e o volume máximo ocupado por T3 no primeiro sítio de ligação; (D) Frequência de RMSD dos hormônios no primeiro e no segundo sítio de ligação.

¹⁴O fator de temperatura é uma medida da amplitude dos desvios atômicos das posições cristalográficas médias [125]

Outra análise importante para caracterizar o segundo sítio de ligação foi calcular as energias de interação ligante-proteína. Isto é feito considerando apenas o termo V^{inter} da Equação 4.4 entre os átomos do ligante e do LBD ao longo da trajetória, o que permite o cálculo de médias, desvios e frequências tanto para a interação total ligante-proteína como para cada interação ligante-resíduo.

A Figura 5.6A mostra o cálculo da energia de interação média e desvio de cada resíduo com os ligantes, o que permite identificar quais os resíduos mais importantes para interação dos hormônios com o segundo sítio. Confirmando parcialmente o observado pelos contatos na estrutura cristalográfica, os principais resíduos que interagem com ligantes no segundo sítio são R375, E339 e Q342. O resíduo D328, observado próximo do ligante na estrutura cristalográfica, apresentou contribuição menor, mas ainda atrativa (de valor negativo). Porém, o que mais se destacou na energia da interação D328-ligante foi sua grande flutuação, que indica até interações desfavoráveis (de valor positivo) com o LBD ao longo da simulação.

Também foram observados contribuições menores para interação dos resíduos D336 e E343, não previstos pelos contatos cristalográficos. É interessante notar que grande parte das interações no segundo sítio envolvem resíduos de carga negativa, o que é diferente do primeiro sítio de ligação, que contém mais resíduos de carga positiva próximos do ligante. A Figura 5.6A mostra ainda que T4 possui interações ligeiramente mais favoráveis com todos os resíduos em relação ao T3.

Para melhor compreender as diferenças nas energias de interação LBD-ligante entre T3 e T4, foi realizado o cálculo da frequência das energias de interação total ligante-LBD, sendo o resultado mostrado na Figura 5.6B. Observa-se claramente que as energias de interação refletem a alta mobilidade dos ligantes no segundo sítio de ligação, existindo múltiplos modos de ligação, tal como mostrado pelos picos na Figura 5.6B. Para o T3 foi observada a existência de 3 modos de ligação, denominados: modo forte (I), modo dinâmico (II) e modo fraco (III).

A Figura 5.6C ilustra todos os modos de ligação observados para T3 no segundo sítio de ligação, além das interconversões possíveis entre eles observadas nas simulações de MD. As principais interações no modo forte (I) são com os resíduos de R375, Q342 e E339, como já era esperado. A perda de uma ou duas destas interações resulta no modo dinâmico (II), o modo majoritário durante as simulações de MD, dado à sua maior frequência. Ele é formado por três maneiras distintas do

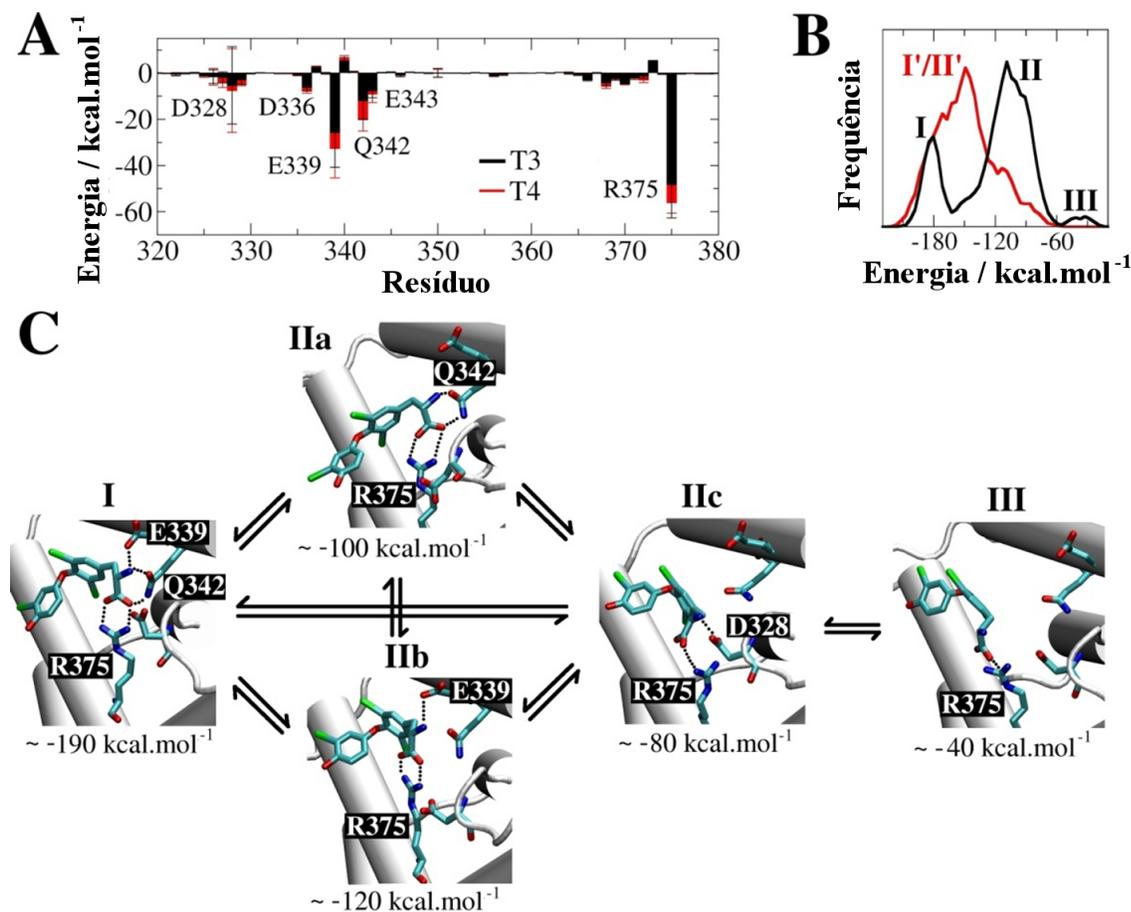


Figura 5.6. Energia de interação hormônio-LBD e modos de ligação: (A) Média da energia de interação entre os ligantes e principais resíduos no segundo sítio de ligação; (B) Frequência da energia de interação total LBD-ligante do T3 (preto) e T4 (vermelho) no segundo sítio de ligação; (C) Múltiplos modos de ligação de T3 e sua complexa interconversão.

ligante se associar ao segundo sítio, com valores próximos de energia de interação. Como seu nome indica, o modo dinâmico é bem móvel, sendo a interconversão entre estes submodos da ordem de *ps*.

Os principais resíduos modo dinâmico são: R375 e Q342 (IIa), R375 e E339 (IIb) ou R375 e D328 (IIc). No modo IIc, o ligante está ligeiramente mais distante da superfície do LBD. A perda da interação com o resíduo D328 deste modo de ligação leva ao modo de ligação fraco (III), que ainda mantém interação com R375, presente em todos os modos.

T4, muito menos móvel que T3, não mostrou modo fraco nas simulações de MD, como demonstrado pela ausência do terceiro pico na Figura 5.6B. Além disso, verifica-se que as energias de interação do modo dinâmico são mais favoráveis do que no T3, visto que o pico II se aproxima do pico I. Dada à similaridade entre as moléculas de T3 e T4, a única explicação para este resultado é a maior hidrofobicidade de T4, que faz com que ele permaneça mais tempo próximo da LBD que T3 e, conseqüentemente, com interações mais favoráveis, incluindo interações dispersivas mais intensas, coerentes com o iodo extra em sua estrutura.

Por fim, todas estas diferenças podem ser sintetizadas pelas médias e flutuações das energias de interação total LBD-ligante de T4 e T3 no segundo sítio de ligação, que são $-151,70 \pm 28,9$ e $-120,6 \pm 35,4$ kcal.mol⁻¹, respectivamente¹⁵. A diferença entre os valores médios indica que T4 deve possuir maior afinidade que T3 no segundo sítio de ligação. Este é um resultado inusitado dado que, de acordo com os resultados experimentais disponíveis, T3 possui maior afinidade pelo primeiro sítio que o T4, ou seja, tendência inversa do observado para o segundo sítio [73].

5.1.3 Relações entre o primeiro e o segundo sítios

Além das análises da mobilidade e das energias de interação para T3 e T4 no segundo sítio de ligação, foram observadas quais mudanças ocorreram em outras regiões do LBD. Curiosamente, observou-se que o ligante no primeiro sítio de ligação apresenta mobilidade ligeiramente maior quando um ligante está presente no segundo sítio. Isto pode ser observado pelas diferenças entre os picos do primeiro sítio na Figura 5.5D.

As médias das energias de interação total LBD-ligante no primeiro sítio mostram que T3 no primeiro sítio interage menos com o LBD quando existe outro ligante no segundo sítio. Para o TR α -T3, esta média foi de $-124,2 \pm 12,1$ kcal.mol⁻¹ enquanto para TR α -T3-T3 e TR α -T3-T4 as médias foram $-113,8 \pm 9,5$ e $-116,2 \pm 12,3$ kcal.mol⁻¹, respectivamente.

¹⁵Os desvios dos valores médios das energias de interação não correspondem às incertezas na medida e, sim, às variações de energia resultantes das flutuações térmicas. Logo, não há problema em expressar um desvio maior que as diferenças entre os valores médios de energia de diferentes sistemas. Nesta Tese de Doutorado, todos os desvios de valores médios de energia de interação referem-se a flutuações e não incertezas.

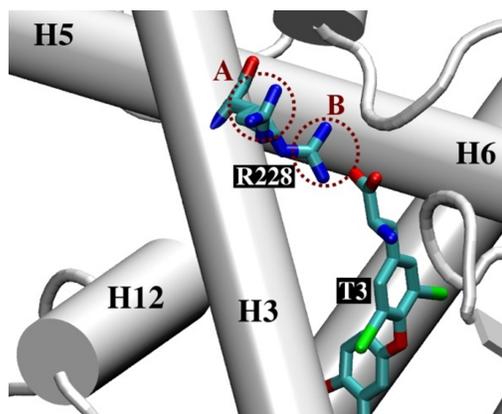


Figura 5.7. Duas conformações da R228 observadas nas simulações de MD e nas estruturas cristalográficas com ligantes no segundo sítio. Em (A), R228 volta-se para o solvente, enquanto em (B), faz uma ponte salina com o T3.

A observação do ligante do primeiro sítio nas trajetórias mostra que estas mudanças estão relacionadas à perda de interação com o resíduo R228, um dos principais resíduos do primeiro sítio de ligação, que passa a interagir com o solvente em algumas das simulações dos sistemas contendo ligantes no segundo sítio de ligação, enquanto que nas simulações de TR α -T3 (sem ligante no segundo sítio), este evento não ocorre.

Embora rara nas simulações, esta mudança é surpreendentemente consistente com as duas conformações deste mesmo resíduo observadas nas novas estruturas cristalográficas obtidas pelo grupo do Prof. Dr. Igor Polikarpov, tal como mostra a Figura 5.7. A estrutura cristalográfica sem ligante no segundo sítio (código PDB: 3GWS) apresenta o resíduo R228 em apenas uma conformação, interagindo com o ligante. Vale destacar que tanto as simulações do LBD com ligantes no segundo sítio como as sem ligante foram realizadas com as estruturas iniciais contendo R228 interagindo com T3. Desta forma, este resultado não foi induzido pelas configurações iniciais utilizadas.

5.1.4 Tirosina e mutações no segundo sítio

Uma das perguntas levantadas ao longo do estudo do segundo sítio de ligação foi a respeito de qual seria seu ligante natural. Nossos resultados até aqui indicam

que possivelmente esse ligante seria o T4. Uma vez que este sítio nunca foi observado por outros grupos de pesquisas nas estruturas determinadas do LBD de TRs, incluindo as cristalizadas com T4 [73], uma possibilidade seria de que nunca foi utilizado o ligante correto na cristalização junto deste receptor. Logo, outras biomoléculas que se encontram em grande concentração no meio fisiológico devem ser ponderadas.

Considerando a concentração intracelular e a semelhança estrutural com os hormônios T3 e T4, uma possibilidade levantada seria do aminoácido tirosina ligar-se ao segundo sítio. Para testar essa hipótese, três simulações de MD de 6 *ns* foram realizadas, sendo utilizado o campo de força CHARMM para este aminoácido. A tirosina foi ancorada ao sítio da mesma maneira que os hormônios tireoideanos estão nas novas estruturas cristalográficas, em especial mantendo as interações dos grupos amino e carboxilato com os resíduos R375 e Q342.

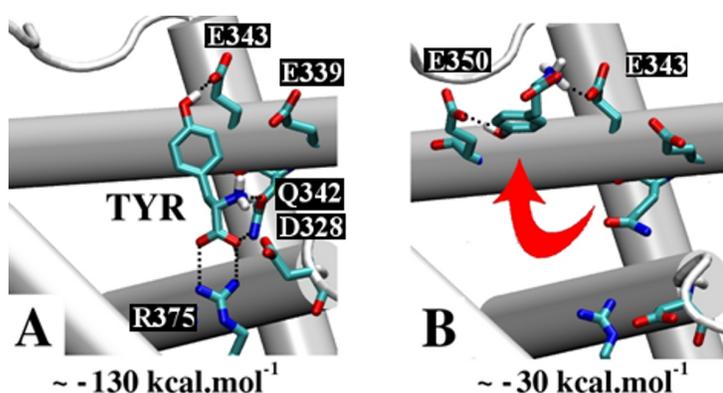


Figura 5.8. Teste do aminoácido tirosina como ligante no segundo sítio de ligação. (A) Durante metade do tempo das simulações, a tirosina mantém um modo de ligação específico, envolvendo os principais resíduos do segundo sítio (Q342 R375 e D328). (B) No entanto, na segunda metade das simulações, o aminoácido começa a se dissociar, indicando que a ligação não é estável.

No início das simulações, a tirosina manteve-se ancorada ao sítio de ligação, com energias de interação total LBD-ligante próxima das obtidas para o T3 e T4, com valores em torno de $-130,0 \pm 8,0$ kcal.mol⁻¹. Entretanto, após cerca de 2 a 5 *ns*, verificou-se que em todas as simulações realizadas, a tirosina dissociou do TR α -LBD, tal como indicado na Figura 5.8. Logo, é muito pouco provável que a tirosina seja um ligante para o segundo sítio.

Outra hipótese levantada ao longo deste estudo refere-se à possibilidade do segundo sítio de ligação explicar como algumas mutações do TR têm alta afinidade por hormônios. O resultado de um estudo realizado neste contexto é apresentado no Capítulo 7.

5.2 Afinidade dos ligantes pelo segundo sítio

As simulações de MD tradicionais forneceram indicações preciosas da mobilidade e das interações de ligantes. Em especial, os resultados sugerem que T4 possivelmente apresenta maior afinidade que T3 pelo segundo sítio de ligação, já que este ligante apresenta-se menos “ancorado” (maior mobilidade) e com energias de interações menos favoráveis. Apesar destes indícios, apenas a medida direta da afinidade TR–ligante no segundo sítio pode confirmar esta hipótese.

Até o momento, problemas experimentais impediram a obtenção desta medida, sendo a realização de cálculos teóricos uma opção alternativa interessante. Assim, nesta etapa do estudo, foram utilizados dois métodos para cálculo do ΔG de dissociação dos ligantes no segundo sítio: ABF e JE/SMD. É feita a seguir a descrição da aplicação destes métodos, bem como dos resultados.

5.2.1 Determinação de ΔG pelo método ABF

Para investigar ΔG de dissociação de T3 e T4 no segundo sítio de ligação pelo método ABF é necessário inicialmente escolher uma coordenada de reação que represente o processo em estudo adequadamente. A coordenada escolhida foi a distância escalar (ξ) que separa o centro de massa do ligante de um “átomo fantasma” colocado a 20 Å do segundo sítio, no seio da solução¹⁶. O LBD do TR foi mantido sem translação e rotação por um potencial harmônico suave aplicado aos átomos de carbono- α localizados a mais de 20 Å do segundo sítio. A distância percorrida entre o ligante e o segundo sítio foi $0 \leq \xi \leq 15$ Å. A coordenada inicial do sistema foi obtida a partir da última etapa de uma das simulações de MD convencional.

¹⁶Em simulações de MD, átomos fantasmas ou *dummie atoms* referem-se a átomos isolados sem carga e sem parâmetros de Lennard Jones. Logo, seu potencial de interação com o restante dos átomos é zero. Tais átomos podem ser utilizados como pontos de referência fixo numa coordenada de reação.

A escolha da distância escalar vem do fato do segundo sítio estar na superfície do LBD, logo, não existe um caminho específico de dissociação, como seria necessário definir caso o método ABF fosse aplicado a ligantes no primeiro sítio. Dessa forma, não é necessário definir uma direção para a coordenada de reação, ou seja, ξ não precisar ser uma variável vetorial. Além disso, as características do método ABF já fazem com que a força utilizada para mover o sistema na coordenada de reação (\vec{F}_{ABF}) dê o sentido do processo, dado que ela é definida pelo valor negativo de $\langle \vec{F}_{sist} \rangle_{\xi}$, exercida pelo potencial próprio sistema.

Os valores de $\langle \vec{F}_{sist} \rangle_{\xi}$ foram adquiridos em janelas $\Delta\xi$ de 0,1 Å de largura. Potenciais de fronteira com força constante de 10 kcal.mol⁻¹.Å⁻² nas extremidades da faixa de distância percorrida também foram usados. Esses parâmetros foram escolhidos com base em outros cálculos de energia livre usando o método ABF [141–143]. Para o sistema com T3 no segundo sítio, quatro simulações de ABF foram realizadas variando apenas o número mínimo de passos de MD amostrados para cada janela $\Delta\xi$ (N_{amost}) antes da aplicação da F_{ABF} . O valor de N_{amost} adequado para obtenção do ΔG pode variar consideravelmente de acordo o sistema em estudo. Quanto maior N_{amost} , maior é a amostragem em cada janela $\Delta\xi$ da coordenada de reação e, conseqüentemente, melhor a acurácia da $\langle \vec{F}_{sist} \rangle_{\xi}$. Entretanto, isso também torna o custo computacional da simulação mais alto. Foram feitas simulações preliminares com N_{amost} igual a 500 (total de 10 ns), 1000 (10 ns), 2000 (25 ns) e 10000 (40 ns) para tentar obter um valor de N_{amost} adequado ao problema em estudo.

Pouca alteração foi observada nos valores finais de ΔG obtidos com N_{amost} iguais a 2000 e 10000, indicando que 2000 pode ser um valor razoável. Todavia, foram observadas diferenças em algumas regiões das curvas do potencial de força média (PMF, ou variação de energia livre com a coordenada de reação, $\Delta G(\xi)$). Para aumentar a amostragem nessas regiões, três simulações adicionais de 20 ns com N_{amost} igual a 2000 foram feitas em três faixas de distância menores: $0 \leq \xi \leq 3$ Å; $2,5 \leq \xi \leq 6,5$ Å e $6 \leq \xi \leq 11$ Å. A curva de PMF final foi calculada considerando a média das quatro simulações de N_{amost} iguais a 2000 e da simulação de N_{amost} igual a 10000, sendo o resultado mostrado na Figura 5.9. A média foi feita ponderando amostragem da $\langle \vec{F}_{sist} \rangle_{\xi}$ realizada de cada janela $\Delta\xi$ em cada uma das simulações. O mesmo protocolo foi feito para o ligante T4.

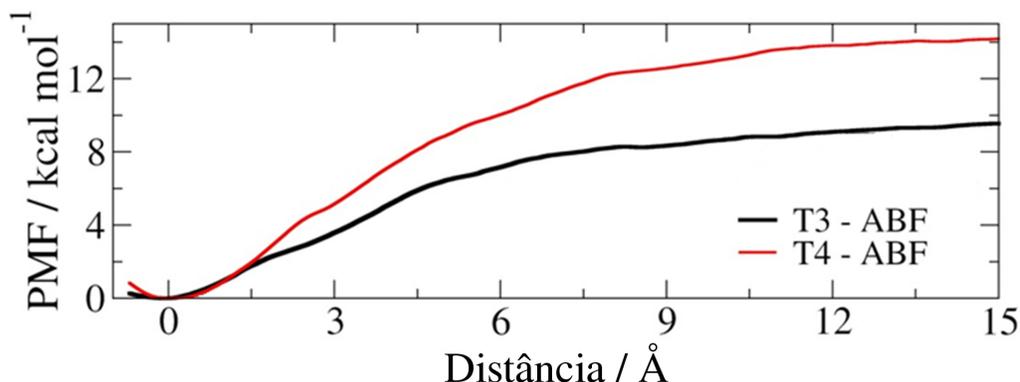


Figura 5.9. ΔG de dissociação dos ligantes T3 e T4 do segundo sítio de ligação obtida pelo método ABF

Os valores finais obtidos de ΔG de dissociação para T3 e T4 foram de 9,6 e 14,2 kcal.mol⁻¹, respectivamente. Tais valores correspondem a constantes de equilíbrio de dissociação (K_d) de 90,9 nM para T3 e 0,04 nM para T4. Estes resultados são consistentes com as observações de MD equilíbrio e sugerem que T4 como forte candidato a ser o ligante natural do segundo sítio, dado que seu K_d ser da ordem dos valores experimentais obtidos para ligantes do TR das quais se supõe associarem-se apenas ao primeiro sítio [139].

5.2.2 Determinação de ΔG pelo método JE/SMD

Como não foi possível obter nenhum dado experimental da afinidade dos hormônios naturais pelo segundo sítio (para comparação com os valores obtidos pelo método ABF), decidiu-se tentar obter ΔG de dissociação através de outro método computacional conceitualmente diferente: igualdade de Jarzynski e Múltiplas Simulações de Dinâmica Molecular por Caminho Induzido (JE/SMD).

Dado à concepção deste método, é necessário neste caso a escolha de uma coordenada de reação vetorial ($\vec{\xi}$), onde o ligante se dissociará do sítio de ligação na direção da força \vec{F}_{ext} aplicada. Esta força foi aplicada ao centro de massa do ligante, de maneira que este fosse puxado em direção ao solvente. Tal como no método ABF, alguns vínculos harmônicos foram adicionados aos átomos de carbono- α a mais de 20 Å do segundo sítio de ligação, de maneira manter a proteína sem rotações e translações enquanto o ligante é puxado pela \vec{F}_{ext} .

A escolha dos parâmetros \vec{v} e k foi feita com base num compromisso entre custo computacional reduzido (simulações curtas, de 4 à 5 *ns*) e realização de processo de dissociação próximo ao regime reversível (buscando assim a obtenção de trabalhos com baixa dispersão, logo, rápida convergência). Para alcançar este compromisso, iniciamos a escolha dos parâmetros \vec{v} e k com base em trabalhos prévios do grupo [35], seguido de simulações de SMD preliminares alterando ligeiramente as variáveis. Ao final, foram escolhidos os valores de \vec{v} e k iguais a $6,6 \cdot 10^{-6} \text{ \AA} \cdot ps^{-1}$ e $4 \text{ kcal} \cdot mol^{-1} \cdot \text{ \AA}^{-2}$, respectivamente, sendo a direção de \vec{v} igual a direção z (0,0,1) da caixa de simulação. Estes parâmetros permitiram completa dissociação de T3, de 0 a 15 \AA (da superfície do LBD ao seio do solvente) em 4,25 *ns*, com a menor média e dispersão dos W dentre os testes realizados.

