Estudos estruturais do receptor do hormônio tireoidiano (TR) e modelagem por homologia da globulina de ligação à tiroxina (TBG).

Lucas Bleicher

Dissertação apresentada ao Instituto de Física de São Carlos, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências: Física Aplicada

Orientador: Prof. Dr. Igor Polikarpov

São Carlos 2005

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

Bleicher, Lucas Estudos estruturais do receptor do hormônio tireoidiano (TR) e modelagem por homologia da globulina de ligação à tiroxina (TBG)." Lucas Bleicher – São Carlos, 2005 Dissertação (Mestrado) – Área de Física Aplicada da Universidade de São Paulo, São Carlos 2005 – Páginas: 87 Orientador: Prof. Dr. Igor Polikarpov 1. Cristalografia de Proteínas. 2. Modelagem molecular. I. Título



"Computadores não servem para nada. Eles só dão respostas." (Pablo Picasso)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Maria da Graça Bleicher, professora, e Ervino Bleicher, pesquisador e professor, pelo exemplo concernente à busca pelo saber.

À minha irmã Lana que, formando-se em Odontologia e obtendo o grau de mestre ao defender uma dissertação reunindo ciências da saúde e história, foi minha primeira referência em relação à interdisciplinaridade.

Aos docentes do bacharelado em Ciência da Computação da Universidade Federal do Ceará, em especial aos professores Valdísio Viana, Creto Vidal, Cláudia Linhares, Riverson Rios, Ricardo Corrêa e Ana Teresa Martins; aos discentes com os quais somei muitas horas de programação e estudo, notadamente Moésio Medeiros, Rafael Nunes, Rute Nogueira, Emanuel Andrade e Maiquel Sampaio, dentre outros.

Aos amigos espalhados pelo Brasil Cláudio Szynkier, Camila Rodrigues, Camila Freire, Camila Caram, Alline Munksgørd e Christiane Teixeira.

Aos colegas do Laboratório de Difração de Raios-X da Universidade Federal do Ceará Marcus Aurélio Miranda, Juliana Almeida, Rudy Crisafulli, Alan Menezes, Maxwell Aragão, Cláudio Remédios.

Ao professor Eduardo Ernesto Castellano, que mostrou-me ser a Cristalografia uma disciplina para a qual a dedicação nunca é demais, e também aos professores Richard Garratt, Glaucius Oliva, Otavio Thiemann e Valter Líbero.

Ao professor Igor Polikarpov, pela orientação e pelo fluxo permanente de novas idéias.

Aos amigos que deixei em Fortaleza - Vicente Rodrigues, Manuel Moura, Pedro Caram, Cláudia Lourenço, Márcio Mesquita, Márcio Holanda, Juliana Campelo, Luciana Braga, Patrícia Landim, Moura Júnior, Ticiana Meireles, Eloneid Nobre; ao Emanuel Henn, que veio de lá para também seguir na pós-graduação em São Carlos, e aos amigos que fiz aqui: Aderson Zottis, Alessandro Nascimento, Aline Zampar, Ana Márcia Barros, André Ambrósio, Caio Assunção, Caroline Valadão, Eliana Grimm, Elisandra Márcia Rodrigues, Érica Carvalho, Fábio Nunes, João Renato Muniz, João Vitor Oliveira, Karen Weber, Káthia Honório, Marcelo Castilho, Marcos Calgaro, Maria Morim, Mario Neto, Mário Sanches, Mirta Caraballo, Monique Mantovani, Nádia Martins, Napoleão Valadares, Ney Leite, Paulo Henrique, Rafael Guido, Rafael Xavier, Raquel Bugs, Renata Andricopulo, Ricardo Nicolucci, Rodrigo Portugal, Rodrigo Vieira, Sandra Krauchenco, Susana Sculaccio, Vanessa Luz, Veronica Donoso, Victória Flório, Vitória Maciel, Vivian França, e aos que talvez tenham escapado à minha memória nesses atribulados dias de fim de prazo;

À Sandra Martha, primeira aluna do grupo a se aventurar no campo dos receptores nucleares e cuja tese de doutorado, assim como a do Ronaldo Nagem, teve notável valor didático para os novos alunos;

À Ana Carolina Migliorini Figueira, que muito gentilmente se dispôs a ensinar biologia molecular e técnicas de cristalização de proteínas a um sujeito cujo contato prévio com laboratórios envolvia cristais do tamanho de cebolas.

À uma pessoa por quem tenho grande admiração pelo profissionalismo, boa vontade e caráter, e à qual sou enormemente grato pelo apoio na fase final de meu mestrado: Adriana Lucely Rojas, cuja dedicação ao repassar seus conhecimentos para toda uma nova geração de cristalógrafos teve e ainda terá valor incalculável.