A princípio, foram selecionadas cinco configurações iniciais de cada uma das 6 simulações de equilíbrio do sistema TR α -T3-T3, totalizando 30 simulações de SMD. O valor de ΔG de dissociação com esta amostragem foi bem maior que o obtido pelo método ABF. Além disso, a curva PMF obtida possuía um aspecto ruidoso, muito semelhante ao da simulação de SMD que resultou no menor trabalho de dissociação. Este resultado é mostrado na curva vermelha da Figura 5.10C.

A partir desta experiência, o número de simulações foi sendo aumentado gradativamente variando as configurações iniciais, mas ainda sem convergência do resultado. Dado que custo computacional já em muito excedia o método ABF, este estudo passou também explorar aspectos metodológicos, buscando maneiras de otimizar a convergência do ΔG . Além disso, focou-se apenas no sistema com T3 no segundo sítio.

Um dos maiores problemas da obtenção de ΔG através do método JE/SMD é as simulações que resultam nos menores trabalhos para dissociação do ligante (W). Apesar de pouco frequentes, os menores W são o que mais contribuem para o valor da média exponencial da igualdade de Jarzynski. Uma amostragem precisa destes eventos, tanto de seu comportamento médio, como da frequência com que podem ocorrer, é essencial. Outro aspecto importante é a distribuição dos trabalhos. Quanto mais próxima ela for de uma distribuição gaussiana, mais rápido sua convergência, dado que isto indica que os processos realizados estão mais próximos de um regime reversível.

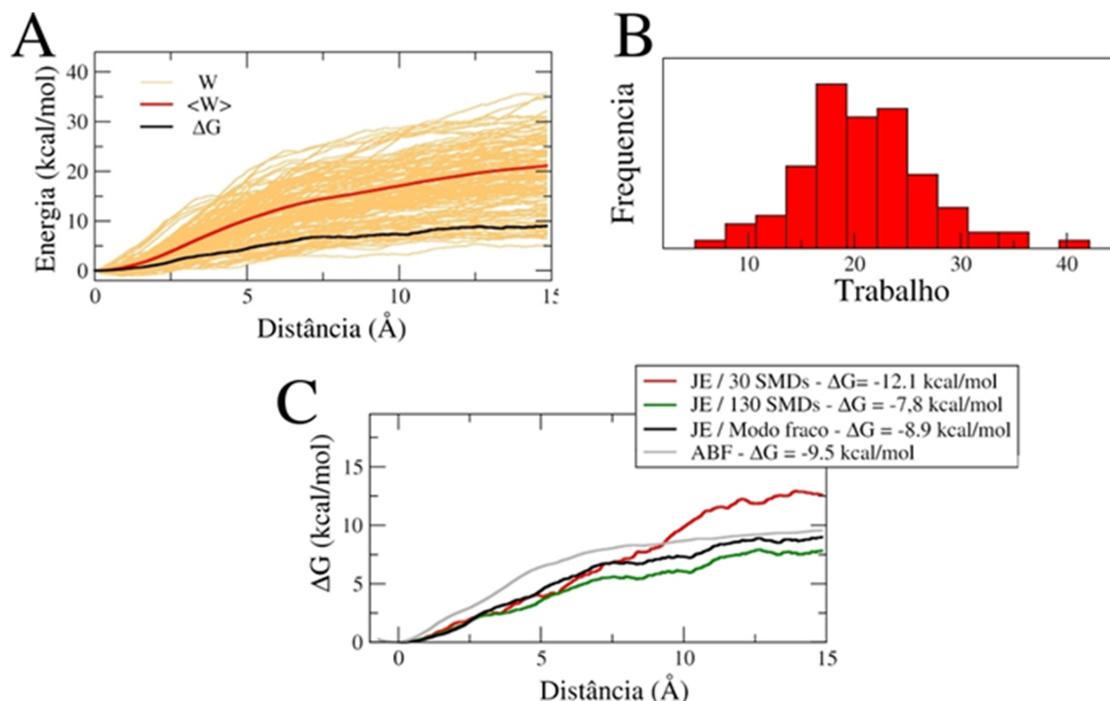


Figura 5.10. ΔG de dissociação do ligante T3 do segundo sítio de ligação obtida pelo método JE/SMD: (A) Trabalhos obtidos com todas as 130 SMDs realizadas (laranja), média dos trabalhos (vermelho) e ΔG obtido, ponderando a frequência dos menores trabalhos de dissociação; (B) Distribuição de trabalhos obtidos; (C) ΔG calculado via igualdade de Jarzynski à partir de 30 SMDs (vermelho), 130 SMDs (verde) e 130 SMDs ponderando a frequência dos menores trabalhos de dissociação com a frequência de ocorrência do modo fraco de ligação. Para comparação coloca-se o ΔG com o método ABF (cinza).

As Figuras 5.10A e 5.10B mostram claramente a baixa frequência dos menores valores de W . Além disso, apesar de semelhante a uma distribuição gaussiana, o valor do σ_W foi muito alto em relação a média $\langle W \rangle$. Dada essas características, foi impossível o cálculo do ΔG pela abordagem de cumulantes (Equação 4.17), visto que eram obtidos valores de ΔG de dissociação negativos, logo, sem sentido físico. Dessa forma, foi utilizada apenas a abordagem exponencial (Equação 4.16).

Sabe-se que processos realizados fora do equilíbrio dependem das condições iniciais do sistema. Os resultados das simulações de MD tradicionais mostraram que T3 possui vários modos de ligação quando associado ao segundo sítio (seção 5.1.2). Uma vez que as configurações iniciais das simulações SMD partiram destes

modos de ligação, não é surpresa a grande dispersão nos valores de trabalho obtido.

Ao verificar a correlação das configurações iniciais utilizadas com o valor de W , observou-se que maioria dos menores W de dissociação relacionam-se diretamente com modos de ligação fracos (modo de ligação III, Figura 5.6C). A partir desta constatação, foram realizadas novas simulações de SMD, de maneira a aumentar a amostragem dos processos envolvendo menores trabalhos.

Com os resultados obtidos, foi calculado ΔG pela abordagem exponencial de duas formas: 1) considerando todas as simulações de SMD realizadas igualmente (um total de 130); 2) considerando a frequência com que seriam gerados os menores W como a frequência com que foi observado o modo fraco de ligação observado nas simulações de equilíbrio. Esta frequência foi calculada pela integral do gráfico de distribuição de energia de interação LBD-ligante do T3 (Figura 5.6A), sendo obtido 2,54% do total de tempo das 6 simulações para o modo de ligação III.

Como pode ser observado na Figura 5.10C, ponderando a frequência dos menores trabalhos W (curva preta) obteve-se os valores de ΔG mais similares ao método ABF (curva cinza). Não era esperado que as curvas PMF fosse idênticas, dada que as coordenadas de reação ξ utilizadas foram diferentes. Todavia, a obtenção do ΔG de dissociação do T3 por duas metodologias independentes torna mais robusta a hipótese de que ligantes devem associar-se ao segundo sítio. A Tabela 5.1 resume os resultados obtidos para o ΔG de dissociação, K_d e tempo de simulação.

Tabela 5.1. Resultados obtidos nos cálculos do ΔG de dissociação dos ligantes do segundo sítio de ligação.

Ligante	Método	$\Delta G / \text{kcal.mol}^{-1}$	K_d / nM	Tempo de simulação / ns
T3	SMD/JE	8,9	296,40	585
T3	ABF	9,6	90,90	125
T4	ABF	14,2	0,04	125

Vale, ainda, destacar que outro resultado importante deste estudo foi de caráter metodológico, no sentido de mostrar uma nova possibilidade de se melhorar a acurácia dos ΔG obtidos pelo método JE/SMD: através da identificação da correlação entre as configurações iniciais e os trabalhos obtidos. Existindo esta correlação, é possível produzir um conjunto mais efetivo de simulações de SMD para o cálculo do ΔG , priorizando os processos que resultem nos menores valores de W .

5.3 A função do novo sítio e o desenvolvimento de ligantes antagonistas

A faixa de concentrações séricas e intracelulares dos hormônios tireoideanos [168] e as afinidades previstas nesta Tese de Doutorado sugerem o T4 como um forte candidato para ser o ligante natural do segundo sítio do TR em condições fisiológicas. No entanto, o hormônio T3 não deve ser descartado dado que: 1) a concentração intracelular de T3 é geralmente maior que a sua concentração no plasma sanguíneo, enquanto com T4 ocorre o inverso [168]; 2) existe heterogeneidade na localização do T3 nos diversos compartimentos celulares [169], sendo importante na verdade sua concentração dentro do núcleo, onde se associam aos TRs; 3) existe pequena quantidade de TRs (de 2 à 10 mil) no núcleo de cada célula [170], o que pode facilitar a saturação dos sítios de ligação LBD, mesmo a baixas concentrações de T3.

Baseado nestas informações, acreditamos que a existência do segundo sítio seja uma hipótese razoável, o que nos leva a próxima questão: qual seria sua função biológica? De acordo com as simulações de MD, observou-se que o ligante no primeiro sítio de ligação possui menor interação com o LBD quando outro ligante está presente no segundo sítio, tal como descrito na seção 5.1.3. A ligação de hormônios tireoideanos no primeiro sítio é responsável pela atividade do TR, dado que ela repercute nas alterações conformacionais na H12 que levam o LBD associar-se com CoAs e ativar a transcrição. Logo, uma menor afinidade do ligante no primeiro sítio causada pela ligação de hormônios ao segundo poderia estar relacionada a um mecanismo de repressão da transcrição gênica, numa forma de um *feedback* negativo dependente da concentração intracelular dos hormônios.

Alguns estudos na literatura corroboram esta hipótese. Por exemplo, experimentos da cinética de dissociação de ligantes do TR mostram que certos ligantes do TR (incluindo o T4) podem influir na ligação do T3 no primeiro sítio de ligação, acelerando sua dissociação [171]. Estes resultados foram explicados pela hipótese de que estes ligantes poderiam estar ancorando-se em uma região diferente de LBD. Logo, uma possibilidade é a de que esta região diferente possa ser o próprio segundo sítio de ligação discutido nesta Tese.

Outro dado que reforça a hipótese deste novo sítio estar relacionado à repressão é a existência de uma isoforma do TR no peixe paulistinha, que possui o chamado domínio F, uma extensão do C-terminal que outros NRs possuem. A comparação com outros NRs sugere que este domínio ancora-se exatamente na região do segundo sítio, tal como mostra a Figura 5.11. Surpreendentemente, resultados comparando TR com e sem o domínio F indicam que a atividade transcricional é reprimida na presença deste [172], tal como formulado à partir dos resultados das simulações de MD aqui apresentados.

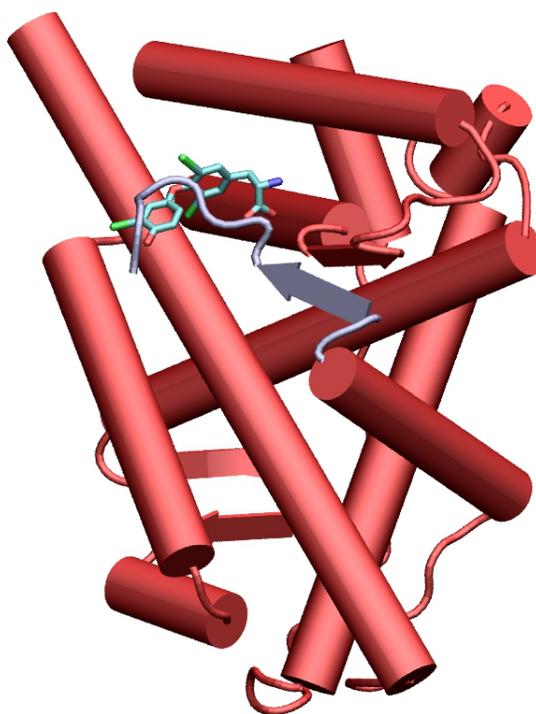


Figura 5.11. Estrutura do LBD do AR (código PDB: 1XOW) com seu domínio F (azul) e o T3 no segundo sítio de ligação (as estruturas do TR e AR estão alinhadas, mas o LBD do TR não é mostrado). É bem clara a similaridade da posição deste domínio e a de T3.

Dada à possibilidade de estabelecer uma função para o este novo sítio em humanos (que não possuem isoformas com domínio F), foi sugerida ao grupo do Prof. Dr. Igor Polikarpov a realização de experimentos *in vivo* em que seja monitorada a atividade transcricional do TR com aumento da concentração de T3 e T4. Os resultados destes experimentos ainda não foram conclusivos.

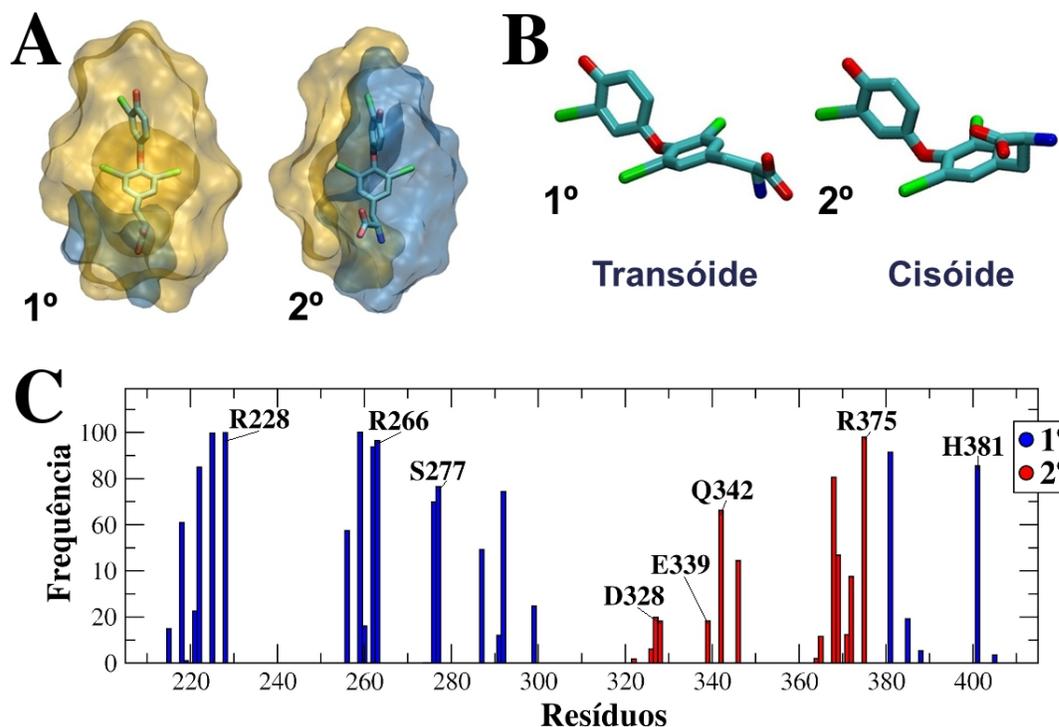


Figura 5.12. As principais diferenças entre o ligante T3 no primeiro e no segundo sítio de ligação: (A) Hidrofobicidade; (B) Conformação do ligante; (C) Contatos ligante-proteína, onde se observa uma maior frequência de contatos no primeiro sítio. Além disso, verifica-se no primeiro sítio que parte destes contatos envolve pontes salinas entre T3 e resíduos básicos, de carga positiva em pH fisiológico (R228 e R262). Já no segundo sítio, ocorrem pontes salinas do ligante tanto com um resíduo básico (R375), como com resíduos ácidos, de carga negativa (D328 e E339).

Se confirmada esta função, ligantes que se associem seletivamente ao segundo sítio podem ser utilizados com antagonistas. Para este objetivo, é assim importante caracterizar e diferenciar ambos os sítios. As interações com os resíduos R375 e Q342 são bem semelhantes às interações observadas no primeiro sítio de ligação para ambos os hormônios, especialmente no TR β , onde o ligante também interage com uma arginina e uma glutamina. Dessa forma, alterar a interação com estes resíduos não deve permitir seletividade a um dos sítios. Entretanto, existem outras características com diferenças importantes, como é destacado na Figura 5.12 para o ligante T3 em ambos os sítios de ligação.

Primeiramente, verifica-se que o segundo sítio é menos hidrofóbico e mais exposto ao solvente (Figura 5.12A). Outra diferença é conformação dos ligantes (Figura 5.12B). Observa-se que o ligante encontra-se em uma conformação diferente no segundo sítio (cisóide) em relação ao primeiro (transóide). Ligantes mais rígidos, logo, presos do ponto vista conformacional na conformação cisóide, provavelmente devem ter seletividade pelo segundo sítio. Verifica-se, ainda, a presença de resíduos negativamente carregados no segundo sítio, interagindo de maneira dinâmica com o ligante. No primeiro sítio, em vez de resíduos negativos, existem resíduos positivos na cavidade (Figura 5.12C). Estas diferenças em conjunto, podem ser exploradas no futuro para o desenvolvimento de ligantes seletivos a um dos sítios.

Capítulo 6

A estrutura e dinâmica do *apo*-TR

A conformação da α -hélice H12 é essencial para os NRs exercerem sua função. Entretanto, apesar do grande esforço da comunidade científica, pouco ainda se conhece sobre sua conformação e dinâmica nos receptores sem ligantes. Um número reduzido de estruturas de *apo*-NRs encontra-se disponível, existindo grande controvérsia a respeito delas, visto que elas têm sido consideradas artefatos por efeitos de empacotamento cristalino.

A dificuldade em obter estruturas indica que provavelmente os *apo*-NRs sejam mais móveis e instáveis do que NRs associados a ligantes (*holo*-NRs). Experimentos de desnaturação térmica apoiam esta visão, mostrando que a associação dos ligantes aumenta a temperatura de desnaturação dos NRs, estabilizando-os [173].

Na tentativa de conhecer mais a respeito de *apo*-NRs sob uma perspectiva molecular, muitos grupos têm optado por utilizar outras técnicas experimentais, diferentes da cristalografia de proteínas. No caso do TR, por exemplo, não existem estruturas do LBD sem ligantes e nem mesmo associado a antagonistas. Dada a dificuldade de obter estruturas de LBDs do TR nestes estados, o grupo do Prof. Dr. Igor Polikarpov realizou estudos estruturais e dinâmicos destes sistemas através da técnica conhecida como troca hidrogênio/deutério (H/D).

Nesta técnica, amostras de proteínas são incubadas em água pesada (D_2O) promovendo a troca dos átomos de hidrogênio das amidas do *backbone* por deutério, o que pode ser detectado por análises de espectrometria de massas (MS) das proteínas intactas ou de peptídeos obtidos da digestão proteolítica da mesma. Como os átomos de hidrogênio das amidas devem estar expostos à água pesada para a troca

por deutério ocorrer, o aumento da massa da proteína intacta ou do peptídeo após a incubação em D₂O fornece o grau de exposição a este solvente. Logo, conhecendo a estrutura primária de uma proteína, é possível prever quais regiões da sequência de resíduos estão na superfície e quais estão no interior hidrofóbico, fazendo pouco contato com o solvente, e assim incorporado pouco deutério. Além disso, como regiões de grande mobilidade da proteína são mais expostas ao solvente do que regiões rígidas, a técnica também dá indícios da dinâmica molecular desta biomolécula. Existindo alguma estrutura cristalográfica da proteína semelhante à estudada por troca H/D, os resultados do experimento podem ser mais bem interpretados, podendo indicar quais mudanças conformacionais ocorreram.

O grupo do Prof. Dr. Igor Polikarpov realizou experimentos de troca H/D dos LBDs do *apo*-TR β e do TR β associado a T3 (ligante natural agonista) e ao NH-3 (ligante sintético antagonista). Foi comparada a incorporação de deutério pelas proteínas intactas e pelos peptídeos produzidos pela ação da enzima pepsina. Os resultados obtidos mostram que a associação de ligantes reduz a incorporação de deutério dos LBDs intactos. Após incubação com D₂O por 5 horas, a troca por deutério chega a quase 80% das amidas do *apo*-TR β , enquanto o TR β associado a T3 ou NH-3 incorpora deutério em cerca de 50% das amidas. Este resultado sugere que o LBD do *apo*-TR é mais exposto ao solvente, indicando maior mobilidade e/ou instabilidade de suas estruturas [84].

A análise dos resultados de MS dos peptídeos após a proteólise permitiu identificar em quais regiões do LBD ocorreu maior exposição à água pesada. Como esperado, a associação de ligantes leva a um aumento do grau de proteção ao solvente em regiões próximas da cavidade hidrofóbica do sítio de ligação. Entretanto, este não foi o único efeito. Os *holo*-TRs também apresentaram maior grau de proteção ao solvente em outras regiões, longe do primeiro sítio de ligação, incluindo as α -hélices H10 e H11, localizadas na superfície do LBD. Sabe-se que estas hélices são importantes para dimerização dos TRs [41, 42]. Além disto, esta região também é parte do segundo sítio de ligação do TR, conforme apresentado no Capítulo 5.

O resultado mais surpreendente obtido neste estudo foi verificar que o grau de exposição ao solvente da região C-terminal da α -hélice H3 dos LBDs do *apo*-TR β e do TR β ligado ao NH-3 são semelhantes e apresentam menor hidratação

quando comparados ao LBD do TR β associado ao T3, como mostra a Figura 6.1A. Este resultado sugere a existência de uma diferença conformacional entre TR β -T3 e os outros sistemas. Outro aspecto intrigante é o fato de não existir aumento significativo da hidratação da H12 do *apo*-TR β , o que seria esperado caso ela estivesse na posição aberta, tal como proposto no mecanismo da ratoeira. O mesmo é observado para TR β associado a NH-3.

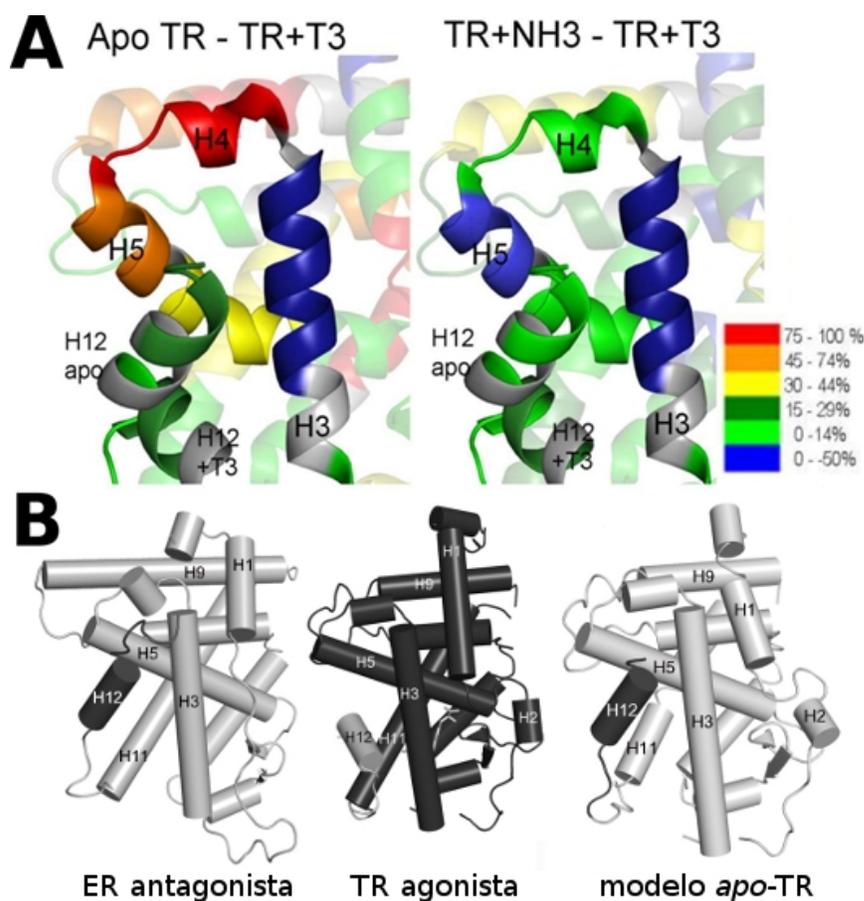


Figura 6.1. Resultados dos experimentos de troca H/D e modelo estrutural do *apo*-TR: (A) Diferença do grau de exposição ao solvente do *apo*-TR β e do TR β -NH-3 em relação ao TR β -T3. Esta diferença é colocada numa escala de cores na estrutura do LBD, incluindo a H12 na posição antagonista. (B) Estruturas dos LBDs do ER associado a um antagonista (com H12 ancorada na H3), TR β ligado a agonista e modelo do *apo*-TR β com H12 em posição antagonista (híbrido das duas outras estruturas).

Estes resultados indicam que H12 não está aberta, livre na solução aquosa, nos LBDs do *apo*-TR β e do TR β -NH-3, mas ancorada na superfície do LBD, numa região diferente do TR β -T3. A menor hidratação do C-terminal da α -hélice H3 do *apo*-TR β e do TR β -NH-3 sugere que possivelmente esta região é onde está a H12.

Com base nestas análises e na estrutura conhecida de NRs associados a antagonistas, foi proposto um modelo para a estrutura do *apo*-TRs e de TRs associados a antagonistas, onde a H12 encontra-se exatamente ancorada sobre o C-Terminal da H3, tal como mostram as Figuras 6.1A e 6.1B. Este modelo estrutural proposto ilustra uma possível conformação da H12 que explica os resultados obtidos com os experimentos de troca H/D.

Apesar da importância deste primeiro modelo, ele não possibilita explicar outras diferenças de hidratação já mencionadas, em especial as observadas para o *apo*-TR β . Por exemplo: o que acontece com o sítio de ligação na ausência de ligantes? Quais alterações ocorrem nas α -hélices H10 e H11 que explicam as variações de hidratação dessa região? Poderiam estas alterações conformacionais explicar por que os *apo*-TRs tendem homodimerizar e não formar dímeros com o RXR? Para tentar responder estas questões, foram realizadas novas simulações de MD, sendo a metodologia específica utilizada e os resultados obtidos apresentados a seguir.

6.1 Condições das simulações de MD

Na tentativa de obter um modelo mais refinado do *apo*-TR, com informações estruturais e também dinâmicas que possibilitem explicar os resultados obtidos dos experimentos de troca H/D, foram feitas novas simulações de MD, conforme a sequência de etapas:

1. Três simulações independentes de 20 *ns* cada, a 298 *K* e 1 *bar* (*ensemble NPT*), tendo como configuração inicial a conformação agonista (H12 fechada) do complexo LBD do TR β -T3 (código PDB: 2H79; resolução de 1,87 Å), a partir do qual o ligante foi excluído. Estas simulações foram feitas com objetivo de tentar caracterizar se ocorre alguma mudança na estrutura e dinâmica do LBD do TR quando retirado o ligante em condições termodinâmicas normais e em tempos da ordem de *ns*.

- Três simulações independentes de 20 *ns* cada, a 498 *K* sendo mantida constante a densidade da solução em 1 $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ (*ensemble NVT*). As configurações iniciais destas simulações foram retiradas do último passo das simulações da primeira etapa desta metodologia e foram termalizadas a 498 *K* durante 500 *ps* antes de iniciar as simulações. Estas simulações foram feitas para provocar mudanças mais drásticas no LBD do TR, de maneira a aumentar a taxa de conversão entre as conformações *holo* e *apo*.
- Três simulações independentes de 20 *ns* cada, a 298 *K* e 1 bar (*ensemble NPT*), tendo como configurações iniciais as estruturas mais semelhantes ao modelo *apo* híbrido, apresentado na Figura 6.1B. Estas simulações foram feitas para resfriar as estruturas obtidas na etapa anterior, restaurando qualquer perda de estrutura secundária devido ao pequeno grau de desnaturação que possa ter ocorrido, mas, ao mesmo tempo, mantendo as alterações decorrentes da retirada do ligante.

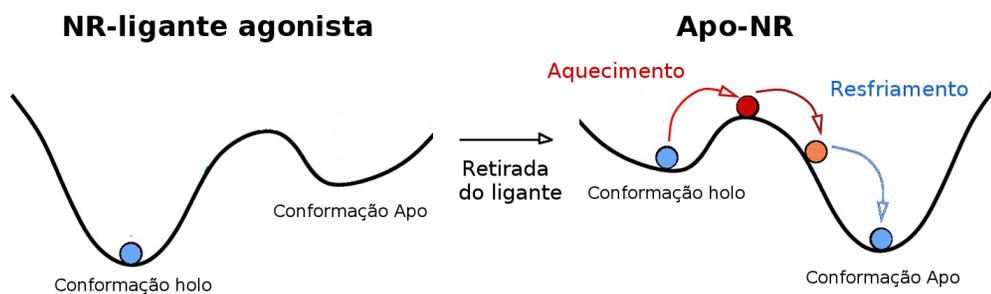


Figura 6.2. Ilustração do procedimento utilizado para induzir mudanças conformacionais no LBD do TR. A retirada do ligante altera a superfície de energia do LBD, sendo necessário aquecimento seguido de resfriamento para alcançar a conformação *apo*.

Para melhor compreender esta estratégia adotada, ela pode ser discutida em termos da Teoria da Paisagem Energética, como mostra a Figura 6.2. A retirada do ligante realizada antes da etapa 1, corresponde a uma mudança na superfície de energia da proteína, onde a estrutura do LBD com a H12 fechada passa a não ser mais um mínimo global. As simulações a 298 *K* da etapa 1 foram utilizadas para tentar levar o sistema do mínimo local (H12 fechada) para o novo mínimo global (H12 em nova posição). Para aumentar a taxa de conversão entre estes estados, na

etapa 2 foi adicionada energia ao sistema na forma de aumento de temperatura. As conformações do mínimo global foram então identificadas com base nos resultados obtidos no experimento de troca H/D, em especial no que se refere à conformação da H12. Por fim, estas estruturas são resfriadas a 298 *K* na terceira etapa, para posterior análise das conformações finais obtidas.

Para caracterizar as mudanças conformacionais ao longo destas etapas, calculou-se o RMSD das posições dos átomos de carbono- α da H12 em relação a duas referências distintas: 1) conformação agonista TR β utilizado para iniciar as simulações MD na primeira etapa da metodologia (conformação do *holo*-TR β associado ao T3); 2) modelo *apo* híbrido construído a partir dos resultados de troca H/D. O alinhamento das conformações das trajetórias foi feito em relação às regiões mais rígidas do *backbone*, enquanto o cálculo do RMSD foi feito apenas para a H12 (resíduos 455-459).

O modelo *apo* híbrido foi construído tomando como base a posição da H12 do *holo*-ER associado a um antagonista (código PDB: 3ERT; resolução de 1,90 Å) e o restante do LBD do TR β na conformação *holo* agonista.

Antes de serem observadas as conformações obtidas por este procedimento, foram realizadas análises preliminares de propriedades estruturais do LBD (raio de giração e conteúdo de estrutura secundária) ao longo das simulações de MD das três etapas do procedimento, de maneira a garantir que não ocorreu alguma desnaturação relevante da estrutura. Vale destacar que embora à primeira vista a temperatura de 498 *K* pode parecer exageradamente alta, o impacto global sobre a estrutura LBD não é severo para os tempos de simulação da ordem de 20 *ns* ou menos, como já observado em condições de simulação similares utilizadas em estudos prévios de desnaturação feitos por nosso grupo [173].

6.2 Mudanças conformacionais da H12

O primeiro passo ao analisar a sequência de simulações de MD realizadas nas etapas 1 e 2 do procedimento foi verificar se houve alterações conformacionais na posição da H12. Apesar das simulações em condições normais de temperatura e pressão (298 *K* e 1 *bar*) serem relativamente longas, não se detectou nenhum reposicionamento da α -hélice H12, tal como mostrado no gráfico superior da Figura

6.3A. O RMSD em relação à estrutura cristalográfica *holo* (linha preta do gráfico) permaneceu aproximadamente constante, em torno de 1,5 Å (gráfico superior, linha preta), enquanto o RMSD em relação ao modelo *apo* híbrido (curva vermelha) permaneceu igualmente constante, porém com valores maiores de RMSD, em cerca de 12,5 Å.

Estes resultados mostram claramente que a estrutura, mesmo sem o ligante, permaneceu semelhante à estrutura *holo* agonista, com H12 fechada. Praticamente o mesmo resultado é obtido para simulações onde o ligante T3 está presente no LBD. Isto ocorre porque a estrutura deve estar presa num mínimo local, devido às interações da H12 com o corpo do LBD. Além disso, as simulações de MD utilizadas são curtas (20 ns) em relação ao tempo que este processo deve realmente ocorrer (por exemplo, após a dissociação do ligante em meio fisiológico). Um resultado semelhante foi obtido em simulações do LBD do ER [63].

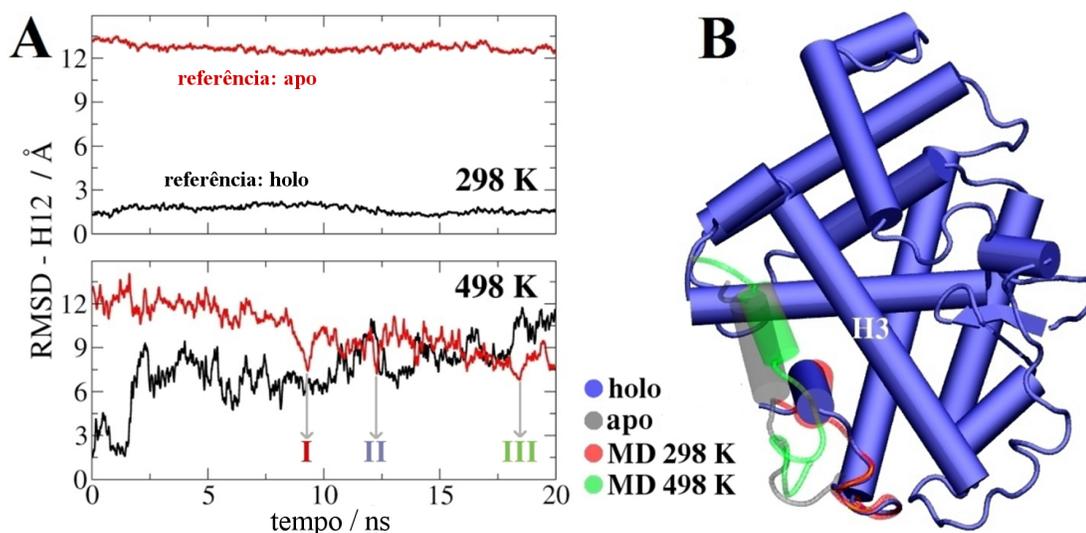


Figura 6.3. Mudanças conformacionais da H12: (A) A transição da estrutura *holo*-TR para o modelo *apo*-TR via simulações de MD não ocorre a 298 K durante 20 ns (gráfico superior). Aumentando a temperatura, verifica-se que ocorre transformação *holo* → *apo* (gráfico inferior). (B) Posição da H12 na estrutura *holo*-TR cristalográfica (azul), modelo *apo* híbrido do TR com ER (cinza), estrutura final a 298 K (vermelha) e estrutura de menor RMSD em relação ao modelo *apo* híbrido nas simulações a 498 K (verde).

Para aumentar a probabilidade de observar mudanças na posição do H12, foram realizadas três simulações de temperatura mais elevada (498 K) de maneira a superar as barreiras de energia livre que impedem movimentos de grande amplitude de H12. Os resultados obtidos são mostrados no gráfico inferior da Figura 6.3A. Nestas condições, verificou-se que o RMSD da H12 em relação ao *holo*-TR aumenta de 1,5 a 10,0 Å (linha preta). Isto significa que a estrutura diverge da conformação *holo*-LBD, como esperado, devido ao aumento da temperatura da simulação. No entanto, o RMSD em relação ao modelo *apo* híbrido surpreendentemente cai de 12,5 para cerca de 6,5 Å. Portanto, verifica-se aqui que a estrutura se afasta da conformação *holo* e espontaneamente se aproxima da *apo*.

Para ilustrar estas alterações conformacionais, foi feita comparação da posição da H12 nas estruturas de referência, bem como das obtidas nas simulações a 298 e 498 K. Esta análise é mostrada na Figura 6.3B. Verifica-se que a estrutura média do LBD nas simulações a 298 K (cor vermelha) de fato se mantém muito semelhante a da conformação *holo* cristalográfica (cor azul). Já a estrutura de menor RMSD em relação ao modelo *apo* híbrido obtida a partir das simulações a 498 K (RMSD de aproximadamente 6 Å, cor verde) revela a H12 em uma nova posição, ancorada exatamente sobre a α -hélice H3, o que é muito semelhante a posição do modelo híbrido do *apo*-TR (cor cinza) e bem distinta da conformação do *holo*-TR agonista, com H12 fechada.

Desta forma, simulações de MD realizadas sem ligante mostram tendência espontânea da H12 em ancorar-se sobre a região da H3-H5, tal como previsto pelas interpretações dos dados de troca H/D.

6.3 Conformações do *apo*-TR

Após identificação das alterações conformacionais na H12 nas simulações de MD das etapas 1 e 2 do procedimento, foram realizadas simulações de resfriamento (etapa 3), partindo das três conformações mais semelhantes ao modelo *apo* híbrido, identificadas pelos menores valores de RMSD em relação a este modelo. Estas conformações foram denominadas I, II e III, sendo identificadas no gráfico inferior da Figura 6.3A.

Os resultados obtidos nas simulações de resfriamento são ilustrados pelas estruturas nas Figuras 6.4 e 6.6, onde as conformações I (vermelha) e II (azul) foram alinhadas com a conformação agonista do LBD do TR β -T3 (cinza). Como os resultados da conformação III foram muito semelhantes aos da conformação II, ambas as estruturas foram consideradas como um único modelo.

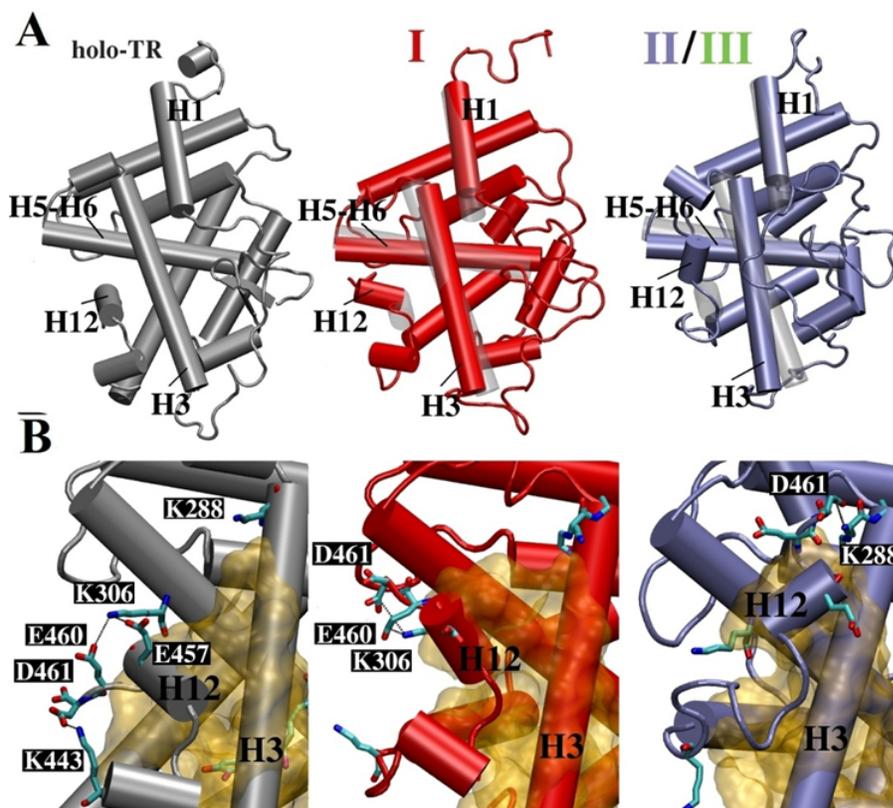


Figura 6.4. Comparação entre a estrutura do *holo*-TR agonista (cinza) e as estruturas médias obtidas das simulações de resfriamento das conformações de menor RMSD em relação ao modelo *apo* híbrido (I em vermelho e II em azul). A conformação III apresentou os mesmos resultados que II e não é mostrada na figura. Em bege translúcido é mostrada a superfície formada pelos resíduos hidrofóbicos do sítio de ligação e também das hélices H12 e H3.

Comparando de um ponto de vista mais global estas estruturas, verifica-se claramente na Figura 6.4A alterações nas posições das α -hélices H3 e H5. Mais importante, as estruturas *apo* resfriadas preservam a H12 encaixada sobre H3 e restauram a maioria dos elementos restantes da estrutura secundária.

A Figura 6.4B detalha as principais interações dos resíduos polares que mantêm a H12 nas estruturas *holo* e *apo*, além de destacar o grande número de resíduos hidrofóbicos da região através da superfície bege. Na estrutura *holo* agonista, H12 é ancorado por pontes salinas dos resíduos de carga negativa E457, E460 e D461, com os resíduos positiva K306 e K443, além de contatos hidrofóbicos com o restante da proteína e com o ligante. Parte dos resíduos hidrofóbicos da região está exposta, dado que as simulações foram feitas sem CoAs.

Na conformação resfriada I, H12 aparenta estar numa etapa intermediária entre as posições *holo* e *apo*, sendo provavelmente este um estado de transição entre as conformações. Uma das pontes salinas da conformação *holo*, envolvendo os resíduo K443 e D461 é perdida, mantendo apenas a interação entre K306 e E460. Esta lisina também faz, porém com menos frequência, um ponte salina com D461 nesta conformação. Nas estruturas II/III, H12 encontra-se na conformação *apo* final, protegendo o C-terminal da H3 da hidratação, como sugerido pelos experimentos de troca H/D. Além de contatos hidrofóbicos, é formada uma ponte salina entre K288 e D461, que deve ajudar na estabilização da H12 nesta posição.

Para confirmar as alterações na hidratação da porção C-terminal de H3 (composta dos resíduos 280-285 no peptídeo produzida na digestão proteolítica), foi calculado o número de moléculas de água próximas desta região nas simulações de MD a 298 K da conformação *holo* agonista (etapa I do procedimento) e nas simulações de MD de resfriamento (etapa III), sendo o resultado mostrado na Figura 6.5. É evidente neste gráfico que a hidratação da H3 na conformação II/III é menor do que na conformação *holo*, em especial na metade final das simulações. A conformação I mostra número de moléculas de água intermediário entre o observado na *holo* e nas conformações II/III.

Sem ligantes, os TRs se associam a CoRs, reprimindo a transcrição. Sabe-se que os resíduos hidrofóbicos destacados na Figura 6.4B são importantes para a interação com o motivo LXXXIXXX(I/L) de CoRs. Se a H12 pode ancorar-se sobre esta mesma região, seria esperado que existisse competição dela com CoRs por esta cavidade. Experimentos com mutações nesta região confirmaram esta hipótese [84]. Por exemplo, a mutação F451X do TR β , que envolve completa deleção da H12, mostra maior afinidade por CoRs na ausência de ligantes do que o TR β nativo. Este resultado só pode ser explicado se considerarmos que exista

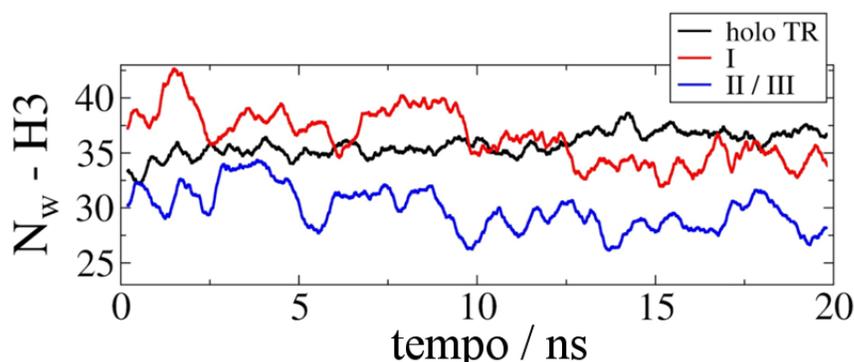


Figura 6.5. Hidratação da H3: Número de moléculas de água (N_w) a menos de 4 Å dos átomos que compõem o C-terminal da H3 nas simulações com a conformação *holo* agonista (linha preta) e de resfriamento dos modelos *apo* (vermelha para I e azul para II/III).

competição entre H12 e CoRs por esta mesma região. Isto também indica que quando associado à CoRs, a H12 deve estar em posição distinta dos modelos de estruturas *apo* aqui apresentados.

Voltando para as análises das conformações *apo*, a Figura 6.6A mostra as mesmas estruturas da Figura 6.4A, porém num outro ângulo. Observa-se que também ocorreram adaptações conformacionais nas α -hélices H8 e H11. H8 não altera tanto sua posição na conformação I. Entretanto na conformação II, ela se altera mais, tornando-se quase ortogonal em relação à H10. Já para H11, verifica-se que, em ambas as conformações, esta α -hélice dobra-se sobre o sítio de ligação, restaurando parte dos contatos hidrofóbicos perdidos com a retirada do ligante.