À Daniele Andreoni e ao Rui Maciel, da Unifesp, a quem devo a oportunidade de ter trabalhado com a TBG.

E finalmente, àquele que foi o maior culpado pela minha paixão pela Cristalografia e pela vida acadêmica - o Professor Doutor José Marcos Sasaki, do Departamento de Física da Universidade Federal do Ceará.

SUMÁRIO

LISTAS	S DE ABREVIATURAS E SIGLAS	i
LISTA	DE FIGURAS	ii
LISTA	DE TABELAS	iii
RESUN	ЛО	iv
ABSTF	ACT	V
1. INTE	RODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	1
1.1.	OS HORMÔNIOS TIREOIDIANOS	2
1.2.	A GLOBULINA DE LIGAÇÃO À TIROXINA (TBG)	6
1.3.	O RECEPTOR DO HORMÔNIO TIREOIDIANO (TR)	13
2. TÉC	NICAS FÍSICAS E COMPUTACIONAIS	27
2.1.	MODELAGEM MOLECULAR POR HOMOLOGIA	28
2.2.	SUBSTITUIÇÃO MOLECULAR	39
3. MAT	ERIAIS E MÉTODOS	47
3.1.	MODELAGEM MOLECULAR DA TBG	48
3.2.	RESOLUÇÃO DAS ESTRUTURAS DOS LBDS DE H	TRA E
ŀ	ITRB COM GC1	54
4. RES	ULTADOS E DISCUSSÃO	58
4.1.	A TBG E MUTANTES OCORRENTES NO BRASIL	59
4.2.	A SELETIVIDADE DO TIROMIMÉTICO GC-1	68
5. CON	ICLUSÕES	74

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF-1: Função ativação 1 (do inglês activation function 1) AF-2: Função ativação 1 (do inglês activation function 1) cDNA: DNA correspondente (do inglês corresponding DNA) DBD: Domínio de ligação ao DNA (do inglês DNA binding domain) kbps: milhares de pares de base LBD: Domínio de ligação ao ligante (do inglês ligand binding domain) PDB: Protein Data Bank RAR: Receptor de ácido retinóico (do inglês retinoic acid receptor) RCL: Laço reativo presente nas serpinas (do inglês reactive center loop) RMSD: Desvio médio quadrático (do inglês root mean square deviation) RSL: Laço reativo presente nas serpinas (do inglês reactive site loop) RXR: Receptor de ácido retinóico X (do inglês retinoic acid X receptor) SRP: partícula de reconhecimento de sinal (do inglês signal recognition particle) TBG: Globulina de ligação à tiroxina (do inglês thyroxine-binding globulin) TBG-CD: Deficiência completa de TBG (do inglês TBG complete deficiency) TBG-PD: Deficiência parcial de TBG (do inglês TBG partial deficiency) T₃: 3,5,3'-triiodotironina T₄: tiroxina TR: Receptor tireoidiano (do inglês thyroid receptor)

LISTA DE FIGURAS

1.1.1	Fórmulas químicas dos hormônios tireoidianos	2
1.2.1	Estruturas ligadas covalentemente à globulina de ligação à tiroxina	7
1.2.2	Conformações distintas observadas para as serpinas	8
1.3.1	Organização dos domínios de um receptor nuclear típico	13
1.3.2	Representação esquemática de um domínio de ligação ao DNA de receptor nuclear	15
1.3.3	Isoformas do receptor tireoidiano	16
1.3.4	Fórmula química do tiromimético GC-1	19
1.3.5	Sítio de ligação para hormônio do receptor tireoidiano	20
2.1.1	Comportamento do potencial de Lennard-Jones	31
2.1.2	Relações entre seqüência de aminoácidos e estrutura tridimensional	33
2.1.3	O mapa de Ramachandran	35
2.1.4	Validação pelo programa Verify3D	36
2.2.1	O mapa de Patterson	42
3.1.1	Alinhamento de seqüência entre TBG, α 1-anti-tripsina e anti-trombina	50
3.2.1	Sítio de ligação do hTRβ ligado ao GC-1	56
4.1.1	Modelo da TBG selvagem e seu mapa de Ramachandran	60
4.1.2	Análise do modelo da TBG e da α1-anti-tripsina pelo programa Verify3D	62
4.1.3	Modelo do mutante K332Xfs e seu mapa de Ramachandran	62
4.1.4	Análise do modelo do mutante K332Xfs pelo programa Verify3D	63
4.1.5	Modelo do mutante Q223X e seu mapa de Ramachandran	63
4.1.6	Modelo do mutante S61C e seu mapa de Ramachandran	64
4.1.7	Análise do modelo do mutante S61C pelo programa Verify3D	64
4.1.8	Detalhe da região do modelo onde ocorre a mutação S61C	65
4.2.1	Sobreposição dos sítios ativos do hTR α e do hTR β	68
4.2.2	Esquema de ligação do GC-1 para o hTRα na conformação produtiva	69
4.2.3	Esquema de ligação do GC-1 para o hTRα na conformação não-produtiva	70
4.2.4	Interações do hTR α (conformação produtiva) e do hTR β com o GC-1	71
4.2.5	Interações entre o hTRα (conformação não produtiva) e o GC-1	71