Este processo é mostrado em detalhe na Figura 6.6B onde se observa que as alterações conformacionais de H8 e H11 fazem com que a histidina H435, único resíduo polar na região hidrofóbica do sítio de ligação (indicada pela superfície bege) volta-se para o exterior da proteína. Como resíduos polares do sítio de ligação passam a voltar-se para a parte externa da proteína tem-se como consequência, maior hidratação destes, o que pode explicar como a região do sítio de ligação se torna mais hidratada nos experimentos de troca H/D.

Por fim, é interessante notar que estas mudanças em H8 e H11, ao mesmo tempo em que levam ao colapso do sítio de ligação, acabam por alterar a superfície de dimerização, em especial a região N-terminal da H11 e os contatos realizados

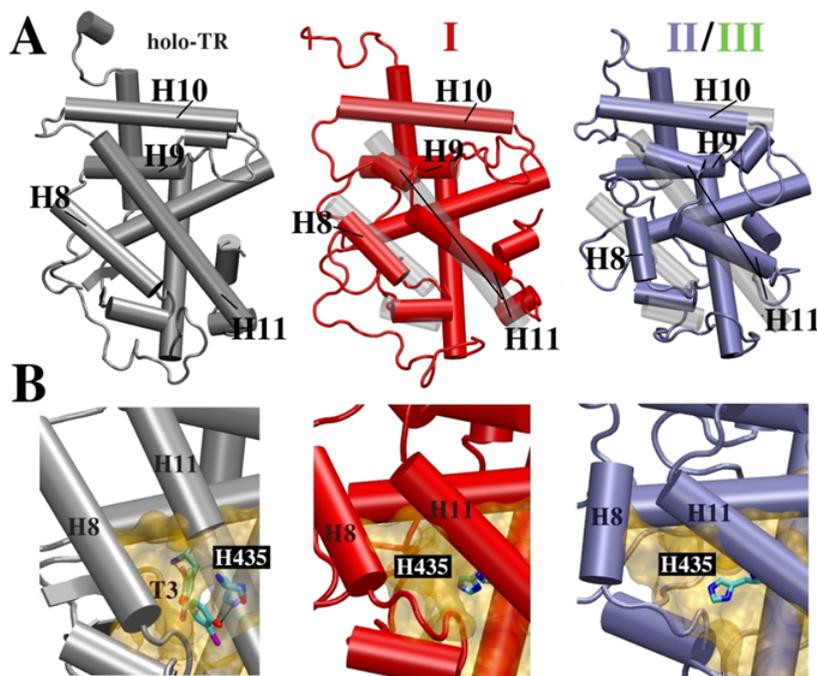


Figura 6.6. Outro ângulo da Figura 6.4, mostrando uma comparação entre a estrutura do *holo*-TR agonista (cinza) e das estruturas médias obtidas das simulações de resfriamento das conformações de menor RMSD em relação ao modelo híbrido (I em vermelho e II em azul). A conformação III apresentou os mesmos resultados que II e não é mostrado na figura. Em bege translúcido é mostrada a superfície formada pelos resíduos hidrofóbicos do sítio de ligação.

pela H10. Esta região torna-se mais aberta, o que pode explicar as alterações de hidratação observadas nos experimentos de troca H/D para esta região. Além disso, este resultado mostra como as superfícies de homo e heterodimerização podem ser diferentes.

Os resultados apresentados nesta seção, junto com experimentos de troca H/D e ensaios de mutagênese sítio-dirigida já foram publicados na revista *Molecular Endocrinology*. Maiores detalhes do estudo encontram-se na referência [84].

Capítulo 7

O estudo de mutações do TR

Nos últimos anos, o grande desenvolvimento da Biologia Molecular e das técnicas de expressão recombinante de genes possibilitou, entre outras aplicações, o uso de mutações artificiais para estudos da relação estrutura-função de proteínas, numa técnica conhecida como mutagênese sítio-dirigida. Parte do conhecimento dos sítios funcionais de LBD dos NRs vem de estudos experimentais deste tipo.

Geralmente, considera-se na mutagênese sítio-dirigida que uma mutação pontual (substituição de um único resíduo) cause apenas modificações locais de modo que ocorra perda funcional relacionada à região da estrutura onde se encontra o resíduo mutado. As regiões de interação com co-reguladores e de dimerização do NRs, por exemplo, foram identificadas inicialmente assim.

A literatura sobre NRs vem mostrando que apesar do sucesso da mutagênese sítio-dirigida, não apenas modificações locais podem ocorrer. Verifica-se, por exemplo, que algumas mutações na superfície de dimerização do LBD do TR ou em regiões próximas a ela, tal como as mutações listadas na Tabela 7.1, levam também a alterações da afinidade¹⁷ por ligantes ou mudanças na interação com proteínas co-reguladoras, mesmo com o resíduo mutado estando relativamente distante destas regiões [39, 41, 85, 86].

Outro ponto a destacar da Tabela 7.1 é que mesmo mutações próximas na estrutura podem provocar mudanças funcionais bem diferentes. As mutações L428R,

¹⁷A afinidade de mutações em relação a determinado ligante é usualmente dada pela razão entre as constantes de associação do LBD mutante ($K_a\text{mutante}$) e do nativo ($K_a\text{nativo}$), sendo $Afinidade = (K_a\text{mutante}/K_a\text{nativo}) \times 100$.

Tabela 7.1. Efeito de mutações na região de dimerização nas funções do TR β

Mutações	Afinidade pelo T3	Interação com Co-reguladores	Dimerização
R383H	70%	Altera	Altera
L400R	70%	Não Altera	Altera
M423R	174%	Não Altera	Altera
L428R	~ 1%	Não Altera	Altera
R429Q	~ 100%	Altera	Altera

R429Q e M423R¹⁸ por exemplo, estão bem próximos, como mostra a Figura 7.1. Ambos inibem a dimerização, mas provocam respostas diferentes na afinidade por T3 e na interação com co-reguladores.

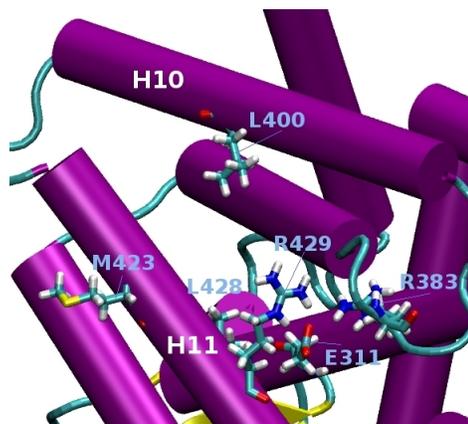


Figura 7.1. Localização dos resíduos E311, L400, M423, L428, R429, R383 que fazem parte da superfície de dimerização do LBD (partes das hélices H10 e H11). Mutações nestes resíduos inibem a dimerização, mas também levam alterações na afinidade pelo hormônio e na interação com co-reguladores (código PDB: 3GWS).

O fato de existirem poucas estruturas de mutações depositadas no PDB [174–176], enquanto já existem várias estruturas envolvendo os subtipos TR α e TR β nativos com diferentes ligantes, dá indícios da dificuldade de obtenção das estruturas de mutações. Esta dificuldade pode indicar que os TRs com mutações possuem

¹⁸Na nomenclatura de mutações, a primeira letra representa o resíduo da proteína nativa, ou seja, sem mutações. Em seguida é colocado um número, que indica a posição do resíduo na estrutura primária, e por último coloca-se o símbolo do novo resíduo, aquele que substituiu o original.

estruturas com grande mobilidade ou mesmo instáveis.

A comparação dos LBDs de TR β mutantes determinadas com TR β nativo indica que as alterações de resíduo induziram maiores valores do fator de temperatura, em especial no local da mutação. Também se verifica um pequeno aumento desta propriedade em outras regiões do LBD [174, 175]. Estes resultados indicam maior mobilidade e instabilidade da estrutura do LBD destes mutantes.

A instabilidade e as alterações de diversas funções biológicas não são novidades nos estudos estruturais e funcionais de outras proteínas com mutações. Levantamentos de resultados encontrados na literatura tem demonstrado que a maioria das proteínas mutantes que causam doenças apresentam mutações pontuais, que provocariam apenas instabilidade da estrutura proteica. Uma menor parcela de mutações provocaria apenas perdas funcionais ou efeitos conjugados de instabilidade e perda funcional [177, 178]. No caso do TR também existem mutações naturais que provocam uma doença hereditária, discutida a seguir.

7.1 Síndrome de resistência ao hormônio tireoideano

A síndrome de resistência ao hormônio tireoideano (RTH) é uma doença caracterizada pela reposta reduzida e variável de diferentes tecidos aos hormônios tireoideanos, apesar de suas concentrações séricas elevadas [68, 87].

Os sintomas clínicos mais comuns dos pacientes são: bócio, problemas de audição e de fala, retardamento mental, déficit de atenção, taquicardia, crescimento e maturação alterado dos ossos, associados à ausência dos sintomas comuns e de alterações metabólicas provocadas por excesso de hormônios tireoideanos (hipertiroidismo). Sendo uma doença hereditária, ela pode atingir os pacientes até mesmo antes do nascimento, durante a gestação.

Vinte anos depois dos primeiros casos descritos da doença (1967, por Refetoff [179, 180]), foi elucidada a base molecular da RTH, que se deve a anormalidades no receptor nuclear do hormônio tireoideano (TR). A maioria dos indivíduos com RTH (cerca de 80 a 85%) possui mutações no TR. Existem mais de 120 mutações identificadas em aproximadamente 300 famílias. Nunca foi descrito um único caso com mutações no TR α , apenas no TR β [87, 88, 181].

Grande parte das mutações são pontuais e estão localizadas no LBD [87]. De maneira geral, as mutações apresentam afinidade reduzida pelo T3, mas também existem algumas delas (tal como R429Q, já descrita na Tabela 7.1) que não alteram a afinidade, mas causam a doença (possivelmente alterando outras funções do LBD) [182–184]. As consequências dessas mutações são a não liberação de CoRs ou a interação mais fraca com CoAs, resultando em alterações na ativação da transcrição dos genes regulados pelo TR. Usualmente, os mutantes são capazes de se ligar ao DNA e homodimerizar com TR normais ou heterodimerizar com RXR, só que estes acabam competindo e bloqueando a ação dos TR normais. Este efeito é o chamado de efeito negativo dominante (DNE) [87].

Até pouco tempo atrás, não se conhecia como mutações que causam RTH alteram a estrutura e a dinâmica do LBD do TR β , já que apenas quatro estruturas terciárias de mutantes que provocam a doença (de mais de 120 conhecidas) foram obtidas [174]. Este foi o tema de pesquisa do autor deste texto em sua Dissertação de Mestrado [185]. Um resumo dos resultados obtidos é descrito a seguir.

7.2 Dinâmica molecular de mutações do TR

O trabalho desenvolvido pelo autor durante o Mestrado utilizou simulações de MD para explorar as possíveis alterações no LBD do TR β causadas por 40 mutações, sendo a grande maioria delas mutações pontuais de baixa afinidade e que causam RTH.

As conclusões mais importantes obtidas neste estudo indicam um conjunto de alterações em comum causadas por estas mutações. Grande parte delas provoca tanto modificações estruturais como dinâmicas no LBD, além de perda de interações hidrofílicas e de contatos hidrofóbicos com o hormônio T3, em especial na região que envolve o grampo- β . Estes efeitos ocorrem independentemente do local da mutação e podem estar associados à instabilidade estrutural dos LBDs mutantes e à perda de afinidade pelos ligantes. As análises realizadas sugerem ainda que as mutações envolvendo a troca de carga do resíduo mutado são as que mais reduzem (em magnitude) a interação do T3 com o receptor [185].

Todos estes efeitos são inusitados, principalmente porque boa parte das mutações está em locais distintos da estrutura, mas apresentam alterações estruturais e

dinâmicas em comum. Além dos resultados mais gerais, também foram realizados estudos mais específicos e detalhados de poucas mutações. Em um deles, foram investigadas três mutações pontuais distintas na mesma posição da sequência de resíduos: I280M, I280K e I280R, sendo esta uma pesquisa colaborativa envolvendo simulações de MD de nosso grupo e ensaios funcionais realizados pelo grupo do Prof. Dr. Francisco A. R. Neves (UnB). Foi demonstrado que estas mutações, ao mesmo tempo em que perturbam H12, levam a entrada de moléculas de água no sítio de ligação, o que permite explicar o porquê da baixa afinidade por hormônios e por CoAs [56, 185].

Além das mutações de baixa afinidade, também foram estudados durante o Mestrado alguns LBDs mutantes com alta afinidade pelos hormônios tireoideanos. Entretanto, nestes casos, não foi possível explicar de um ponto de vista molecular este fenômeno. Na época, ainda não se pensava, por exemplo, como os mutantes poderiam afetar o segundo sítio de ligação. Outro fato novo e interessante em nosso grupo foi o início de uma colaboração com o grupo experimental do Prof. Dr. Rui M. B. Maciel (UNIFESP), que tem identificado novos mutantes em pacientes que possuem a síndrome RTH.

Dando continuidade aos trabalhos envolvendo mutações, foi realizado nesta Tese de Doutorado o estudo dois mutantes: M369R, um mutação de alta afinidade, e P452L, uma nova mutação identificada em um paciente com RTH. Os resultados obtidos são apresentados a seguir.

7.3 M369R: mutação com alta afinidade pelos hormônios

As mutações que provocam alta afinidade por hormônios estão entre as mais intrigantes, em especial as localizadas longe do sítio de ligação. A mutação artificial M423R no TR β , por exemplo, possui afinidade de 174% em relação ao TR β nativo [41], mesmo estando localizada longe do primeiro sítio de ligação. O resíduo 423 localiza-se na α -hélice H11, na superfície do LBD. Como está exposto ao solvente, não é provável que esta mutação leve a grandes alterações estruturais. A Figura 7.1 mostra sua localização, enquanto a Tabela 7.1 resume as alterações funcionais provocadas por esta mutação.

Durante o Mestrado do autor, foram realizadas simulações de MD do M423R e também de outras mutações de alta afinidade. Os estudos realizados não indicaram como estas mutações poderiam levar ao aumento da afinidade. Alguns deles, mostraram inclusive perda de interações com o ligante no sítio de ligação clássico [185].

Considerando agora o conhecimento da existência do segundo sítio de ligação dos TRs, uma hipótese para este tipo de comportamento é a possibilidade de explicar alta afinidade por hormônios através das alterações que algumas mutações possam provocar nas interações do hormônio, não no sítio de ligação consensual, mas no novo segundo sítio.

Para testar esta hipótese, foram feitas simulações de MD para a mutação M369R no LBD do TR α ligado a T3 em ambos os sítios (M369R-T3-T3), sendo estas comparadas às simulações do LBD do TR α nativo também ligado ao T3 (TR α -T3-T3) e ao T4 (TR α -T3-T4), já descritas no Capítulo 5. O mesmo protocolo utilizado nas simulações de MD da estrutura nativa foi utilizado para esta mutação. Este protocolo é descrito na seção 5.1.1, enquanto a construção da mutação é explicada na seção 4.3.

O resíduo M369 do TR α corresponde ao M423 do TR β . A escolha da realização das simulações de MD para o TR α se deve ao fato de que já havia sido realizado um extenso estudo do segundo sítio de ligação com este subtipo no Capítulo 5. Dado que a região do segundo sítio é conservada entre os subtipos (com 100% de identidade), acreditamos que os resultados obtidos para o subtipo α são equivalentes para o subtipo β .

Mobilidade e os modos de ligação do ligante no segundo sítio do M369R

A Figura 7.2A mostra os resultados obtidos para a mobilidade do ligante no receptor nativo e M369R. Verifica-se claramente que o T3 ligado ao segundo sítio do TR α -LBD mutante possui menor mobilidade, tal como mostrado pela menor volume varrido pelo ligante (superfície vermelha) na mutação em relação ao que se observa na estrutura nativa (superfície azul). De maneira equivalente, é mostrado este resultado para a frequência do RMSD dos ligantes na Figura 7.2B.

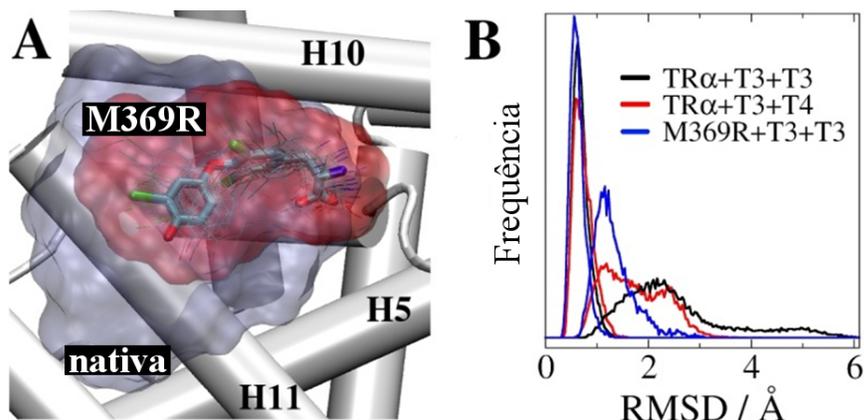


Figura 7.2. A mobilidade de ligante no segundo sítio da mutação M369R: (A) Estruturas sobrepostas e o volume máximo ocupado pelo T3 no segundo sítio de ligação no mutante M369R (superfície vermelha) e no TR α nativo (azul). (B) Distribuição do RMSD dos hormônios naturais no primeiro e no segundo sítio de ligação.

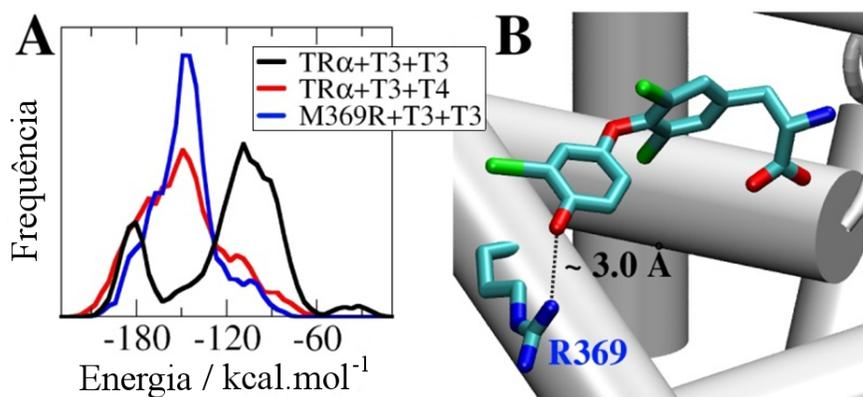


Figura 7.3. As interações do ligante no segundo sítio da mutação M369R: (A) A frequência da energia de interação LBD-ligante no segundo sítio de ligação do TR α nativo com T3 (preto) e do mutante com T3 (azul). Também é mostrado o TR α nativo com T4 (vermelho). (B) A interação do resíduo mutado com o grupo hidroxila de T3 restringe a mobilidade e torna mais negativo os valores da energia de interação T3-LBD.

A menor mobilidade do T3 no LBD mutante é reflexo de sua maior interação com o segundo sítio, tal como mostrado pela frequência das energias de interação ligante-proteína na Figura 7.3A. Observa-se claramente que o pico referente ao M369R está deslocado para energias de interação mais negativas. Além disso,

quando comparado ao TR α nativo ligado a T3, não se observa a existência do modo de ligação fraco¹⁹.

Tal comportamento (menor mobilidade, maior interação do ligante, não ocorrência do modo fraco de ligação) é muito semelhante aos resultados observados para o LBD do TR α ligado ao T4 no segundo sítio, mostrados na seção 5.1.2. Considerando estes resultados e os valores obtidos para ΔG de dissociação T3 e T4 no TR α nativo na seção 5.2, pode-se supor que possivelmente o mutante M369R deve possuir maior afinidade pelo T3 que o TR α nativo, o que explicaria assim sua maior afinidade global.

Quais seriam as modificações estruturais provocadas pelo M369R que levariam a estas alterações na mobilidade e na energia de interação? A Figura 7.3B elucida esta questão mostrando o modo de ligação do T3 no segundo sítio de ligação da mutação. Observa-se uma interação polar adicional que o próprio resíduo mutado faz com a hidroxila do anel fenólico do hormônio, a parte mais móvel dos ligantes no segundo sítio do TR α nativo. Desta forma, o modo de ligação do T3 no LBD mutante deixa evidente como este reduz a mobilidade e aumenta a interação ligante-proteína.

O estudo desta mutação ilustra como um novo resultado, no caso a existência de um novo sítio, possibilita reinterpretar dados experimentais e rever perguntas que ficaram sem respostas no passado. Vale destacar que M369R é o típico caso de mutação localizada longe do primeiro sítio de ligação e que não havia explicação sobre sua alta afinidade.

7.4 P452L: mutação com baixa afinidade pelos hormônios e co-ativadores

Recentemente o grupo o Prof. Dr. Rui M. B. Maciel realizou um estudo de caso com um paciente que apresentava sintomas típicos da Síndrome RTH. Foi identificada uma mutação nunca antes descrita no TR β : a mutação P452L. O grupo do Prof. Francisco A. R. Neves realizou ensaios funcionais com esta nova mutação. Foi verificado que, tal como a maioria das mutações que causam RTH, o mutante P452L possui baixa afinidade pelo hormônio tireoideano T3. Sua afinidade

¹⁹Os modos de ligação do T3 no segundo sítio foram descritos na seção 5.1.2, Figura 5.6.

é de cerca de 12% em relação ao TR β nativo. Surpreendentemente, mesmo em condições saturadas de T3, o mutante P452L não atingiu o máximo de atividade transcricional do TR β nativo. Este é um indício de que a perda funcional deste TR β mutado não está só relacionado à baixa afinidade por hormônios, mas deve envolver mudanças conformacionais no LBD que alterem as interações com co-reguladores. Novos ensaios realmente confirmaram que esta mutação também resulta em baixa interação com CoAs.

Dado que o resíduo 452 localiza-se próximo a H12, principal hélice responsável pela interação com CoAs, uma hipótese era de que a mutação alterasse as interações desta região e, simultaneamente, desestabilizasse o sítio de ligação. Esta hipótese foi baseada nos estudos já realizados por nosso grupo das mutações no resíduo I280 [56], uma vez que ele apresenta resultados semelhantes em ensaios funcionais e também é próximo espacialmente da H12 (é um dos resíduos hidrofóbicos da H3, onde a H12 se ancora).

Apesar destas características, parecia contra intuitivo esperar uma grande mudança de comportamento funcional dado que os resíduos prolina (P) e leucina (L) possuem volumes e hidrofobicidades semelhantes. No caso das mutações no resíduo I280, as alterações nas propriedades físico-químicas eram mais pronunciadas, incluindo mudanças de tamanho e carga da cadeia lateral. Dadas às características da cadeia lateral da prolina, outra hipótese plausível era que esta mutação poderia alterar a conformação local dos diedros do *backbone*,

Para testar as hipóteses levantadas, foram feitas três simulações de MD independentes de 10 ns para os LBDs do TR β nativo (código PDB: 2H79; resolução de 1,87 Å) e da mutação P452L, ambos associados a único ligante T3, no primeiro sítio de ligação. Foram utilizados os parâmetros do T3 obtidos no estudo de segundo sítio de ligação (seção 5.1.1). Considerando a posição da mutação e os resultados experimentais obtidos, descartou-se a possibilidade do segundo sítio ser importante na interpretação dos resultados neste caso. Foram utilizadas as condições de simulação descritas na seção 4.3, enquanto a construção do LBD mutante é descrito na seção 4.3.