LISTA DE TABELAS

1.3.1	Estruturas de domínios do receptor tireoidiano depositadas no Protein Databank	17
3.2.1	Dados da coleta de dados e resolução de estrutura do hTR α ligado ao GC-1	54
3.2.2	Dados da coleta de dados e processamento do hTR β ligado ao GC-1	55
3.2.3	Estatísticas finais para a estrutura do hTR β ligado ao GC-1	56
4.2.1	Comparação entre tiromiméticos seletivos e a presença do oxigênio éter	72

RESUMO

Os hormônios tireoidianos estão envolvidos em vários efeitos regulatórios, em órgãos diversos. Suas variações no organismo estão relacionadas a quadros clínicos de grande relevância. A presente dissertação trata do estudo de duas proteínas diretamente relacionadas ao complexo sistema regulatório associado a tais hormônios. A primeira delas é a globulina de ligação à tiroxina (TBG), responsável pelo transporte da grande maioria dos hormônios tireoidianos circulantes, e cujas alterações estão relacionadas a falhas na interpretação de testes de avaliação da função tireoidiana, podendo levar a tratamentos desnecessários. A segunda proteína é o receptor tireoidiano (TR), responsável pela mediação dos efeitos regulatórios do hormônio tireoidiano, tendo sua estimulação de atividade transcricional relacionada à ligação do hormônio em um de seus domínios. A TBG foi estudada através da técnica computacional conhecida como modelagem molecular por homologia, aplicada à proteína em sua forma selvagem e a mutantes observados no Brasil, com o intuito de relacionar a inviabilidade de tais mutantes a aspectos estruturais. Foi proposto que, para dois dos mutantes estudados, a formação das estruturas secundárias como na forma nativa da proteína seria inviável, enguanto que para o terceiro mutante a inviabilidade poderia ser causada por enovelamento incorreto causado por uma possível interação entre um resíduo de cisteína adveniente da mutação e outros resíduos do mesmo aminoácido em posição fisicamente próxima. O estudo do TR teve como base as estruturas cristalográficas das duas isoformas humanas do receptor (hTRa e hTRB) quando ligadas ao tiromimético GC-1. Esse composto tem a propriedade de ligar-se preferencialmente à isoforma β, o que pode ter interessantes aplicações farmacológicas. A análise comparativa da ligação do GC-1 às duas isoformas mostrou que, para tal composto, a seletividade se deve a mudanças consideráveis no modo de ligação ao hTR α e hTR β . Para a isoforma α , há dois modos de ligação, envolvendo conformações alternativas de ligante e proteína, onde em uma delas a ligação é mais favorável e semelhante à ligação do composto à isoforma β, enquanto no outro modo de ligação há a perda de uma interação direta entre composto e proteína, explicando a mais baixa afinidade do GC-1 à isoforma α quando comparado à isoforma β. O mecanismo de β-seletividade para esse composto está relacionado a um átomo de oxigênio específico que não existe no ligante natural do receptor, o que fornece úteis informações para a criação de novos compostos.

ABSTRACT

The thyroid hormones are involved in various regulatory effects, on diverse organs. Their fluctuations on the body are related to clinical scenarios of great relevance. This work deals with the study of two proteins which are directly related to the regulatory system associated to these hormones. The first one is the thyroxine-binding globulin (TBG), responsible for the transport of a large part of the thyroid hormones in serum, and whose variations are related to misinterpretation of thyroid function tests. The second protein is the thyroid receptor (TR), responsible for the mediation of the thyroid hormone regulatory effects - the transcriptional activity being related to ligand binding to one of the protein domains. The wild-type TBG and three mutants discovered in Brazil were studied by the computational technique known as homology modeling. The purpose of this investigation was to relate protein unviability to structural aspects. It was proposed that, for two mutants, the unviability was related to the impossibility of secondary structure formation as needed to form the native folding, while the third mutant the cause could be the formation of an incorrect folding due to possible interactions involving a cysteine residue created by the mutation and other nearby cysteine residues. The thyroid receptor was studied in the light of the x-ray structures of the two isoforms of the protein (hTRα and hTRβ) bound to GC-1, a synthesized compound which resembles the thyroid hormones. This ligand binds preferably the β isoform, a feature that may have interesting pharmacological applications. The comparative analysis of GC-1 binding to the two isoforms allowed the construction of a structural basis of its β -selectivity property, which is due to considerable differences in the binding modes for the two isoforms. This involves two different configurations of ligand and protein conformations for the α isoform – on one of them, the ligand docks to the molecule the same way it docks to hTRB, while on the second configuration it loses one direct interaction to the protein, explaining its lower affinity to hTR α when compared to hTR β . The β -selectivity mechanism for this compound is related to a specific oxygen atom which doesn't exist on the receptor endogenous ligand, providing useful information for the development of new compounds.