Alterações conformacionais na H12 e no sítio de ligação da mutação P452L

Os principais resultados obtidos da modelagem molecular da mutação P452L através de simulações de MD são apresentados nas Figuras 7.4 e 7.5. Os primeiros aspectos estudados foram quais alterações conformacionais que esta mutação induziu na H12. Verificou-se que realmente há pequena variação do ângulo de diedro Ψ entre os resíduos 452 e 453 no mutante P452L. Isto é evidenciado pelo pequeno deslocamento de 5^0 da curva azul (P452L) em relação a curva vermelha (TR β nativo) no gráfico à esquerda da Figura 7.4A.

Observou-se ainda que esta variação está associada à maior interação entre o resíduo mutado 452 e hélice H3, como comprovado pelas energias de interação média entre eles: $-5,1 \pm 2,9$ e $-25,1 \pm 3,0$ kcal.mol $^{-1}$ para o TR β nativo e para o mutante P452L, respectivamente. Ambas as alterações promovidas pela mutação (variação do diedro Ψ e maior interação entre o resíduo 452 e H3) contribuem para H12 se aproximar mais do LBD mutante.

Devido a esta pequena mudança de posição, os resíduos K288 (H3) e E457 (H12) tornaram-se ligeiramente mais próximos no LBD mutante em comparação a distribuição de distâncias do LBD nativo, tal como mostra o gráfico à direita da Figura 7.4A. Vale lembrar, que estes resíduos carregados são conhecidos na literatura de NRs como braçadeira de carga e a distância entre eles é um parâmetro importante para o recrutamento de CoAs, pois indica o tamanho da cavidade de interação deles no LBD. Se considerarmos a distância ideal para a interação com CoAs (distância cristalográfica, mostrada na figura pela linha tracejada), observa-se que na maior parte do tempo das simulações de MD, o LBD mutante encontra-se em distâncias menores.

Isto mostra que, quando ligado a T3, a mutação P452L possui uma cavidade de interação com CoAs estreita. Isto pode explicar o porquê deste LBD mutante, mesmo em concentrações saturadas de T3, ter baixa afinidade por CoAs e, portanto, não alcançar a máxima atividade do TR β . Duas estruturas representativas das conformações da H12 no TR β nativo e no P452L são mostradas nas Figuras 7.4B e 7.4C. É bem evidente a torção que H12 sofre com a mutação, bem como sua proximidade com o LBD. Também é destacada nestas Figuras a menor distância média entre os resíduos da braçadeira de carga no LBD do TR β mutante em relação

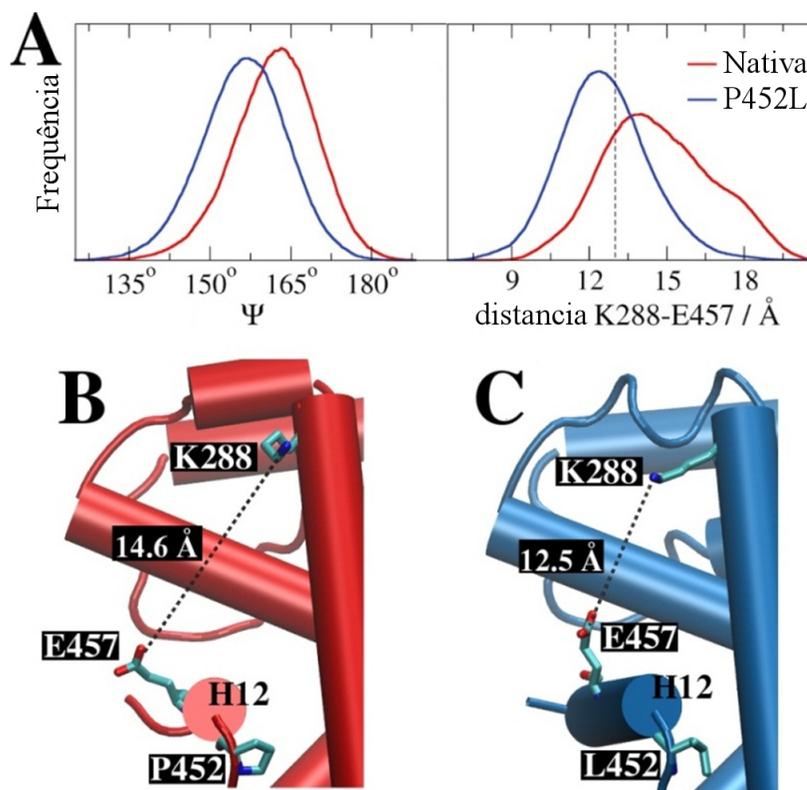


Figura 7.4. Alterações conformacionais da H12 no mutante P452L: (A) Gráfico a esquerda mostra a frequência do ângulo diedral Ψ do *backbone* entre os resíduo 452 e 453. Já o gráfico a direita indica a distribuição de distâncias entre os resíduos K288 e E457 da braçadeira de carga; (B) e (C) mostram estruturas representativas das simulações do TR β -LBD nativo e do mutante P452L, respectivamente. É evidente a torção da H12 e conseqüente menor distância entre os resíduos da braçadeira de carga.

ao nativo.

Por fim, resta analisar quais as outras conseqüências destas pequenas mudanças de posição da H12 nas interações do LBD com o T3. O resultado desta análise é mostrado na Figura 7.5. A proximidade da H12 em relação ao corpo do LBD acaba por empurrar o ligante para dentro do sítio de ligação. Isto altera a interação do T3 com o grampo- β , do outro lado da cavidade. As novas interações formadas com o grampo- β não são tão favoráveis como no TR β nativo, especialmente a interação entre o grupo amina do T3 e o grupo carbonila do *backbone* do resíduo I330. Esta alteração na interação com I330 ocorre em cerca de 30% do tempo das

simulações de MD do mutante P452L, de modo que as energias de interação média LBD-T3 passam a ser ligeiramente desfavoráveis em relação ao TR β nativo: $-153,4 \pm 9,5$ e $-146,2 \pm 6,9$ kcal.mol $^{-1}$ para o TR β nativo e para o mutante P452L, respectivamente.

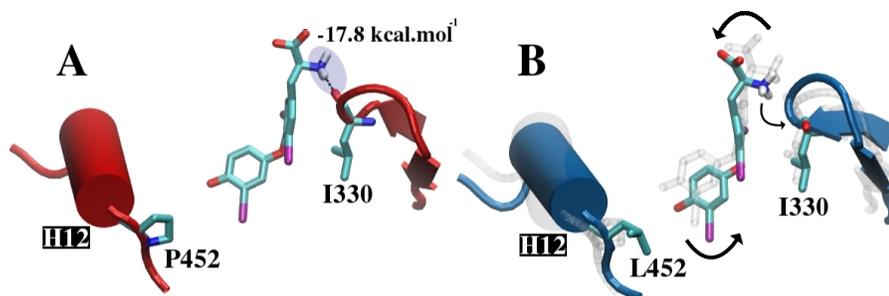


Figura 7.5. Mutação P452L provoca perda de interações do T3 com resíduo I330:(A) e (B) mostram duas estruturas representativas das simulações do TR β nativo e do mutante P452L, respectivamente. Alterações na posição da H12 causadas pela mutação empurram o ligante para dentro do sítio de ligação o que provoca perda de interação com o resíduo I330.

Assim, as alterações no sítio de ligação permitem sugerir qual a razão molecular da baixa afinidade do mutante P452L. É surpreendente constatar novamente que a baixa afinidade de uma nova mutação também leva à perda de interações hidrofílicas com o grampo- β , tal como observados nos estudos anteriormente realizados no Mestrado [185]. No caso das mutações I280K e I280R, por exemplo, também ocorre perda de interações hidrofílicas nativas, porém de modo mais pronunciado, incluindo a entrada de moléculas de água na cavidade hidrofóbica [56]. Isto é coerente com o fato destas mutações terem afinidade menor que a apresentada pelo P452L. A confirmação de mais casos de similaridade nos mecanismos moleculares que causam baixa afinidade em TRs mutantes pode trazer boas perspectivas no desenvolvimento racional de fármacos para o tratamento de RTH.

Capítulo 8

A conformação alternativa do ER β

Os receptores de estrogênios são os NRs mais estudados pela comunidade científica, como pode ser observado tanto pelo grande número de artigos publicados como pelo número de fármacos que os têm como alvo²⁰. Entretanto, ainda existem vários aspectos de seu mecanismo de ação que não são bem compreendidos, em especial para o subtipo β do ER.

Sabe-se atualmente que na presença de ligantes agonistas, tal como o próprio estradiol (ligante natural mais ativo), o ER β reprime parcialmente a transcrição de genes ativados pelo ER α [98]. A análise das estruturas cristalográficas do PDB de ambos os subtipos ligados ao estradiol mostra ambas na mesma conformação, com a H12 fechada em posição agonista, favorável à associação dos CoAs [6, 65, 96, 97]

Deste modo, considerando apenas as estruturas disponíveis é impossível interpretar como ER β promove a repressão. Neste contexto, o grupo do Prof. Dr. Igor Polikarpov tentou obter uma nova estrutura do ER β associado ao estradiol. Surpreendentemente, a estrutura obtida apresentou uma conformação alternativa da H12, em relação à conformação clássica observada em NRs associados a agonistas.

A Figura 8.1 faz uma comparação entre a nova estrutura alternativa obtida e a estrutura clássica do ER β (código PDB: 3OLS). Observa-se que a H12 da conformação alternativa está fechada, mas rotacionado em cerca de 180^o em relação

²⁰Uma pesquisa na *web of science* indica quase 14 mil artigos contendo no título “*Estrogen Receptor*”. O banco de dados *DrugBank* indica cerca de 60 compostos (aprovados ou em fase clínica) que atuam em ERs. Pesquisas equivalentes com outros NRs não indicam números tão altos.

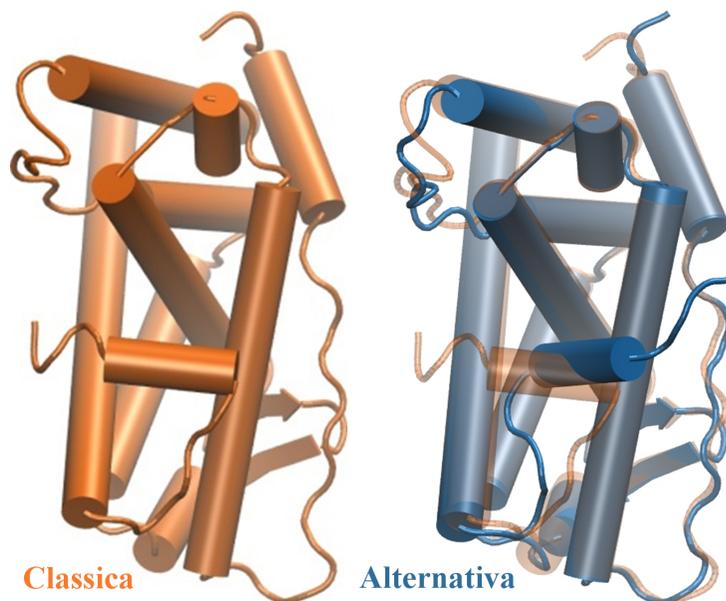


Figura 8.1. As conformações clássica e alternativa do ER β

à clássica, existindo certa semelhança com as estruturas associadas com ligantes antagonistas ou mesmo em relação à estrutura do *apo*-TR, descrita no Capítulo 6. Assim, se existe esta conformação para o ER β ligado ao estradiol, ela possivelmente deve inibir associação de CoAs.

A nova estrutura do ER β tem, assim, potencial para explicar como estes receptores podem reprimir a transcrição. Apesar disso, há ainda um aspecto a considerar: a possibilidade de esta estrutura ser um artefato cristalográfico. Aparentemente, o empacotamento cristalino sugere que a nova conformação da H12 pode estar sendo favorecida pelo ER β simétrico da célula unitária. Isto nos leva aos questionamentos: A nova estrutura do ER β obtida seria realmente estável em solução? Se sim, qual seria o ΔG entre esta conformação alternativa e a clássica?

Para ajudar a responder estas questões, foi proposta a realização de simulações de MD do LBD do ER β em ambas as conformações, em especial para tentar obter o ΔG entre elas. Este foi um trabalho feito em conjunto com a doutoranda Denise Cavalcante de Melo (também orientada pelo Prof. Dr. Munir S. Skaf), que realizou as simulações de MD tradicionais, enquanto o autor desta Tese se concentrou nos cálculos do ΔG .

8.1 Estado de protonação da H498 e simulações de MD

Inicialmente foi planejada a realização de um conjunto simulações de MD com dois sistemas, conformação alternativa (obtida pelo grupo do Prof. Dr. Igor Polikarpov; resolução de 2,80 Å) e conformação clássica (código PDB: 3OLS; resolução de 2,20 Å). Entretanto, durante a construção dos sistemas surgiu uma questão pertinente: a protonação da histidina 498 (H498). Ao realizar a previsão do pKa dos resíduos ionizáveis do sistema utilizando o servidor $H++$ [150], observou-se que para a conformação alternativa, seu pKa previsto era 7,8 enquanto que para a conformação clássica o pKa era 4,7. Isto significa que em pH fisiológico (7,4), é esperado que a forma majoritária da H498 seja diferente nas conformações: protonada na conformação alternativa e desprotonada na clássica. O fato da H498 estar localizada bem próxima da H12 torna a consideração desta diferença de pKa importante para o estudo do ΔG entre as conformações.

Para tentar confirmar as previsões destes valores de pKa , em especial para a conformação alternativa do ER β , foi empregado outro servidor, chamado *PROPKA* [151], também muito utilizado na preparação de configurações iniciais para simulações de MD. Neste caso, o resultado do pKa da conformação alternativa foi 6,9, um pouco mais baixo que o previsto pelo $H++$, enquanto que para a conformação clássica o resultado foi o mesmo. Logo, no caso deste servidor, o estado de protonação majoritário da H498 na conformação alternativa em pH 7,4 seria o desprotonado, tal como na conformação clássica. Dada à discrepância dos resultados de pKa da H498 na conformação alternativa, a estratégia deste estudo foi reformulada.

Passaram a ser considerados agora 4 sistemas: conformação alternativa com H498 protonada, conformação alternativa com H498 desprotonada, conformação clássica com H498 protonada e conformação clássica com H498 desprotonada. Para cada uma delas, foram realizadas três simulações de MD independentes de 20 ns cada. Em todos os sistemas o LBD do ER β encontra-se associado ao hormônio estradiol, já parametrizado por nosso grupo [38]. Os objetivos destas simulações foram testar a estabilidade das conformações em ambos estados de protonação da H498, além de estudar a estrutura e dinâmica do LBD do ER β e gerar configurações relaxadas para o cálculo do ΔG entre elas.

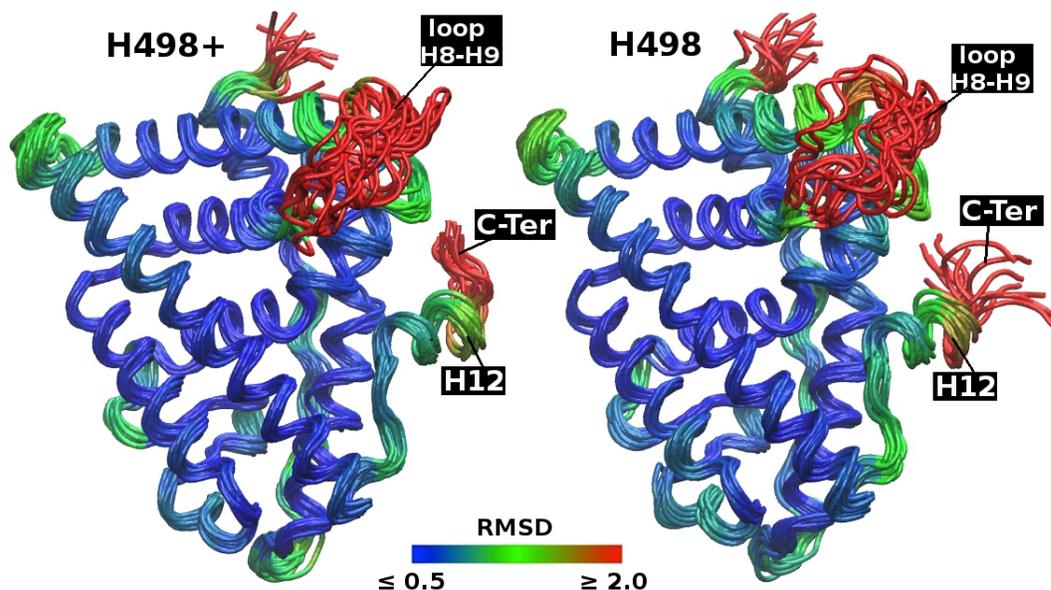


Figura 8.2. A mobilidade de ambos estados de protonação da H498 na conformação alternativa: são mostradas algumas configurações representativas das trajetórias e também uma escala de cores onde: azul = baixa mobilidade (RMSD $\leq 0,5$ Å); verde = mobilidade intermediária (RMSD = $1,25$ Å); vermelho = alta mobilidade (RMSD $\geq 2,0$ Å).

Um estudo mais aprofundado dos resultados destas simulações será realizado pela doutoranda Denise Cavalcante de Melo, sendo apresentado aqui um resumo de alguns dos resultados observados. Nas Figuras 8.2A e 8.2B são mostradas as médias do RMSD ao longo da trajetória para cada átomo de carbono- α de ambos estados de protonação da H498 na conformação alternativa. Este RMSD foi alinhado e calculado em relação à estrutura média do LBD obtida das simulações em cada estado de protonação. O resultado é colocado em uma escala de cores sobre algumas estruturas sobrepostas representativas das trajetórias. Este tipo de análise dá uma ideia da mobilidade de cada resíduo.

A comparação destas figuras sugere que, de maneira geral, o LBD em ambas as conformações é bem estável, como indicado pela cor azul do sanduíche de α -hélices. As regiões mais móveis (cor vermelha) de ambos os estados de protonação são: *loop* entre H8 e H9, H12 e *loop* C-terminal. As estruturas sobrepostas indicam que no estado desprotonado da H498, a H12 e o *loop* C-terminal varrem um espaço maior, não ficando necessariamente ancorados ao LBD, como no estado protonado.

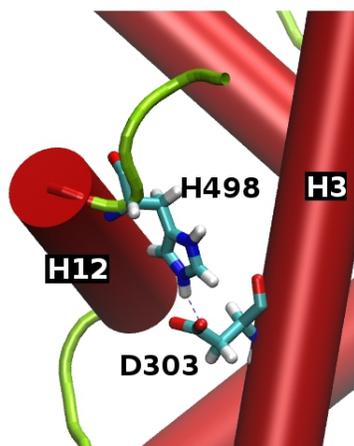


Figura 8.3. A interação entre $H498^+$ e D303 na conformação alternativa.

A Figura 8.3 mostra o motivo desta diferença de comportamento, onde se verifica a existência da ponte salina entre H498 e o resíduo D303, localizado na α -hélice H3. Quando H498 é protonada na conformação alternativa, esta interação ocorre em cerca de 40% do tempo das trajetórias, com energia de interação entre $H498^+$ e D303 em torno de $-100,0 \pm 9,0 \text{ kcal.mol}^{-1}$. Já no estado desprotonado, ela é pouco frequente, ocorrendo em menos de 5%, com energia de interação D303-H498 próxima de $-12,0 \pm 5,0 \text{ kcal.mol}^{-1}$. Logo, conclui-se que além da interação com H498 protonada ser mais favorável, ela é mais frequente que na H498 desprotonada ambas na conformação alternativa. O contato entre H498 e D303 também existe na estrutura cristalográfica, o que justifica o pK_a de H498 previsto como mais alto nesta conformação.

As mesmas análises foram realizadas para ambos os estados de protonação de H498 na conformação clássica, sendo os resultados mostrados nas Figuras 8.4A e 8.4B. Da mesma forma que na conformação alternativa, ambos os estados de protonação aparentam ser bem estáveis. As regiões de maior mobilidade são as mesmas da conformação alternativa. Porém, nesta conformação não é tão evidente qual estado de protonação leva a uma maior estabilização da H12. Neste caso, em geral, a H498 está mais voltada ao solvente porém, aproximando-se com alguma frequência de resíduos polares da região, tal como R501.

Uma última análise destas simulações de MD foi o uso da estrutura média obtida em cada conformação e estado de protonação para tentar recalculer os pK_a s de

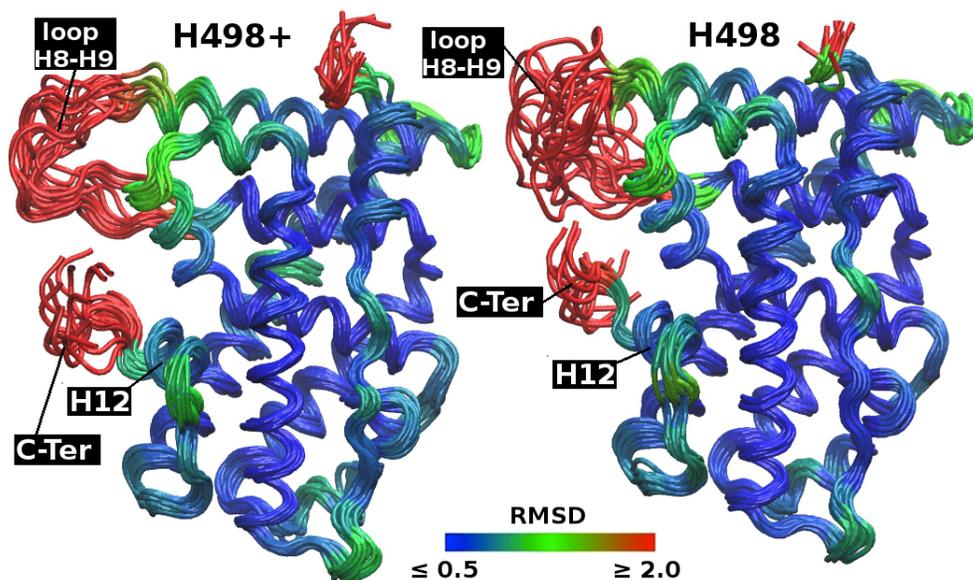


Figura 8.4. Mobilidade de ambos os estados de protonação da H498 na conformação clássica: são mostradas algumas configurações representativas das trajetórias e também uma escala de cores onde: azul = baixa mobilidade (RMSD $\leq 0,5$ Å); verde = mobilidade intermediária (RMSD = 1,25 Å); vermelho = alta mobilidade (RMSD $\geq 2,0$ Å).