1. Introdução e revisão bibliográfica

1.1 Os hormônios tireoidianos

1.1.1 Apresentação e produção dos hormônios tireoidianos

Os hormônios são definidos como substâncias produzidas pelo organismo capazes de produzir efeitos específicos sobre a atividade de dados órgãos ou estruturas. São em grande parte produzidos por glândulas endócrinas. Os hormônios tireoidianos, produzidos na glândula tireóide, se apresentam em duas formas principais, mostradas na Fig. 1.1: A tiroxina (T_4), isolada por Kendall em 1919 e sintetizada em 1927¹; e a 3,5,3'-triiodotironina (T_3), descoberta simultaneamente por dois grupos^{2,3}.



Figura 1.1.1: Fórmulas químicas do T₃ (esquerda) e do T₄ (direita).

Os hormônios tireoidianos são produzidos na glândula tireóide, tendo sua liberação estimulada pelo TSH, secretado pela pituitária. Para produzir os hormônios tireoidianos, é necessário obter iodo através da dieta, que posteriormente é concentrado pela glândula tireóide através de um mecanismo conhecido como *bomba de iodo*⁴.

1.1.2 Transporte, metabolismo e excreção

O transporte dos hormônios tireoidianos da tireóide para os tecidos se dá através da associação reversível com proteínas do plasma⁵. A maior parte (~75%) está ligado à TBG⁶ (do inglês T_4 -binding globulin, globulina de ligação ao T₄), uma glicoproteína de origem hepática que será descrita com mais detalhes na seção 1.2. A transtiretina carrega por volta de 15% do T₄ no

soro⁷, mas é a principal proteína de ligação ao hormônio tireoidiano no cérebro⁸. Finalmente, a albumina é responsável pelo transporte de por volta de 7% do T₄, enquanto os demais 3% são transportados por lipoproteínas⁷.

Indivíduos com ausência congênita da TBG ou da albumina sérica têm utilização normal dos hormônios tireoidianos, embora as proteínas de ligação sejam úteis como reservatório de hormônio no sangue. Observa-se que há preferência do T₄ pelo meio extracelular, e do T₃ pelo meio intracelular. A meia-vida do T₄ no soro humano é de seis a sete dias, enquanto a do T₃ é de apenas um dia. Os hormônios tireoidianos são metabolizados principalmente no fígado, nos rins, no cérebro e nos músculos. A principal via metabólica do metabolismo do T₄ é a remoção de um átomo de iodo, demonstrada por Braverman *et al.*⁹ Outros passos de metabolismo levam a formas excretadas nas fezes e na urina, embora aproximadamente 8µg de T₄ e 3µg de T₃ sejam eliminados dessa forma diariamente por humanos.

1.1.3 Efeitos dos hormônios tireoidianos

Os hormônios da tireóide exercem uma vasta gama de efeitos regulatórios, em diversos órgãos. Tais efeitos podem ser classificados em duas categorias: aqueles relativos ao desenvolvimento, como maturação do cérebro e do pulmão, desenvolvimento endócrino (regulação do hormônio de crescimento), metamorfose em anfíbios, etc.; e os efeitos metabólicos, como consumo de oxigênio e geração de calor, metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas, além de efeitos sinérgicos ou antagônicos com outros hormônios (insulina, esteróides, catecolaminas).

A função normal da tireóide é essencial logo após o nascimento – deficiências nesse período levam ao grave retardo no crescimento de quase todos os órgãos. O crescimento do organismo também é afetado, visto que a deficiência de hormônio de crescimento é efeito secundário da ausência de hormônio tireoidiano.

Os hormônios tireoidianos são também necessários para o desenvolvimento do sistema nervoso central. Sua deficiência durante a vida fetal ou no nascimento leva à conservação das características infantis do cérebro, diminuição de neurônios corticais, mielinização tardia, e vascularização reduzida.

Um dos principais efeitos dos hormônios tireoidianos é a capacidade de aumentar consideravelmente o consumo de oxigênio e a produção de calor (termogênese) através da hidrólise do ATP, o que provavelmente está relacionado à bomba de sódio, que consome, nas células em repouso, de 20 a 45% do total de ATP sintetizado¹⁰.

O hipotireoidismo pode ter diversas causas, como ausência congênita ou desaparecimento do tecido da tireóide por processo patológico destrutivo ou interferência terapêutica, estimulação insuficiente da glândula pelo TSH devido a lesões na pituitária, ou bloqueio parcial ou total da síntese de hormônios pela glândula. Neste último caso há aumento da secreção de TSH, causando o bócio. Dentre os sintomas mais comuns de hipotireoidismo, destacam-se a fraqueza, pele seca e áspera, letargia e lentidão na fala.

O hipertireoidismo caracteriza-se pelo excesso de hormônios tireoidianos circulantes, e tem como principais sintomas o nervosismo, excesso de suor, hipersensibilidade ao calor e taquicardia.

Em 1972, estudos *in vivo* demonstraram sítios de ligação nucleares específicos para o T_3 no fígado e rim de rato¹¹. A identificação dos receptores nucleares para os hormônios tireoidianos permitiu discutir de forma muito mais completa seu mecanismo de ação, como será visto na seção 1.3.

4

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Harington, C. R., Barger, G. (1927). Chemistry of thyroxine. III: Constitution and synthesis of thyroxine. *Biochem. J.* 21, 169-171.
- [2] Roche, J., Lissitzky, S., Michel, R. (1953). Sur la triiodothyronine et sur sa presence dans les proteins thyroïdiennes. *Ann. Pharm. Franc.* **II**, 166-172.
- [3] Gross, J., Pitt-Rivers, R. (1953). 3,5,3'-triiodothyronine. I. Isolation from the thyroid gland and synthesis. *Biochem. J.* **53**, 645-650.
- [4] Wolff, J. (1982). Iodide transport anion selectivity and the iodide 'trap'. In: *Diminished Thyroid Hormone Formation.* (Reiwin, D., Klein, E., eds), Schattauer Verlag, Stuttgart.
- [5] Gordon, A. H., Gross, J., O'Connor, D., Pitt-Rivers, R. (1952). Nature of the circulating thyroid hormone-plasma protein complex. *Nature* 169(4288), 19-20.
- [6] Refetoff, S., Murata, Y., Mori, Y., Janssen, O. E., Takeda, K., Hayashi, Y. (1996). Thyroxinebinding globulin: organization of the gene and variants. *Horm. Res.* **45**, 128-138.
- [7] Robbins, J. (1996). Thyroid hormone transport proteins and the physiology of hormone binding. In: *Werner and Ingbar's the thyroid: a fundamental and clinical text*. (Braverman, L. E., Utiger, R. D., eds) Lippincott-Raven, Philadelphia.
- [8] Schreiber, G., Richardson, S. J. (1997). The evolution of gene expression, structure and function of transthuretin. *Comp. Biochem. Physiol.* **116B**, 137-160.
- [9] Braverman, I. E., Ingbar, S. H., Sterling, K. (1970). Conversion of thyroxine (T₄) to triiodothyronine in athyreotic human subjects. *J. Clin. Invest.* **49**, 855-894.
- [10] Edelman, I. S., Ismail-Beigi, F. (1974). Thyroid thermogenesis and active sodium transport. *Rec. Prog. Horm. Res.* **30**, 235-254.
- [11] Oppenheimer, J. H., Koerner, D., Schwartz, H. L., Surks, M. I. (1972). Specific nuclear triiodothyronine binding sites in rat liver and kidney. *J. Clin. Endocr. Metab.* **35**, 330-333.

1.2 A globulina de ligação à tiroxina (TBG)

1.2.1 Descrição

A TBG, descoberta por Gordon *et al.*¹, é uma glicoproteína de 54 kDa, que consiste em uma única cadeia de 395 resíduos de aminoácidos e quatro unidades de heterossacarídeos². Ela é sintetizada pelo fígado e secretada no sangue, onde devido à sua alta afinidade por hormônios tireoidianos é a principal proteína que os transportam – sob circunstâncias normais, ela carrega 75% do T₄ total e 70% do T₃ total presente no soro³. A concentração da TBG no sangue é afetada pela presença de T₄, T₃, estrógeno e glucocorticóides⁴ e hoje pode ser medida a níveis baixos como 0.03% da média normal em adultos^{5,6}.

O gene da TBG localiza-se no cromossomo X e consiste em cinco éxons, totalizando 5.5kbps. Sua seqüência de aminoácidos traduzida a partir de cDNA está mostrada abaixo:

-20	-10	10	20	30	40	50
MSPFLYLVLL	VLGLHATIHC	ASPEGKVTAC	HSSQPNATLY	KMSSINADFA	FNLYRRFTVE	TPDKNIFFSP
		60	70	80	90	100
		VSISAALVML	SFGACCSTQT	EIVETLGFNL	TDTPMVEIQH	GFQHLICSLN
		110	120	130	140	150
		FPKKELELQI	GNALFIGKHL	KPLAKFLNDV	KTLYETEVFS	TDFSNISAAK
		160	170	180	190	200
		QEINSHVEMQ	TKGKVVGLIQ	DLKPNTTMVL	VNYIHFKAQW	ANPFDPSKTE
		210	220	230	240	250
		DSSSFLIDKT	TTVQVPMMHQ	MEQYYHLVDM	ELNCTVLQMD	YSKNALALFV
		260	270	280	290	300
		LPKEGQMESV	EAAMSSKTLK	KWNRLLQKGW	VDLFVPKFSI	SATYDLGATL
		310	320	330	340	350
		LKMGIQHAYS	ENADFSGLTE	DNGLKLSNAA	HKAVLHIGEK	GTEAAAVPEV
		360	370	380	390	395
		ELSDQPENTF	LHPIIQIDRS	FMLLILERST	RSILFLGKVV	NPTEA

Os aminoácidos numerados de -20 a -1 compõem um peptídeo sinal, clivado e não presente na proteína em sua forma funcional, mas que tem papel importante na tradução pelos ribossomos. A proteína recém sintetizada é ligada através deste peptídeo para a partícula de reconhecimento de sinal, que leva o complexo ao retículo endoplasmático. Em seguida ocorre o processamento pós-traducional, que inclui a clivagem do peptídeo sinal, formação de pontes

dissulfeto, glicosilação e enovelamento⁷. A existência de duas pontes dissulfeto na proteína foi indicada por resultados de testes bioquímicos obtidos por Gershengorn *et al.*⁸

As estruturas dos carboidratos ligados à TBG foram determinadas por análises químicas². Tais estruturas estão mostradas abaixo:



Figura 1.2.1: Estruturas ligadas à TBG. Acima, é mostrado o glicopeptídeo I, enquanto abaixo são mostrados os oligossacarídeos denominados A e B, que possuem estruturas similares. Fonte: Zinn *et al.*, 1978².

A proporção dos três carboidratos verificada pelos autores foi de 1:2:1 (respectivamente para o glicopeptídeo I, o oligossacarídeo A e o oligossacarídeo B), compatível com a quantidade de sítios de glicosilação presentes na proteína (quatro).

1.2.2 A TBG no contexto das serpinas

A TBG é incluída na superfamília das serpinas (inibidoras de serina-proteases), devido ao alto percentual de identidade em relação a essas proteínas. Embora o nome da superfamília indique proteínas de atividade inibitória, alguns de seus membros não apresentam tal característica. É o caso da TBG e também da CBG (globulina de ligação a corticosteróides), ambas proteínas de transporte. Algumas proteínas dentre aquelas que apresentam atividade inibitória já possuem estruturas resolvidas, o que pôde revelar seu mecanismo de inibição, do

tipo suicida, e mudanças conformacionais relativas à atividade⁹. A anti-tripsina é considerada arquétipo estrutural das serpinas, sendo comumente escolhida como molde para modelagem por homologia de membros da superfamília sem estrutura resolvida¹⁰.

Uma característica digna de nota relativa às proteínas dessa superfamília é o fato daquelas que possuem atividade inibitória (as estruturas tridimensionais disponíveis são somente para representantes as dessa classe) poderem apresentar consideráveis mudanças de conformação¹¹. Tais mudanças estão relacionadas ao próprio mecanismo de reação das serpinas – trata-se de um mecanismo suicida irreversível em que a serina-protease provoca a clivagem da serpina numa região chamada RSL ou RCL (do inglês *reactive site loop* ou *reactive center loop*), o que causa a inserção dessa seqüência de resíduos numa folha-β, aumentando para cinco o número de fitas-β nessa folha central, e a ligação covalente entre serpina e serina-protease.

As diversas configurações para o RSL e as folhas-β das serpinas (denominadas A, B e C) levaram à classificação em quatro conformações, mostradas abaixo:



Figura 1.2.2: As quatro conformações encontradas nas serpinas: A) nativa; B) clivada; C) latente; D) δ. Fonte: Gettins, 2002¹¹.

A forma nativa (Fig. 1.2.2A) é aquela em que o RSL encontra-se exposto ao solvente, e, portanto, passível de interagir com uma serina-protease e disparar o processo de inibição. Na forma clivada (Fig. 1.2.2B), a clivagem causa o deslocamento do RSL e sua inserção na folha A (mostrada em vermelho na figura) como uma nova fita β (mostrada em azul). Na forma latente

(Fig. 1.2.2C), há uma inserção de fita β na folha supracitada de maneira análoga à forma clivada, mas sem a formação de uma fita β na folha C. Finalmente, na forma δ os resíduos referentes ao RSL inserem-se apenas parcialmente na folha A, como pode ser visto na Fig. 1.2.2D.