H498 através dos servidores *H++* e *PROPKA*. Todos os *pKas* calculados para H498 são mostrados na Tabela 8.1. Observa-se que nas estruturas médias obtidas das simulações de MD, os valores de *pKa* obtidos pelo *PROPKA* são bem próximos, sendo as diferenças de *pKa* entre as conformações reduzidas em relação aos *pKas* calculados para as estruturas cristalográficas. Já os valores de *pKa* obtidos pelo servidor *H++* foram bem mais díspares. Foi obtido inclusive um alto valor de *pKa* para a estrutura média de MD da conformação clássica com H498 protonada.

Considerando apenas os resultados do servidor *PROPKA*, onde se obteve resultados menos erráticos, é possível sugerir que em *pH* fisiológico ambas as conformações estarão provavelmente no estado desprotonado. Entretanto, deve-se ter cautela nesta previsão, dado que ambos servidores utilizam métodos bem aproximados para estas estimativas.

Retomando as conclusões desta etapa, pode-se dizer que as simulações de MD não indicaram instabilidade evidente em nenhuma das conformações e estados de protonação do ER β . Este é um resultado importante, especialmente para a con-

Tabela 8.1. Estimativas do pK_a do resíduo H498 a partir das estruturas cristalográficas e simulações de MD.

Conformação	Fonte da Estrutura	pK_a <i>PROPKA</i>	pK_a <i>H++</i>
Alternativa	Cristalográfica	6,9	7,8
Alternativa	Média da MD H498	6,2	6,6
Alternativa	Média da MD H498 ⁺	6,3	6,9
Clássica	Cristalográfica	4,8	4,7
Clássica	Média da MD H498	5,6	4,7
Clássica	Média da MD H498 ⁺	5,9	9,2

formação alternativa, sendo ele pré-requisito para a próxima etapa do trabalho. Para confirmar se conformação alternativa do LBD do ER β é realmente acessível em solução aquosa, é necessário realizar o cálculo do ΔG entre as conformações.

8.2 Condições das simulações para o cálculo do ΔG

O cálculo do ΔG entre duas conformações de uma proteína é muito mais complexo de ser realizado do que estimativas de afinidade ligante-proteína. Um dos problemas é o maior número de graus de liberdade do sistema, o que exige escolha criteriosa do conjunto de átomos que irá se mover na coordenada de reação e uma amostragem realmente grande de todos os estados envolvidos na transformação estudada. Além destas dificuldades, a própria escolha da coordenada de reação é difícil, uma vez que não se conhece os intermediários deste processo.

Dado o sucesso nas estimativas de ΔG de dissociação descritas na seção 5.2 desta Tese e a familiaridade do autor com a técnica, foi escolhido o método ABF para o cálculo do ΔG entre as conformações. Outros aspectos importantes levados em consideração para esta escolha estão relacionados à implementação específica deste método no *NAMD*. Entre as vantagens deste programa, destaca-se: possibilitar utilizar o RMSD em relação a uma estrutura de referência como coordenada de reação e a capacidade de empregar múltiplas coordenadas de reação.

Como base nestas vantagens, foram escolhidas como coordenadas de reação os RMSDs em relação às posições dos átomos de carbono- α entre os resíduos 469 e 501 nas estruturas cristalográficas das conformações clássica (RMSD_C) e alternativa (RMSD_A). Esta sequência de resíduos corresponde ao C-terminal da H11, *loop*

entre H11 e H12, a própria H12 e o *loop* C-terminal do LBD. Parte destes resíduos corresponde aos que mais alteram suas posições entre as conformações alternativa e clássica. A faixa de cada coordenada de RMSD percorrida por estes átomos foi de $1 \leq \xi \leq 10$ Å. Foram utilizados potenciais de fronteira com força constante de $10 \text{ kcal.mol}^{-1} \cdot \text{Å}^{-2}$ nas extremidades das coordenadas de reação. Por fim, a amostragem foi realizada em janelas $\Delta\xi^2$ de $0,01 \text{ Å}^2$ de área ($0,1 \times 0,1 \text{ Å}$). Estes parâmetros foram escolhidos com base em outros trabalhos utilizando o método ABF [141–143].

Para cada estado de protonação, foram realizadas inicialmente seis simulações ABF independentes, com 100 ns cada, partindo de configurações iniciais relaxadas, obtidas das simulações de MD tradicionais, já comentadas na seção anterior deste texto. Três destas configurações partiram da conformação alternativa e outras três da conformação clássica. Além disso, duas simulações extras, também de 100 ns , foram realizadas partindo de configurações onde a H12 estava em posição aproximadamente intermediária em relação as conformações de referência. Estas duas últimas configurações foram obtidas das outras seis simulações ABF. Em todas estas oito simulações, foi usado um valor de N_{amost} igual a 4000. A média dos resultados obtidos foi feita ponderando a amostragem de \vec{F}_{sist} realizada em cada janela $\Delta\xi^2$ de cada uma das simulações.

8.3 ΔG entre as conformações do ER β

Os resultados obtidos do ΔG conformacional para o estado desprotonado do resíduo H498 do ER β são apresentados na forma de um mapa de energia livre na Figura 8.5. Verifica-se que existe um mínimo global bem evidente, localizado em uma região larga, de $RMSD_C$ em torno de $8\text{-}9 \text{ Å}$ e $RMSD_A$ de $3\text{-}5 \text{ Å}$. Tal região corresponde a um conjunto de estruturas semelhantes à conformação alternativa. Observa-se ainda que, neste estado de protonação, a conformação clássica não se mostrou estável, existindo apenas uma pequena região do mapa, em torno do ponto (2,9), com energia livre de 6 kcal.mol^{-1} acima do mínimo global. A barreira entre ambas as conformações é de cerca de 12 kcal.mol^{-1} e ocorre na região intermediária entre as conformações, próxima do ponto (6,6) do mapa.

Dada às características deste mapa de energia livre obtido, conclui-se que, no

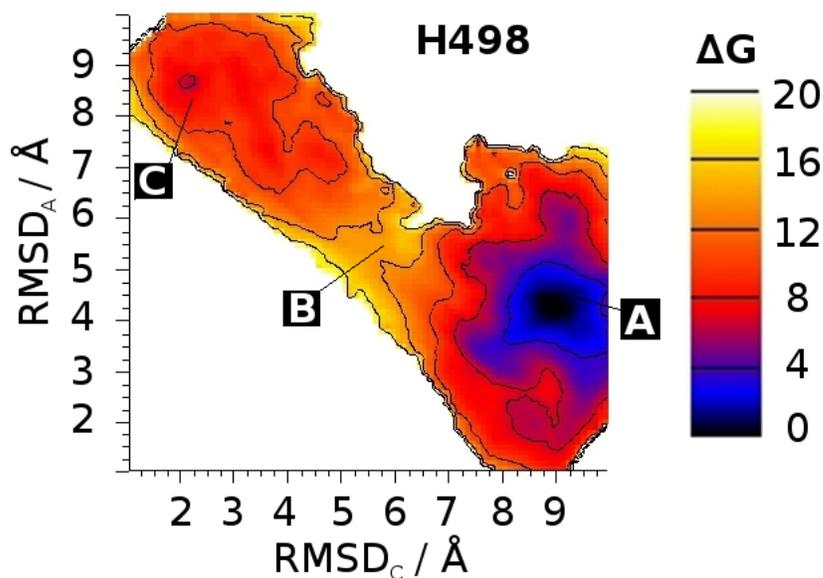


Figura 8.5. Mapa do perfil de energia livre entre ambas as conformações no estado desprotonado de H498. Foram usadas como coordenadas de reação o RMSD em relação à conformação clássica ($RMSD_C$) e o RMSD em relação à conformação alternativa ($RMSD_A$). Os valores de ΔG são dados pela escala de cores em kcal.mol^{-1} . São identificadas no mapa as regiões onde se encontram as conformações clássica (C), alternativa (A) e a maior barreira de ΔG entre elas (B)

estado desprotonado da H498, ER β estará predominantemente na conformação alternativa, sendo ela favorecida tanto termodinamicamente como cineticamente em relação a conformação clássica. Este é um resultado inusitado, dado que explicaria plenamente a função biológica deste receptor, pois a conformação alternativa não deve permitir a associação com CoAs e, conseqüentemente, reprime a transcrição de genes. Vale lembrar que maioria das estimativas de pK_a de H498 indicam que este resíduo está neste estado de protonação em pH fisiológico.

O mapa de energia livre conformacional do ER β com o resíduo H498 protonado é mostrado na Figura 8.6. Surpreendentemente, neste estado de protonação, o mínimo global é a conformação clássica e não a alternativa. Ele localiza-se numa região larga do mapa, com coordenadas de $RMSD_C$ de 3-4 Å e $RMSD_A$ de 8-9 Å. Além de possuir um mínimo global distinto, o mapa de energia livre do estado protonado apresenta várias características peculiares. Primeiramente, o ΔG entre as conformações é bem baixo, da ordem de 4,0 kcal.mol^{-1} . Desta forma,

na temperatura ambiente, ambas as conformações devem coexistir neste estado de protonação. Além disso, o estado protonado possui uma barreira de ΔG entre as conformações bem baixa, da ordem de 6 kcal.mol⁻¹. Dadas estas características, a H12 do ER β com H498 protonada pode ser considerada bem móvel. É como se a protonação tivesse-se tornado a H12 mais “solúvel”, ficando mais livre para se movimentar pelo espaço conformacional.

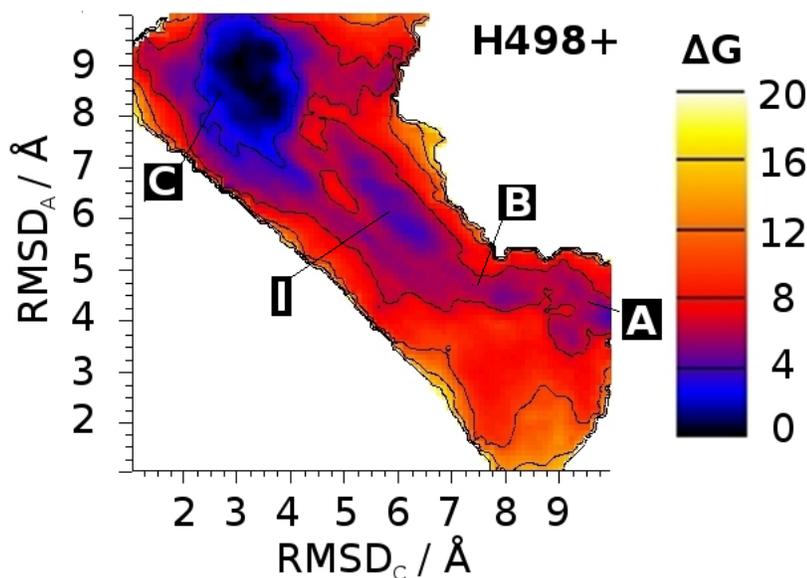


Figura 8.6. Mapa do perfil de energia livre entre ambas as conformações no estado protonado de H498. Foram usadas como coordenadas de reação o RMSD em relação à conformação clássica ($RMSD_C$) e o RMSD em relação à conformação alternativa ($RMSD_A$). Os valores de ΔG são dados pela escala de cores em kcal.mol⁻¹. São identificadas no mapa as regiões onde se encontram as conformações clássica (C), alternativa (A), a maior barreira de ΔG entre elas (B) e também uma conformação intermediária (I), que é um mínimo local que aparece neste estado de protonação.

O mapa de energia livre do LBD com H498 protonada mostra ainda um terceiro mínimo local, com cerca de 2 kcal.mol⁻¹ em relação à conformação clássica do ER β , logo mais favorável que a conformação alternativa. Ele localiza-se aproximadamente entre as conformações alternativa e clássica, próximo das coordenadas $RMSD_C = 6 \text{ \AA}$ e $RMSD_A = 6 \text{ \AA}$. A observação das estruturas correspondentes a este mínimo revela LBDs do ER β com a H12 em posição antagonista, bem semelhante às observadas para o *apo*-TR descritas no Capítulo 6.

A Figura 8.7 mostra como exemplo duas conformações deste mínimo, chamadas de intermediários I e II. Dada as suas características, é possível considerar que também não devem associar-se à CoAs. Desta forma, mesmo no estado protonado, o ER β deve promover certo grau repressão da transcrição, dado que tanto a conformação alternativa como conformações intermediárias são acessíveis à temperatura ambiente.

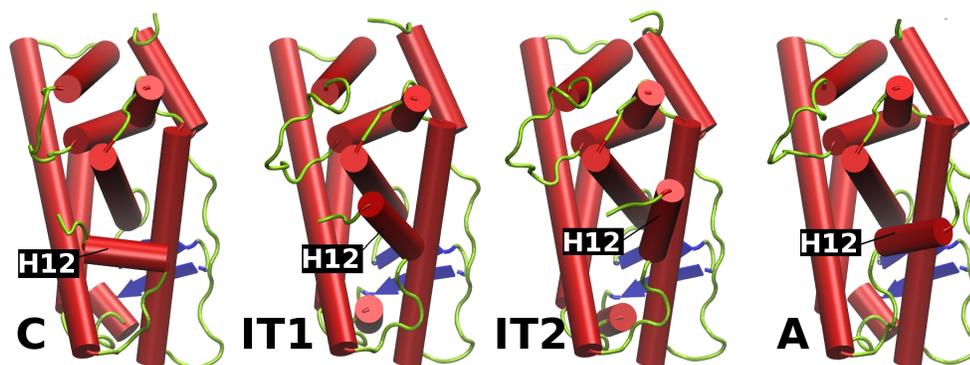


Figura 8.7. Comparação entre as conformações alternativa, clássica e intermediárias.

Tabela 8.2. ΔG entre as conformações nos diferentes estados de protonação

Conformação	H498 (kcal.mol ⁻¹)	H498 ⁺ (kcal.mol ⁻¹)
Alternativa	0,0	4,0
Clássica	6,0	0,0
Barreira	12,0	6,0
Intermediário	–	2,0

A Tabela 8.2 contém um resumo dos resultados de ΔG obtidos. Por fim, vale comentar que apesar de terem sido realizadas quase 1 μs de amostragem para cada estado de protonação, é possível observar que os mapas obtidos possuem regiões não visitadas, em especial as regiões com altos valores de $RMSD_C$ e $RMSD_A$. Na região de valores baixos das coordenadas era esperado não obter amostragem alguma, dado que esta região é o limite geométrico das coordenadas de reação escolhidas. Entretanto, as regiões de altos valores, como RMSDs de 8 a 10 Å podem ser acessíveis. Ainda que as simulações amostrassem algo destas regiões, os resultados teriam pouco significado físico, dado que corresponderiam a uma mistura

de possíveis configurações distintas das conformações alternativa e clássica. Para conhecer ΔG de alguma conformação muito distinta das estruturas de referência, como a controversa posição aberta da H12 (do mecanismo da ratoeira, descrita na seção 2.3.1), seria necessário criar uma nova coordenada de reação.

8.4 Conformações do ER β e o pH

A constatação de que a conformação alternativa se trata de um mínimo global no mapa de energia livre do estado desprotonado do ER β permite fortalecer a hipótese de que esta nova estrutura cristalográfica obtida não só é estável como pode ser responsável pelo mecanismo de ação do ER β . Uma proposta para testar as hipóteses levantadas na seção anterior deste Capítulo seria confirmar experimentalmente o papel da H498 na modulação da atividade do ER β . Isto poderia ser feito por ensaios da atividade transcricional em diferentes valores pH e também utilizando diferentes mutações na posição 498.

Se estas hipóteses se mostrarem corretas, talvez outros aspectos pouco explicados dos ERs também estejam relacionados à capacidade de alterar sua conformação preferencial e, com isto, alterar sua atividade, com o pH do meio. Um exemplo neste contexto são os SERMS, ligantes dos ERs que apresentam comportamento agonista ou antagonista dependendo do tecido em que atuam. Um exemplo importante é o raloxifeno, que atua como agonista em ossos e como antagonista em tecidos mamários. Tais características permitem que este medicamento seja utilizado tanto para tratar osteoporose de mulheres na pós-menopausa, como para reduzir o risco de câncer de mama. Sabe-se que o raloxifeno associa-se tanto ao ER α como ao ER β [96, 97].

A ação diferenciada de SERMs, tal como o raloxifeno, é, em geral, relacionada à concentração relativa de CoAs e CoRs nos diferentes tecidos. Uma hipótese que gostaríamos de apresentar é a possibilidade do ER β explicar parcialmente a mudança do comportamento agonista para o antagonista nos diferentes tecidos. Os resultados apresentados neste capítulo sugerem que o ER β pode alterar sua conformação preferencial dependendo do pH do meio. No meio ácido, ele tenderia a agir como agonista (conformação clássica). No meio neutro a básico, como antagonista.

Apesar do pH fisiológico de 7,4 ter sido utilizado como referência nas discussões até aqui, sabe-se que este valor pode variar conforme o tecido e o metabolismo. As células tumorais, por exemplo, podem alterar o pH do meio. Nos arredores de um tumor, o meio tende a ser ácido enquanto no interior das células tumorais ele é ligeiramente básico [186]. Um maior entendimento de como pH pode afetar o ER β poderia ajudar no desenvolvimento racional de fármacos mais seletivos ao tecido e às conformações do receptor.

Capítulo 9

Conclusões

NRs são uma superfamília de proteínas que têm como função regular a transcrição de genes. Eles são formados por até quatro domínios estruturais distintos. O LBD é o mais importante deles e tem como principal função a associação seletiva a pequenas moléculas hidrofóbicas: os hormônios. A função dos NRs e as características de seus ligantes os tornam alvos ideais para o desenvolvimento de fármacos.

A associação de ligantes ao LBD leva a alterações conformacionais neste domínio, promovendo a ativação da transcrição. Estas mudanças estão fundamentalmente relacionadas a aspectos dinâmicos de suas estruturas, em especial da α -hélice H12. A grande maioria dos estudos sobre os mecanismos moleculares envolvidos na ação dos NRs baseia-se na obtenção de estruturas cristalográficas. Entretanto, nem sempre apenas estas estruturas possibilitam explicar completamente os inúmeros dados funcionais que continuamente se acumulam na literatura. Em alguns casos, é bem difícil à obtenção de novas estruturas, tal como as de NRs mutantes ou sem ligantes. Em outros, não se têm certeza nem se as próprias estruturas cristalográficas obtidas são, de fato, conformações acessíveis.

O completo entendimento da função das proteínas em solução também requer uma visão dinâmica de suas estruturas. Apesar disso, ainda existem poucos estudos da dinâmica de NRs na literatura. A simulação de dinâmica molecular é uma técnica poderosa, que pode ajudar a melhor entender os NRs em ação. Esta Tese de Doutorado encontra-se neste contexto, sendo abordados vários aspectos da estrutura e dinâmica de dois grupos importantes de NRs: TRs e ERs. Os principais resultados e conclusões obtidas de cada objetivo da Tese são mostrados a seguir.

O novo sítio de ligação do TR

Um segundo sítio de ligação foi observado em uma nova estrutura cristalográfica do LBD do TR α , existindo dúvidas se os hormônios tireoideanos realmente se associariam a este novo sítio em solução e sobre qual seria sua função biológica. Os resultados das simulações de MD indicaram que os hormônios T3 e T4 se mantêm ancorados no segundo sítio de ligação, possuindo grande mobilidade e vários modos de ligação distintos. O hormônio T4 é menos móvel do que T3 neste sítio, possuindo energias de interação mais favoráveis ao seu ancoramento nesta posição. As simulações de MD sugerem ainda que o segundo sítio pode influir na afinidade de ligantes do primeiro sítio, reduzindo as interações com o ligante.

As estimativas da afinidade dos hormônios foram realizadas por duas metodologias distintas. Os valores de ΔG de dissociação obtidos pelo método ABF foram 9,6 e 14,2 kcal.mol⁻¹ para o T3 e T4, respectivamente. O método ABF foi mais adequado que o método SMD/JE para o cálculo do ΔG , obtendo convergência do resultado com menor custo computacional. O ΔG de dissociação pelo método SMD/JE foi obtido apenas para o T3, sendo igual 8,9 kcal.mol⁻¹, logo, bem próximo do obtido pelo método ABF. Apesar do alto custo computacional do método JE/SMD, foi observado que é possível estabelecer uma relação entre as configurações iniciais e os trabalhos de dissociação, o que pode ser explorado para aumentar a convergência do método.

A conclusão principal do trabalho a partir do conjunto de resultados obtidos foi que ambos os hormônios tireoideanos devem associar-se ao segundo sítio dos TRs em solução, sendo o T4 seu mais provável ligante natural. Sugere-se, ainda, que a função biológica do segundo sítio poderia estar relacionada a um mecanismo de repressão da transcrição gênica, que seria dependente da concentração intracelular dos hormônios.

A estrutura e dinâmica do *apo*-TR

Um novo modelo estrutural do LBD do *apo*-TR foi proposto utilizando simulações de MD e experimentos de troca hidrogênio-deutério. Os resultados obtidos sugeriram que na ausência de ligantes, H12 ancora-se no C-terminal da H3, o que explica a redução da exposição ao solvente desta região, tal como indicada pelos

experimentos. É possível ainda observar outras alterações em relação à estrutura do LBD do TR associado a ligantes, tal com o colapso hidrofóbico do sítio de ligação, com a expulsão de um resíduo polar deste sítio para o solvente. Foram verificadas, ainda, alterações nas posições das hélices H8, H10 e H11 que poderiam indicar quais mudanças ocorrem na superfície de dimerização de *apo*-TRs.

O uso combinado de experimentos de troca de H/D e simulações de MD permitiu, assim, propor um novo modelo estrutural do *apo*-TR, bem diferente do modelo tradicional sugerido pelo mecanismo da ratoeira, que indica apenas que H12 deve estar aberta em solução, o que não foi observado neste estudo.

O estudo de mutações do TR

Mutantes do TR são importantes tanto em estudos funcionais deste receptor, como por causarem a síndrome RTH. Duas mutações foram estudadas através de simulações de MD: M369R e P452L. O objetivo destes estudos foi elucidar os mecanismos moleculares que levam a alterações em suas atividades.

M369R é uma mutação de alta afinidade pelos hormônios. Os resultados obtidos permitem concluir que o resíduo mutado pode interagir diretamente com hormônios no segundo sítio de ligação do TR. Esta interação pode explicar o aumento de afinidade observada experimentalmente.

P452L é uma mutação natural que provoca RTH e que recentemente foi identificada num paciente. Ela causa baixa afinidade pelos hormônios e reduz a ativação da transcrição, mesmo em condições saturadas de ligantes. As simulações de MD indicam que a mutação altera a posição da H12, empurrando o ligante para dentro do sítio de ligação, o que causa perda de interação com o grupo- β . A redução da cavidade de interação com CoAs, devido à mudança na posição da H12 e a perda de interação no sítio de ligação explicam como a mutação causa baixa afinidade por hormônios e reduz a atividade transcricional, respectivamente.

A conformação alternativa do ER β

Uma conformação alternativa do LBD do ER β nativo ligado ao estradiol foi obtida em uma nova estrutura cristalográfica. Esta conformação pode explicar como o ER β reprime a transcrição de genes também regulados pelo ER α . Porém, ela é

diferente da conformação clássica de NRs associadas a ligantes agonistas, incluindo uma estrutura já depositada no PDB do mesmo sistema. Existem dúvidas se a nova conformação alternativa não é um artefato cristalográfico e sobre qual seria sua estabilidade relativa em relação à conformação clássica.

Os resultados das simulações de MD indicaram que ambas as conformações poderiam ser estáveis, além de sugerirem que o estado de protonação da histidina H498 poderia influir nas conformações e mobilidade da H12. Os cálculos do ΔG entre as conformações clássica e alternativa mostraram que a conformação majoritária é alterada conforme o estado de protonação desta histidina. No estado desprotonado, a conformação alternativa é majoritária, sendo favorecida termodinâmica e cineticamente em relação à conformação clássica. No estado protonado, o mínimo global é a conformação clássica. Porém, ΔG e as barreiras em relação a outras conformações são baixas, indicando que H12 deve possuir maior mobilidade.

Considerando o conjunto de valores de pK_a estimados, conclui-se que em pH fisiológico o LBD do ER β deve assumir a conformação alternativa, o que explicaria como este receptor pode reprimir a transcrição. Como as células de diferentes tecidos podem ter valores distintos de pH intracelular, é sugerido que estas conformações do ER β poderiam também explicar o comportamento de ligantes SERMs.

9.1 Perspectivas

Os resultados obtidos nos quatro objetivos desta Tese de Doutorado permitem a formulação de novas questões e talvez futuros estudos, tanto experimentais, como computacionais.

O novo sítio de ligação do TR abre a possibilidade do desenho de ligantes que poderiam associar-se seletivamente a ele. O método ABF poderia ser aplicado para prever a afinidade e selecionar alguns protótipos iniciais. Entretanto, novas pesquisas neste tema dependem da confirmação experimental prévia da existência e função do novo sítio.

O modelo estrutural obtido para o *apo*-TR é ainda muito aproximado, devido à metodologia empregada. Outros métodos experimentais e de simulações podem ser utilizados para que a elucidação completa e segura da estrutura e dinâmica

de NRs sem ligantes. Uma possibilidade seria o uso de técnicas de simulação de MD mais sofisticadas e modernas, visando à realização de maior amostragem das conformações do LBD destes receptores.

Ainda existem inúmeros NRs mutantes não estudados, sendo um grande desafio entender como as mutações provocam alterações na afinidade e atividade transcricional. O estudo de mutações de outros NRs já está sendo feito no grupo de pesquisa do Prof. Dr. Munir S. Skaf. No caso do TR, dado ao conhecimento acumulado e a similaridade das alterações provocadas por mutações de baixa afinidade, seria interessante o início da busca de protótipos de fármacos para tratamento da síndrome RTH.

As hipóteses levantadas pelo estudo da conformação alternativa do ER β precisam ainda ser confirmadas experimentalmente, em especial o papel da histidina H498 no intercâmbio entre as conformações alternativa e clássica. Um ponto importante seria o uso de métodos mais sofisticados para prever o pK_a desta histidina, o que computacionalmente poderia ser feito usando-se o método de Perturbação de Energia Livre [136]. Além disso, o método ABF poderia ser utilizado em outros NRs, de maneira a prever se existem outras conformações da H12. Se a hipótese de um modelo de conformação alternativo do LBD do ER β explica a repressão deste receptor, o mesmo cálculo realizado para o LBD do ER α deve mostrar que a conformação clássica deste subtipo é majoritária.

Apêndice A

Nomenclatura e estrutura dos aminoácidos

Para o entendimento deste trabalho é necessário o conhecimento da nomenclatura dos aminoácidos, assim como suas estruturas. Neste apêndice são dadas os nomes e as estruturas de todos os aminoácidos naturais, além das abreviaturas de 3 letras e de 1 letra normalmente usados e adotados neste texto. Os sítios ácidos e básicos são mostrados na forma majoritária encontrada no *pH* fisiológico (de valor 7,4).

Nome, Abreviações	Fórmula estrutural	Nome, Abreviações	Fórmula estrutural
<i>Aminoácidos de cadeia lateral polar carregada</i>			
Lisina Lys K	$ \begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_3^+ \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array} $	Ácido aspártico Asp D	$ \begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})\text{O}^- \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array} $
Arginina Arg R	$ \begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{NH}_2)\text{NH}_2 \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array} $	Ácido Glutâmico Glu E	$ \begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})\text{O}^- \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array} $
Histidina His H	$ \begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{Imidazole} \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array} $		

Nome, Abreviações	Fórmula estrutural	Nome, Abreviações	Fórmula estrutural
<i>Aminoácidos de cadeia lateral apolar</i>			
Glicina Gly G		Metionina Met M	
Alanina Ala A		Prolina Pro P	
Valina Val V		Fenilalanina Phe F	
Leucina Leu L		Triptofano Trp W	
Isoleucina Ile I			
<i>Aminoácidos de cadeia lateral polar sem carga</i>			
Serina Ser S		Glutamina Gln Q	
Treonina Thr T		Tirosina Tyr Y	
Asparagina Asn N		Cisteína Cys C	

Apêndice B

Topologia dos hormônios tireoideanos

* CHARMM topology file for thyroid hormones

27 1

```
!  
! Topology definitions for natural thyroid hormones (CHARMM format)  
! !  
! Compiled by:  
! Paulo Cesar Telles de Souza  
! Department of Physical Chemistry, Institute of Chemistry  
! State University of Campinas  
! paulocts@gmail.com  
!  
!
```

```
MASS 1 ITH 126.9044 I ! Iodine for Thyroid Hormone analogs  
MASS 2 CAI 12.01100 C ! di-iodine aromatic bounded to ITH
```

```
AUTO ANGLES DIHED
```

```
!  
! Residue T3 (3,3',5'-triiodo-L-threonine)  
! Charges: ESP charges from optimized structure at  
! B3LYP/CEP-31 level (gaussian03), since other  
! basis are not available for Iodine.  
! Note: charged amino and carboxylic groups.  
!  
!  
RESI T3 0.000000  
GROUP  
ATOM C1 CA 0.785364
```

```
ATOM C2 CA -0.451777
ATOM C3 CA -0.540656
ATOM C4 CA -0.208862
ATOM C5 CA 0.279581
ATOM C6 CA 0.008456
ATOM C7 CA 0.429464
ATOM C8 CAI -0.380987
ATOM C9 CA 0.339499
ATOM C10 CAI -0.380987
ATOM C11 CA -0.252151
ATOM C12 CA 0.339499
ATOM C13 CT2 -0.301200
ATOM C14 CT1 0.354972
ATOM C15 CC 0.719818
ATOM O1 OH1 -0.836078
ATOM O2 OH1 -0.755289
ATOM O3 OC -0.814978
ATOM O4 OC -0.814978
ATOM N1 NH3 -0.587166
ATOM I1 ITH 0.016197
ATOM I2 ITH 0.082674
ATOM I3 ITH 0.082674
ATOM H1 H 0.568696
ATOM H2 HP 0.254072
ATOM H3 HP 0.157939
ATOM H4 HP 0.235145
ATOM H5 HP 0.102972
ATOM H6 HP 0.102972
ATOM H7 HA 0.138494
ATOM H8 HA 0.138494
ATOM H9 HB 0.041308
ATOM H10 HC 0.382273
ATOM H11 HC 0.382273
ATOM H12 HC 0.382273
BOND O1 C1
BOND H1 O1 I1 C2 H2 C3 H3 C6 H4 C4
BOND C1 C2 C1 C3 C3 C4 C4 C5 C5 C6
BOND C5 O2 O2 C7 C6 C2
BOND C8 I3 C10 I2 C9 H5 C12 H6
BOND C7 C8 C8 C9 C11 C12 C12 C10 C10 C7
BOND C11 C9
BOND C11 C13 C13 H7 C13 H8 C13 C14
BOND C14 N1 N1 H10 N1 H11 N1 H12 C14 H9
BOND C14 C15 C15 O3 C15 O4
IMPR C15 C14 O3 O4
PATCH FIRST NONE LAST NONE
```

!

! Residue T4 (3,5,3',5'-tetraiodo-L-tironina)

```
! Charges: ESP charges from optimized structure at
! B3LYP/CEP-31 level (gaussian03), since other
! basis are not available for Iodine.
! Note: charged amino and carboxilic groups.
!
!
RESI T4 0.00
GROUP
ATOM C1 CA 0.724049
ATOM C2 CA -0.515463
ATOM C3 CA -0.515463
ATOM C4 CA 0.139871
ATOM C5 CA 0.175652
ATOM C6 CA 0.139871
ATOM C7 CA 0.451676
ATOM C8 CAI -0.356389
ATOM C9 CA 0.292742
ATOM C10 CAI -0.356389
ATOM C11 CA -0.170451
ATOM C12 CA 0.292742
ATOM C13 CT2 -0.385773
ATOM C14 CT1 0.370856
ATOM C15 CC 0.725250
ATOM O1 OH1 -0.841439
ATOM O2 OH1 -0.791860
ATOM O3 OC -0.812948
ATOM O4 OC -0.812948
ATOM N1 NH3 -0.658492
ATOM I1 ITH 0.070523
ATOM I2 ITH 0.086316
ATOM I3 ITH 0.086316
ATOM I4 ITH 0.070523
ATOM H1 H 0.517777
ATOM H3 HP 0.146377
ATOM H4 HP 0.146377
ATOM H5 HP 0.107192
ATOM H6 HP 0.107192
ATOM H7 HA 0.157194
ATOM H8 HA 0.157194
ATOM H9 HB 0.052792
ATOM H10 HC 0.399711
ATOM H11 HC 0.399711
ATOM H12 HC 0.399711
BOND H1 O1 I1 C2 I4 C3 H3 C6 H4 C4
BOND C1 C2 C1 C3 C3 C4 C4 C5 C5 C6
BOND C5 O2 O2 C7 O1 C1 C9 C11 C6 C2
BOND C8 I3 C10 I2 C9 H5 C12 H6
BOND C7 C8 C8 C9 C11 C12 C12 C10 C10 C7
BOND C11 C13 C13 H7 C13 H8 C13 C14
```

```
BOND C14 N1 N1 H10 N1 H11 N1 H12 C14 H9  
BOND C14 C15 C15 O3 C15 O4  
IMPR C15 C14 O3 O4  
PATCH FIRST NONE LAST NONE
```

Apêndice C

Parâmetros dos hormônios tireoideanos

```
* CHARMM parameter file for thyroid hormones
Use together with par.all22_prot.inp *

BONDS
!
!V(bond) = Kb(b - b0)**2
!
!Kb: kcal/mole/Å**2
!b0: Å
!
!atom type Kb b0
!
ITH CA 166.0 2.1456 ! Iodine bond in T3 and T4 (distance from ab-initio)
ITH CAI 166.0 2.1456 ! Iodine bond in T3 and T4 (distance from ab-initio)
CA CAI 305.000 1.4238 ! Identical to CA-CA (distance from ab-initio)

ANGLES
!
!V(angle) = Ktheta(Theta - Theta0)**2
!
!V(Urey-Bradley) = Kub(S - S0)**2
!Ktheta: kcal/mole/rad**2
!Theta0: degrees
```

```
!Kub: kcal/mole/A**2 (Urey-Bradley)
!S0: Å
!
!atom types Ktheta Theta0 Kub S0
!
!
ITH CA CA 45.8 120.000 0.0 0.000 ! From CT3 CA CA
ITH CAI CA 45.8 120.000 0.0 0.000 ! From CT3 CA CA
ITH CA CAI 45.8 120.000 0.0 0.000 ! From CT3 CA CA
OH1 CA CAI 45.2 120.496 0.0 0.000 ! From OH1-CA-CA
CA OH1 CA 70.0 119.663 0.0 0.000 ! From C-O-C ether
CA CAI CA 40.0 120.000 35.00 2.41620 ! CA-CA-CA (angle from ab-initio)
ITH CAI CA 45.8 120.000 0.0 0.000 ! From CT3 CA CA
CA CA CAI 40.0 120.000 35.00 2.41620 ! From CA-CA-CA
CA CAI CA 40.0 120.000 35.00 2.41620 ! From CA-CA-CA
CAI CA CAI 40.0 120.000 35.00 2.41620 ! From CA-CA-CA
HP CA CAI 30.0 120.00 22.00 2.15250 !
CA CT2 CA 52.0 116.6 0.0 0.000 ! Theta0 from ab-initio
CA OH1 CT2 70.0 121.3 0.0 0.000 ! Theta0 from ab-initio
CC CT2 OH1 52.0 117.9 0.0 0.000 ! Theta0 from ab-initio

DIHEDRALS
!
!V(dihedral) = Kchi(1 + cos(n(chi) - delta))
!
!Kchi: kcal/mole
!n: multiplicity
!delta: degrees
!
!atom types Kchi n delta
!
CA OH1 CA CA 1.5207400 2 180.00 !
CA OH1 CA CA 0.3073975 1 180.00 ! calculations dih1
```

```
CA OH1 CA CA -0.3112080 3 180.00 ! ! CA OH1 CA CAI -1.204610 2 0.00 !
CA OH1 CA CAI 0.177827 1 0.00 ! calculations dih2
CA OH1 CA CAI -0.021617 3 0.00 !
```

```
!
```

```
!
```

```
OH1 CA CAI ITH 4.20 2 180.00 !From OH1 CA CA HP
OH1 CA CA ITH 4.20 2 180.00 !From OH1 CA CA HP
ITH CA CA CA 3.10 2 180.00 !From CT3 CA CA CA
ITH CAI CA CA 3.10 2 180.00 !From CT3 CA CA CA
ITH CAI CA CAI 3.10 2 180.00 !From CT3 CA CA CA
ITH CAI CA CA 3.10 2 180.00 !From CT3 CA CA CA
ITH CA CA HP 4.20 2 180.00 !From HP CA CA CT3
ITH CAI CA HP 4.20 2 180.00 !From HP CA CA CT3
OH1 CA CAI CA 3.10 2 180.00 !From OH1 CA CA CA
CA CA CAI CA 3.10 2 180.00 !From CA CA CA CA
HP CA CAI CA 4.20 2 180.00 !From HP CA CA CA
CT2 CA CA CAI 3.10 2 180.00 !From CT2 CA CA CA
CAI CA CA CA 3.10 2 180.00 !From CA CA CA CA
CAI CA CAI CA 3.10 2 180.00 !From CA CA CA CA
CT2 CA CA OH1 4.20 2 180.00 !As other X CA CA X
CT2 CA CA CT3 4.20 2 180.00 !As other X CA CA X
CA CA OH1 CT2 0.23 2 180.00 !From CT1 CT2 CA CA
```

```
NONBONDED nbxmod 5 atom cdiel fshift vatom vdistance vswitch -
cutnb 14.0 ctofnb 12.0 ctonnb 10.0 eps 1.0 e14fac 1.0 wmin 1.5
```

```
!
```

```
!V(Lennard-Jones) = Eps,i,j[(Rmin,i,j/ri,j)**12 - 2(Rmin,i,j/ri,j)**6]
```

```
!
```

```
!epsilon: kcal/mole, Eps,i,j = sqrt(eps,i * eps,j)
```

```
!Rmin/2: A, Rmin,i,j = Rmin/2,i + Rmin/2,j
```

```
!
```

```
!atom ignored epsilon Rmin/2 ignored eps,1-4 Rmin/2,1-4
```

!

ITH 0.0 -0.779 2.1500 ! Iodine of T3 and T4

CAI 0.0 -0.070 1.9924 ! => CA

END

Referências Bibliográficas

- [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] H. Gronemeyer, J. A. Gustafsson, and V. Laudet. Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nat. Rev. Drug Disc.*, 2:950–964, 2004.
- [4] K. W. Nettles and G. L. Greene. Ligand control to coregulator recruitment to nuclear receptors. *Ann. Rev. Physiol.*, 67:309–333, 2005.
- [5] D. L. Bain et al. Nuclear receptor structure: implications for function. *Annu. Rev. Physiol.*, 69:201–220, 2007.
- [6] V. Chandra P. Huang and F. Rastinejad. Structural overview of the nuclear receptor superfamily: insights into physiology and therapeutics. *Annu. Rev. Physiol.*, 72:247–272, 2010.
- [7] H. Escriva et al. Evolution and diversification of the nuclear receptor superfamily. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 839:143–146, 1998.
- [8] R. L. Mendonça et al. Nuclear receptor and evolution. *Amer. Zool.*, 39:704–713, 1999.
- [9] K. Sheldon. Nuclear receptors as targets for cancer prevention and therapy. *Drug & Market Development*, 14, 2003.
- [10] M. Via. *Nuclear Receptors: The Pipeline Outlook*. Insight Pharma Reports, 2010.

-
- [11] World Health Organization. Chronic obstructive pulmonary disease (copd). <http://www.who.int/respiratory/copd/en/index.html>, January 2013.
- [12] GlaxoSmithKline. Seretide spray (xinafoato de salmeterol+propionato de fluticasona). <http://www.gskpacientes.com.br/detalhes/47/.aspx>, January 2013.
- [13] Wikipedia. Nuclear receptor. http://en.wikipedia.org/wiki/Nuclear_receptor, January 2013.
- [14] M. Pawlak, P. Lefebvre, and B. Staels. General molecular biology and architecture of nuclear receptors. *Curr. Top. Med. Chem.*, 12:486–504, 2012.
- [15] W. Bourguet et al. Nuclear receptor ligand-binding domains: three-dimensional structures, molecular interactions and pharmacological implications. *Trends Pharmacol. Sci.*, 21:381–388, 2000.
- [16] D. Voet et al. *Fundamentals of Biochemistry*. John Wiley & Sons, Inc., 2000.
- [17] D. L. Nelson and M. M. Cox. *Lehninger Principles of Biochemistry*. Freeman, 2008.
- [18] S. P. Williams and P. B. Sigler. Atomic structure of progesterone complexed with its receptor. *Nature*, 393:392–396, 1998.
- [19] J. S. Sack et al. Crystallographic structures of the ligand-binding domains of the androgen receptor and its T877A mutant complexed with the natural agonist dihydrotestosterone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98:4904–4909, 2001.
- [20] R. K. Bledsoe et al. Crystal structure of the glucocorticoid receptor ligand binding domain reveals a novel mode of receptor dimerization and coactivator recognition. *Cell*, 110:93–105, 2002.
- [21] H. Fisher et al. Low resolution structures of the retinoid X receptor DNA-binding and ligand-binding domains revealed by synchrotron x-ray solution scattering. *J. Biol. Chem.*, 278:16030–16038, 2003.

- [22] A.C.M. Figueira et al. Low-resolution structures of thyroid hormone receptor dimers and tetramers in solution. *Biochemistry*, 46:1273–1283, 2007.
- [23] V. Chandra et al. Structure of the intact PPAR-gamma-RXR-alpha nuclear receptor complex on DNA. *Nature*, 456:350–356, 2008.
- [24] I. Orlov et al. Structure of the full human RXR/VDR nuclear receptor heterodimer complex with its DR3 target DNA. *EMBO J.*, 31:291–300, 2011.
- [25] R. L. Wagner et al. A structural role for hormone in the thyroid hormone receptor. *Nature*, 378:690–697, 1995.
- [26] J. P. Renaud et al. Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR- α . *Nature*, 375:377–382, 1995.
- [27] J. P. Renaud et al. Crystal structure of the RAR- γ ligand binding domain bound to all-trans retinoic acid. *Nature*, 378:681–689, 1995.
- [28] Protein Data Bank. Search for “nuclear receptor ligand-binding domain”. <http://www.rcsb.org/pdb/>, January 2013.
- [29] I. Li, M. H. Lambert, and H. E. Xu. Activation of nuclear receptors: a perspective from structural genomics. *Structure*, 11:741–746, 2003.
- [30] M. V. Liberato et al. Medium chain fatty acids are selective peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) γ activators and pan-PPAR partial agonists. *PLOS One*, 7:e36297, 2012.
- [31] T. Itoh et al. Structural basis for the activation of PPAR by oxidized fatty acids. *Nat. Struct. Biol.*, 15:924–931, 2008.
- [32] 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.
- [33] 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.

- [34] L. Martínez et al. Molecular dynamics simulations reveal multiple pathways of ligand dissociation from thyroid hormone receptors. *Biophys. J.*, 89:2011–2023, 2005.
- [35] L. Martínez et al. Molecular dynamics simulations of ligand dissociation from thyroid hormone receptors: evidence of the likeliest escape pathway and its implications for the design of novel ligands. *J. Med. Chem.*, 49:23–26, 2006.
- [36] P. Carlsson, S. Burendahl, and L. Nilsson. Unbinding of retinoic acid from the retinoic acid receptor by random expulsion molecular dynamics. *Biophys. J.*, 9:3151–3161, 2006.
- [37] L. Martínez et al. Only subtle protein conformational adaptations are required for ligand binding to thyroid hormone receptors: simulations using a novel multipoint steered molecular dynamics approach. *J. Phys. Chem. B*, 112:10741–10751, 2008.
- [38] M. T. Sonoda et al. Ligand dissociation from estrogen receptor is mediated by receptor dimerization: evidence from molecular dynamics simulations. *Mol. Endocrinol.*, 22:1565–1578, 2008.
- [39] T. Nagaya and J. L. Jameson. Thyroid hormone receptor dimerization is required for dominant negative inhibition by mutations that cause thyroid hormone resistance. *J. Biol. Chem.*, 268:15766–15771, 1993.
- [40] R. T. Gampe et al. Asymmetry in the PPAR γ /RXR α crystal structure reveals the molecular basis of heterodimerization among nuclear receptors. *Mol. Cell*, 5:545–555, 2000.
- [41] R. C. Ribeiro et al. Definition of the surface in the thyroid hormone receptor ligand binding domain for association as homodimers and heterodimers with retinoid X receptor. *J. Biol. Chem.*, 4:14987–14995, 2001.
- [42] M. Togashi et al. Rearrangements in thyroid hormone receptor charge clusters that stabilize bound 3,5',5-triiodo-l-thyronine and inhibit homodimer formation. *J. Biol. Chem.*, 280:25665–25673, 2005.