1.2.3 Conformações adotadas pela TBG

Até o presente momento não há estrutura tridimensional resolvida experimentalmente para a TBG. Devido ao fato da TBG não apresentar atividade inibitória, espera-se que ela apresente enovelamento semelhante ao das serpinas em sua forma nativa. Porém, há indícios de que a TBG também pode apresentar mudanças conformacionais, devido a resultados relativos à proteína em região de sepse^{12,13}. Foi verificado que, ao interagir com elastase de leucócitos humanos, a TBG é clivada com a liberação de um peptídeo de 4kDa. O seqüenciamento desse peptídeo indicou estar ele na região equivalente ao RSL das serpinas. Além disso, verificou-se que a TBG clivada perde 49% de afinidade ao T₄ em relação à proteína nativa¹⁴. Tais dados indicam uma possível função fisiológica para a mudança de conformação na TBG – a liberação de hormônio em tecidos infeccionados.

1.2.4 Mutações no gene codificante da TBG e implicações fisiológicas

Baixos níveis de TBG no sangue, embora não causem grandes problemas do ponto de vista clínico, podem levar a interpretações errôneas de testes de avaliação da função tireoidiana¹⁵, e à desnecessária terapêutica para o hipotireoidismo. A deficiência da TBG pode se manifestar na forma parcial ou completa (*TBG-PD* e *TBG-CD*, do inglês *thyroxine-binding globulin partial/complete deficiency*), sendo na maioria das vezes causadas por mutações no

gene que codifica para a TBG, localizado no cromossomo X. Boa parte das mutações documentadas acarreta na impossibilidade de detecção desta proteína no soro (falhas na secreção, ou secreção da proteína desnaturada), enquanto outras apresentam alterações em suas propriedades biológicas e/ou físicas³. Uma delas, inclusive, tem a propriedade de resistência ao calor, sem variações na capacidade da proteína de carrear hormônios tireoideanos¹⁴.

Um estudo recente feito com famílias brasileiras (Andreoni *et al.*, dados não publicados) revelou a incidência de uma dessas mutações (Q223X) e duas novas mutações não documentadas (K332Xfs e S61C). A atual inexistência de estruturas cristalográficas da TBG torna atraente o uso da técnica de modelagem por homologia para tentar elaborar hipóteses a respeito da inviabilidade dos citados mutantes, abordagem utilizada recentemente por Reutrakul *et al.*¹⁶

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Gordon, A.H., Gross, J., O'Connor, D., Pitt-Rivers, R. (1952). Nature of the circulating thyroid hormone-plasma protein complex. *Nature* 169(4288), 19-20.
- [2] Zinn, A. B., Marshall J. S., Carlson D. M. (1978). Preparation of glycopeptides and oligosaccharides from thyroxine-binding globulin. J. Biol. Chem. 253, 6768-6773.
- [3] Hayashi, Y., Mori, Y., Janssen, O. E., Sunthornthepvarakul, T., Weiss, R. E., Takeda, K., Weinberg, M., Seo, H., Bell, G. I., Refetoff, S. (1993). Human thyroxine-binding globulin gene: complete sequence and transcriptional regulation. *Mol. Endocrinol.* 7 (8), 1049-1060.
- [4] Bartalena, L. (1990). Recent achievements in studies on thyroid hormone-binding proteins. *Endoc. Rev.* 11(1), 47-64.

- [5] Refetoff, S., Murata, Y., Vassart, G., Chandramouli, V., Marshall, J. S. (1984). Radioimmunoassays specific for the tertiary and primary structures of thyroxine-binding globulin (TBG): measurement of denatured TBG in serum. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **59**, 269-277.
- [6] Murata, Y., Refetoff, S., Sarne, D. H., Dick, M., Watson, F. (1985). Variant thyroxine-binding globulin in serum of Australian aborigines: its physical, chemical and biological properties. *J. Endocrinol. Invest.* 8, 225-232.
- [7] Fingerhut, A., Reutrakul, S., Knuedeler, S. D., Moeller, L. C., Greenlee, C., Refetoff, S., Janssen, O. E. (2004). Partial deficiency of thyroxine-binding globulin-Allentown is due to a mutation in the signal peptide. *J. Clin. Endoc. Metab.* **89**(5), 2477-2483.
- [8] Gershengorn, M. C., Cheng, S.-Y., Lippoldt, R. E., Lord, R. S., Robbins, J. (1977).Characterization of human thyroxine-binding globulin. *J. Biol. Chem.* 252(23), 8713-8718.
- [9] Silverman, G. A., Bird P. I., Carrell R. W., Church, F. C., Coughlin, P. B., Gettins, P. G. W., Irving, J. A., Lomas, D. A., Luke, C. J., Moyer, R. W., Pemberton, P. A., Remold-O'Donnell, E., Salvesen, G. S., Travis, J., Whisstock, J. C. (2001). The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature. *J. Biol. Chem.* 276(36), 33293-33296.
- [10] Janssen, O. E., Chen, B., Büttner, C., Refetoff, S., Scriba, P. C. (1995). Molecular and structural characterization of the heat-resistant thyroxine-binding globulin-Chicago. *J. Biol. Chem.* 270(47), 28234-28238.
- [11] Gettins, P. G. (2002). Serpin structure, mechanism and function. *Chem. Rev.* 102(12), 4751-4804.
- [12] Pemberton, P. A., Stein, P. E., Pepys, M. B., Potter, J. M., Carell, R. W. (1988). Hormone binding globulins undergo serpin conformational change in inflammation. *Nature* **336**, 257-258.