- [43] P. F. Egea et al. Crystal structure of the human RXR α ligand-binding domain bound to its natural ligand: 9-*cis* retinoic acid. *EMBO J.*, 19:2592–2601, 2000.
- [44] R. T. Nolte et al. Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Nature*, 395:137–143, 1998.
- [45] B. D. Darimont et al. Structure and specificity of nuclear receptor-coactivator interactions. *Genes Dev.*, 12:3343–3356, 1998.
- [46] 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.
- [47] E. H. Xu and M. H. Lambert. Structural insights into regulation of nuclear receptors by ligands. *Nucl. Recept. Signal.*, 1:e004, 2003.
- [48] G. Pochetti et al. Structural insight into peroxisome proliferator-activated receptor gamma binding of two ureidofibrate-like enantiomers by molecular dynamics, cofactor interaction analysis, and site-directed mutagenesis. *J. Med. Chem.*, 53:4354–4366, 2010.
- [49] A. M. Brzozowski et al. Molecular basis of agonism and antagonism in the estrogen receptor. *Nature*, 389:753–758, 1997.
- [50] A. C. Gee et al. Coactivator peptides have differential stabilizing effects on the binding of estrogens and antiestrogens with the estrogen receptor. *Mol. Endocrinol.*, 13:1912–1923, 1999.
- [51] 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.
- [52] P. Webb et al. Design of thyroid hormone receptor antagonists from first principles. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 83:59–73, 2002.
- [53] J. D. Baxter et al. Structure-based design and synthesis of a thyroid hormone receptor (TR) antagonist. *Endocrinology*, 143:517–524, 2002.

- [54] K. Koheler et al. Thyroid receptor ligands. 6. A high affinity “direct antagonist” selective for the thyroid hormone receptor. *J. Med. Chem.*, 49:6635–6637, 2006.
- [55] J.B. Bruning et al. Partial agonists activate PPAR γ using a helix 12 independent mechanism. *Structure*, 15:1258–1271, 2007.
- [56] P. C. T. Souza et al. Helix 12 dynamics and thyroid hormone receptor activity: experimental and molecular dynamics studies of Ile280 mutants. *J. Mol. Biol.*, 412:882–893, 2011.
- [57] J.H. Choi et al. Anti-diabetic drugs inhibit obesity-linked phosphorylation of PPAR γ by Cdk5. *Nature*, 466:451–456, 2010.
- [58] B. C. Kallenberger et al. A dynamic mechanism of nuclear receptor activation and its perturbation in a human disease. *Nat. Struct. Biol.*, 10:136–140, 2003.
- [59] B. B. Busch et al. Identification of a selective inverse agonist for the orphan nuclear receptor estrogen-related receptor α . *J. Med. Chem.*, 47:5593–5596, 2004.
- [60] D. M. Tanenbaum et al. Crystallographic comparison of the estrogen and progesterone receptor’s ligand binding domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:5998–6003, 1998.
- [61] A. C. Gee and J. A. Katzenellenbogen. Probing conformational changes in the estrogen receptor: evidence for a partially unfolded intermediate facilitating ligand binding and release. *Mol. Endocrinol.*, 15:421–428, 2001.
- [62] B. Windshugel et al. Molecular dynamics simulations of the human CAR ligand-binding domain: deciphering the molecular basis for constitutive activity. *J. Mol. Model.*, 11:69–79, 2005.
- [63] L. Celik, J. D. D. Lund, and B. Schiott. Conformational dynamics of the estrogen receptor α : molecular dynamics simulations of the influence of binding site structure on protein dynamics. *Biochemistry*, 46:1743–1758, 2007.

- [64] J. Zhou, B. Liu, and J. H. Wu. Study of the impact of the T877A mutation on ligand-induced helix-12 positioning of the androgen receptor resulted in design and synthesis of novel antiandrogens. *Proteins*, 78:623–637, 2010.
- [65] A. C.W. Pike. Lessons learnt from structural studies of the oestrogen receptor. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, 20:1–14, 2006.
- [66] R. C. J. Ribeiro et al. X-ray crystallographic and functional studies of thyroid hormone receptor. *J. Steroid. Biochem.*, 65:133–141, 1998.
- [67] J. W. Apriletti et al. Molecular and structural biology of thyroid hormone receptors. *Clinic. Exper. Pharm. Phys.*, 25:S2–S11, 1998.
- [68] R. C. J. Ribeiro et al. Mecanismo molecular da ação do hormônio tireoideano. *Arq. Bras. Endocrinol.*, 48:25–39, 2004.
- [69] S. Borngraeber et al. Ligand selectivity by seeking hydrophobicity in thyroid hormone receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100:15358–15363, 2003.
- [70] L. Ye et al. Thyroid receptor ligands. 1. Agonist ligands selective for the thyroid receptor β_1 . *J. Med. Chem.*, 46:1580–1588, 2003.
- [71] H. A. I. Yoshihara et al. Structural determinants of selective thyromimetics. *J. Med. Chem.*, 46:3152–3161, 2003.
- [72] R. L. Wagner et al. Hormone selectivity in thyroid hormone receptors. *Mol. Endocrinol.*, 15:398–410, 2001.
- [73] B. Sandler et al. Thyroxine-thyroid hormone receptor interactions. *J. Biol. Chem.*, 279:55801–55808, 2004.
- [74] L. Bleicher et al. Structural basis of GC-1 selectivity for thyroid hormone receptor isoforms. *BMC Struc. Biol.*, 8:8, 2008.
- [75] L. Martínez et al. Gaining ligand selectivity in thyroid hormone receptors via entropy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106:20717–20722, 2009.
- [76] G. Chiellini et al. A high-affinity subtype-selective agonist ligand for the thyroid hormone receptor. *Chem. Biol.*, 5:299–306, 1998.

- [77] 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.
- [78] J. J. Hangeland et al. Thyroid receptor ligands. Part 2. Thyromimetics with improved selectivity for the thyroid hormone receptor β . *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 14:3549–3553, 2004.
- [79] P. Webb. Selective activators of thyroid hormone receptors. *Expert Opin. Investig. Drugs*, 13:489–500, 2004.
- [80] Y. Li et al. Thyroid receptor ligands. Part 4: 4'-amido bioisosteric ligands selective for the thyroid hormone receptor beta. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 16:884–886, 2006.
- [81] A. G. Collazo et al. Thyroid receptor ligands. Part 5: Novel bicyclic agonist ligands selective for the thyroid hormone receptor β . *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 16:1240–1244, 2006.
- [82] A. Hedfors et al. Thyroid receptor ligands. 3. Design and synthesis of 3,5-dihalo-4-alkoxyphenylalkanoic acids as indirect antagonists of the thyroid hormone receptor. *J. Med. Chem.*, 48:3114–3117, 2005.
- [83] DrugBank. Search for target “thyroid hormone receptor” and drug group “approved”. <http://www.drugbank.ca/>, January 2013.
- [84] A.C.M. Figueira et al. Analysis of agonist and antagonist effects on thyroid hormone receptor conformation by hydrogen/deuterium exchange. *Mol. Endocrinol.*, 25:15–31, 2011.
- [85] T. Monden et al. Leucine at codon 428 in the ninth heptad of thyroid hormone receptor β_1 is necessary for interactions with the transcriptional cofactors and functions regardless of dimer formations. *Thyroid*, 13:427–435, 2003.
- [86] Y. Hayashi et al. Do clinical manifestations of resistance to thyroid hormone correlate with the functional alteration of the corresponding mutant thyroid hormone-beta receptors? *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 80:3246–3256, 1995.

- [87] W. Feng et al. Síndrome de resistência ao hormônio tireoideano. *Arq. Bras. Endocrinol.*, 48:83–91, 2004.
- [88] T. O. Olateju and M. P. J. Vanderpump. Thyroid hormone resistance. *Ann. Clin. Biochem.*, 46:431–440, 2006.
- [89] M. Ruff et al. Estrogen receptor transcription and transactivation: Structure-function relationship in DNA and ligand-binding domains of estrogen receptors. *Breast Cancer Res.*, 2:353–359, 2000.
- [90] S. Nilsson and J. A. Gustafsson. Estrogen receptor transcription and transactivation: Basic aspects of estrogen action. *Breast Cancer Res.*, 2:360–366, 2000.
- [91] C. Thomas and J. A. Gustafsson. The different roles of ER subtypes in cancer biology and therapy. *Nat. Rev. Cancer*, 11:597–608, 2011.
- [92] G. G. J. M. Kuiper et al. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors α and β . *Endocrinology*, 138:863–870, 1997.
- [93] V. C. Jordan. Antiestrogens and selective estrogen receptor modulators as multifunctional medicines. 1. Receptor interactions. *J. Med. Chem.*, 46:883–908, 2003.
- [94] V. C. Jordan. Antiestrogens and selective estrogen receptor modulators as multifunctional medicines. 2. Clinical considerations and new agents. *J. Med. Chem.*, 46:1081–1111, 2003.
- [95] C. L. Smith and B. W. O'Malley. Coregulator function: a key to understanding tissue specificity of selective receptor modulators. *Endocr. Rev.*, 25:45–71, 2004.
- [96] S. Nilsson et al. Mechanisms of estrogen action. *Physiol. Rev.*, 81:1535–1565, 2001.

- [97] S. Nilsson, K. F. Koehler, and J. A. Gustafsson. Development of subtype-selective oestrogen receptor-based therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 10:778–792, 2011.
- [98] M. K. Lindberg et al. ER β reduces eR α regulated gene transcription, supporting a “ying yang” relationship between ER α e ER β in mice. *Mol. Endocrinol.*, 7:203–208, 2003.
- [99] D. Whitford. *Proteins: Structure and Function*. John Wiley & Sons, Inc., 2005.
- [100] J. C. Kendrew et al. A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by X-ray analysis. *Nature*, 181:662–666, 1958.
- [101] J. C. Kendrew et al. structure of myoglobin: a three-dimensional fourier synthesis at 2 Å. resolution. *Nature*, 185:422–427, 1960.
- [102] M. F. Perutz et al. Chemical and crystallographic study of the two fractions of adult horse haemoglobin. *J. Mol. Biol.*, 1:402–404, 1959.
- [103] M. F. Perutz et al. Structure of haemoglobin: A three-dimensional fourier synthesis at 5.5-Å. resolution, obtained by X-ray analysis. *Nature*, 185:416–427, 1960.
- [104] C. Zhang and S. H. Ki. Overview of structural genomics: from structure to function. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 7:28–32, 2003.
- [105] J. A. MacCamon. Protein dynamics. *Rep. Prog. Phys.*, 47:1–46, 1984.
- [106] K. Henzler-Wildman and D. Kern. Dynamic personalities of proteins. *Nature*, 450:964–972, 2007.
- [107] F. D. Bryngelson and P. G. Wolynes. Spin glasses and the statistical mechanics of protein folding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:7524–7528, 1987.
- [108] H. Frauenfelder, S. G. Sligar, and P. G. Wolynes. The energy landscapes and motions of proteins. *Science*, 254:1598–1602, 1991.

- [109] J. N. Onuchic, Z. Luthey-Schulten, and P. G. Wolynes. Theory of protein folding: The energy landscape perspective. *Ann. Rev. Phys. Chem.*, 48:545–600, 1997.
- [110] P. G. Wolynes. Recent successes of the energy landscape theory of protein folding and function. *Q. Rev. Biophys.*, 38:405–410, 2005.
- [111] J. Villali and D. Kern. Choreographing an enzyme’s dance. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 14:636–643, 2010.
- [112] A. I. Bartlett and S. E. Radford. An expanding arsenal of experimental methods yields an explosion of insights into protein folding mechanisms. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 16:582–588, 2009.
- [113] F. Ritort. Single-molecule experiments in biological physics: methods and applications. *J. Phys.: Condens. Matter*, 18:531–583, 2006.
- [114] B. J. Alder and T. E. Wainwright. Phase transition for a hard sphere system. *J. Chem. Phys.*, 27:1208–1209, 1957.
- [115] M. P. Allen and D. Tildesley. *Computer Simulations of Liquids*. Clarendon Press, Oxford, 1987.
- [116] L. Martínez, Ivana A. Borin, and Munir S. Skaf. *Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular*, chapter 12 - Fundamentos de Simulação por Dinâmica Molecular. Editora Livraria da Física, 2007.
- [117] M. Levitt and A. Warshel. Computer simulation of protein folding. *Nature*, 253:694–698, 1975.
- [118] M. Levitt and A. Warshel. Thermodynamic fluctuations in protein molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73:2740–2741, 1976.
- [119] J. A. McCammon and M. Karplus. Internal motions of antibody molecules. *Nature*, 268:765–766, 1977.
- [120] D. A. Case and M. Karplus. Dynamics of ligand binding to heme protein. *J. Mol. Biol.*, 132:343–368, 1979.

- [121] W. F. van Gunsteren et al. *Computer Simulation of Biomolecular Systems, vol 1-3*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1997.
- [122] D. C. Rapaport. *The Art of Molecular Dynamics Simulation*. Cambridge University Press, 1996.
- [123] D. Frenkel and B. Smit. *Understanding Molecular Simulations*. Academic Press, San Diego, 2001.
- [124] A. R. Leach. *Molecular Modelling: Principles and Applications*. Pearson Education, Harlow, 2001.
- [125] T. L. Blundell and L. Johnson. *Protein Crystallography (Molecular Biology Series)*. 1st ed. Academic Press, 1976.
- [126] B. R. Brooks et al. CHARMM - a program for macromolecular energy, minimization and dynamics calculations. *J. Comput. Chem.*, 4:187–217, 1983.
- [127] 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.
- [128] G. A. Kaminski et al. Evaluation and reparametrization of the OPLS-AA force field for proteins via comparison with accurate quantum chemical calculations on peptides. *J. Phys. Chem. B*, 105:6474–6487, 2001.
- [129] W. L. Jorgensen et al. 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.
- [130] L. D. Schuler et al. An improved GROMOS96 force field for aliphatic hydrocarbons in the condensed phase. *J. Comput. Chem.*, 22:1205–1218, 2001.
- [131] V. Hornak et al. Comparison of multiple Amber force fields and development of improved. *Proteins*, 65:712–725, 2006.
- [132] G. M. Seabra, R. C. Walker, and M. A. E. Roitberg. Are current semiempirical methods better than force fields? A study from the thermodynamics perspective. *J. Phys. Chem. A*, 113:11938–11948, 2009.

- [133] L. Verlet. Computer experiments on classical fluids. I. Thermodynamical properties of Lennard-Jones molecules. *Phys. Rev.*, 159:98–103, 1967.
- [134] R. P. Feynman et al. *The Feynman Lectures on Physics*, volume 1. Addison-Wesley, 1963.
- [135] W. C. Swope et al. A computer-simulation method for the calculation of equilibrium constants for the formation of physical clusters of molecules - application to small water clusters. *J. Chem. Phys.*, 76:637–649, 1982.
- [136] C. Chipot and A. Pohorille. *Free Energy Calculations - Theory and Applications in Chemistry and Biology*. Springer, 2007.
- [137] P. W. Atkins and J. De Paula. *Atkins' Physical Chemistry*. Oxford University Press, 2002.
- [138] D. A. McQuarrie and J. D. Simon. *Physical Chemistry: A Molecular Approach*. Univ. Science Books, 1997.
- [139] A. S. de Araujo et al. Structural modeling of high-affinity thyroid receptor-ligand complexes. *Eur. Biophys. J.*, 39:1523–1536, 2010.
- [140] E. Darve and A. Pohorille. Calculating free energies using average force. *J. Chem. Phys.*, 115:9169–9183, 2001.
- [141] E. Darve, M. A. Wilson, and A. Pohorille. Calculating free energies using a scaled-force molecular dynamics algorithm. *Mol. Simulat.*, 28:113–144, 2002.
- [142] D. Rodriguez-Gomez, E. Darve, and A. Pohorille. Assessing the efficiency of free energy calculation methods. *J. Chem. Phys.*, 120:3563–3578, 2004.
- [143] E. Darve, D. Rodriguez-Gomez, and A. Pohorille. Adaptive biasing force method for scalar and vector free energy calculations. *J. Chem. Phys.*, 128:144120, 2004.
- [144] C. Jarzynski. Nonequilibrium equality for free energy differences. *Phys. Rev. Lett.*, 78:2690–2693, 1997.

- [145] C. Jarzynski. Equilibrium free-energy differences from nonequilibrium measurements: A master-equation approach. *Phys. Rev. E*, 56:5018–5035, 1997.
- [146] B. Isralewitz, M. Gao, and K. Schulten. Steered molecular dynamics and mechanical functions of proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 11:224–230, 2001.
- [147] S. Park et al. Free energy calculation from steered molecular dynamics simulations using Jarzynski’s equality. *J. Chem. Phys.*, 119:3559–3666, 2003.
- [148] S. Park and K. Schulten. Calculating potential of mean force from steered molecular dynamics simulations. *J. Chem. Phys.*, 120:5946–5961, 2004.
- [149] L. Kale et al. NAMD2: greater scalability for parallel molecular dynamics. *J. Comp. Phys.*, 151:283–312, 1999.
- [150] J. C. Gordon et al. H++: a server for estimating pKas and adding missing hydrogens to macromolecules. *Nucleic Acids Res.*, 33:W368–W371, 2005.
- [151] D. C. Bas, D. M. Rogers, and J. H. Jensen. Very fast prediction and rationalization of pKa values for protein-ligand complexes. *Proteins*, 73:765–783, 2008.
- [152] 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.
- [153] W. Humphrey et al. VMD: visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.*, 14:33–38, 1996.
- [154] Y. Wang et al. A second binding site for hydroxytamoxifen within the coactivator-binding groove of estrogen receptor β . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106:9908–9911, 2006.
- [155] A. Hedden et al. A new interpretation of antiestrogen action. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 761:109–120, 1995.
- [156] E. V. Jensen and S. A. Khan. A two-site model for antiestrogen action. *Mech. Ageing Dev.*, 125:679–682, 2004.

- [157] M. Mizwicki et al. Identification of an alternative ligand-binding pocket in the nuclear vitamin D receptor and its functional importance in $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -vitamin D₃ signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101:12876–12881, 2004.
- [158] A. L. B. Ambrosio et al. Ajulemic acid, a synthetic nonpsychoactive cannabinoid acid, bound to the ligand binding domain of the human peroxisome proliferator-activated receptor γ . *J. Biol. Chem.*, 282:18625–18633, 2007.
- [159] B.M. Duggan and D.J. Craik. ^1H and ^{13}C NMR relaxation studies of molecular dynamics of the thyroid hormones thyroxine, 3,5,3'-triiodothyronine, and 3,5-diiodothyronine. *J. Med. Chem.*, 39:4007–4016, 1996.
- [160] B.M. Duggan and D.J. Craik. Conformational dynamics of thyroid hormones by variable temperature nuclear magnetic resonance: the role of side chain rotations and cisoid/transoid interconversions. *J. Med. Chem.*, 40:2259–2265, 1997.
- [161] E. T. Prates et al. CHARMM based parameterization of neutral articaine - a widely used local anesthetic. *Int. J. Quantum Chem.*, 111:1339–1345, 2010.
- [162] A. O. Hansson et al. CHARMM force field parameterization of rosiglitazone. *Int. J. Quantum Chem.*, 111:1346–1354, 2010.
- [163] M. J. Frisch et al. *Gaussian 03 (Revision C.02)*. Gaussian Inc., Pittsburgh, PA, 2001.
- [164] Marcos A. Castro and Sylvio Canuto. *Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular*, chapter 1 - O Método de Hartree-Fock. Editora Livraria da Física, 2007.
- [165] Hélio A. Duarte and Willian R. Rocha. *Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular*, chapter 3 - Teoria do Funcional de Densidade. Editora Livraria da Física, 2007.
- [166] W. J. Stevens, H. Basch, and M. Krauss. Compact effective potentials and efficient shared-exponent basis-sets for the 1st-row and 2nd-row atoms. *J. Chem. Phys.*, 81:6026–6033, 1984.

- [167] W. J. Stevens et al. Relativistic compact effective potentials and efficient, shared-exponent basis-sets for the 3rd-row, 4th-row, and 5th-row atoms. *Can. J. Chem.*, 70:612–630, 1992.
- [168] H. F. Escobar-Morreale et al. Replacement therapy for hypothyroidism with thyroxine alone does not ensure euthyroidism in all tissues, as studied in thyroidectomized rats. *J. Clin. Invest.*, 96:2828–2838, 1995.
- [169] J. H. Oppenheimer and H. L. Schwartz. Stereospecific transport of triiodothyronine from plasma to cytosol and from cytosol to nucleus in rat liver, kidney, brain, and heart. *J. Clin. Invest.*, 75:147–154, 1985.
- [170] S. Shahrara, V. Drvota, and C. Sylven. Organ specific expression of thyroid hormone receptor mRNA and protein in different human tissues. *Biol. Pharm. Bull.*, 22:1027–1033, 1999.
- [171] S.T.C. Lima et al. Differential effects of TR ligands on hormone dissociation rates: Evidence for multiple ligand entry/exit pathways. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 117:125–131, 2009.
- [172] S. Takayama et al. An F-domain introduced by alternative splicing regulates activity of the zebrafish thyroid hormone receptor α . *Gen. Comp. Endocr.*, 155:176–189, 2008.
- [173] L. Martínez et al. On the denaturation mechanisms of the ligand binding domain of thyroid hormone receptors. *J. Phys. Chem. B*, 114:1529–1540, 2010.
- [174] B. R. Huber et al. Thyroid hormone receptor-beta mutations conferring hormone resistance and reduced corepressor release exhibit decreased stability in the N-terminal ligand-binding domain. *Mol. Endocrinol.*, 17:107–116, 2003.
- [175] B. R. Huber et al. Two RTH mutants with impaired hormone binding. *Mol. Endocrinol.*, 17:643–652, 2003.
- [176] N. Jouravel et al. Molecular basis for dimer formation of TR β variant D355R. *Proteins*, 75:111–117, 2008.

- [177] Z. Wang and J. Moulton. SNPs, protein structure, and disease. *Human Mutation*, 17:263–270, 2001.
- [178] P. Yue et al. Loss of protein structure stability as a major causative factor in monogenic disease. *J. Mol. Biol.*, 353:459–473, 2005.
- [179] S. Refetoff et al. Familial syndrome combining deaf-mutism, stippled epiphyses, goiter and abnormally high PBI: possible target organ refractoriness to thyroid hormone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 27:279–294, 1967.
- [180] S. Refetoff et al. Studies of a sibship with apparent hereditary resistance to the intracellular action of thyroid hormone. *Metabolism*, 21:723–756, 1972.
- [181] S. Refetoff. *Thyroid Disease Manager*, chapter 16d - Resistance to thyroid hormone, <http://www.thyroidmanager.org>. Endocrine Education Inc, January 2004.
- [182] M. Taniyama et al. Toxic multinodular goitre in a patient with generalized resistance to thyroid hormone who harbours the R429Q mutation in the thyroid hormone receptor beta gene. *Clin. Endocrinol.*, 54:121–124, 2001.
- [183] C. T. Baumann et al. Nuclear cytoplasmic shuttling by thyroid hormone receptors - multiple protein interactions are required for nuclear retention. *J. Biol. Chem.*, 276:11237–11245, 2001.
- [184] R. N. Cohen et al. The nuclear corepressors recognize distinct nuclear receptor complexes. *Mol. Endocrinol.*, 14:900–914, 2000.
- [185] P. C. T. Souza. *Dissertação de Mestrado “Simulações de Dinâmica Molecular de Mutantes do Receptor do Hormônio Tireoideano”*. Instituto de Química-UNICAMP, 2009.
- [186] J.R. Griffiths. Are cancer cells acidic? *Br. J. Cancer*, 64:425–427, 1991.