- [13] Jirasakuldech, B., Schussler, G. C., Yap, M. G., Drew, H., Josephson, A., Michl, J. (2000). A characteristic serpin cleavage product of thyroxine-binding globulin appears in sepsis area. *J. Clin. Endoc. Metab.* **85**(11), 3996-3999.
- [14] Janssen, O. E., Golcher, H. M. B., Grasberger, L., Saller, B., Mann, K., Refetoff, S. (2002).
 Characterization of T4-binding globulin cleaved by human leukocyte elastase. *J. Clin. Endoc. Metab.* 87(3), 1217-1222.
- [15] Narendran, P., Lado-Abeal, J., Moeller, L. C., Refetoff, S. (2003). Partial thyroxine-binding globulin (TBG) deficiency in a family with no detectable mutation of the TBG gene. *Clin. Endocrinol.* **59**(6), 823-825.
- [16] Reutrakul, S., Janssen, O. E., Refetoff, S., (2001). Three novel mutations causing complete T₄-binding globulin deficiency. *J. Clin. Endoc. Metab.* 86(10), 5039-5044.

1.3 O receptor do hormônio tireoidiano

1.3.1 Receptores nucleares

Receptores nucleares são fatores de transcrição envolvidos em diversas funções fisiológicas, que funcionam através da ativação por ligantes, levando à regulação da expressão de um gene alvo. Atualmente são conhecidos quarenta e oito receptores nucleares na espécie humana¹, incluindo vários dentre os chamados *receptores órfãos*, isto é, aqueles para os quais não existem ligantes conhecidos.

Os receptores nucleares provêm aos organismos multicelulares meios de controlar a expressão gênica em resposta a uma vasta gama de fatores ambientais, fisiológicos e de desenvolvimento, através de pelo menos três mecanismos distintos:

- Ativação através da ligação com uma pequena molécula lipofílica ou com um parceiro de heterodimerização;
- Modificação covalente, em geral na forma de fosforilação regulada por eventos na membrana celular ou durante o ciclo celular;
- Interações proteína-proteína, geralmente através de contatos com outros fatores de transcrição, que pode ser inclusive outro receptor nuclear.

Os três mecanismos podem trabalhar em conjunto ou individualmente para modular um sinal específico².

Para melhor compreensão de sua estrutura modular, os receptores nucleares são subdivididos em regiões, como mostrado na fig. 1.3.1.



Figura 1.3.1: Organização dos domínios de um receptor nuclear típico, como descrito originalmente por Krust *et al.*³ Do N-terminal para o C-terminal temos a região A/B (ou domínio amino-terminal), a região C, onde se encontra o domínio de ligação ao DNA (DBD, do inglês *DNA-binding domain*), a região D, conhecida como dobradiça (*hinge*), a região E, onde se localiza o domínio de ligação ao ligante (LBD, do inglês *ligand-binding domain*) e a região F ou C-terminal.

O domínio A/B é a região mais variável dentre os receptores nucleares tanto em termos de seqüência de resíduos como em tamanho (de 23 a 550 resíduos). Essa variabilidade pode inclusive se refletir em um mesmo receptor nuclear, devido ao fenômeno de processamento ("*splicing*") alternativo do RNAm^{4,5}. Esta região possui também uma função de ativação transcricional chamada AF-1 (do inglês *activation function 1*). Até a presente data, não se conhece estrutura tridimensional de nenhuma região A/B de receptor nuclear.

A região C compreende o DBD, região mais bem conservada entre todos os receptores nucleares. Sua função é fazer a ligação ao DNA, o que é feito através de estruturas características para esse propósito conhecidas como *dedos de zinco*, mostradas na figura 1.3.2.

Os dedos de zinco são estruturas em forma de alça, independentes entre si, separados por uma seqüência de 15 a 17 aminoácidos e que são formadas pela coordenação de quatro resíduos de cisteína por um íon de zinco. O primeiro dedo possui uma região denominada caixa P (*P Box*), formada por três aminoácidos de sua base responsáveis pelo reconhecimento do elemento responsivo do receptor⁶. Já o segundo dedo possui uma seqüência de cinco aminoácidos entre suas primeira e a segunda cisteínas, chamada caixa D (*D Box*), de importância para a dimerização do receptor⁷.



Figura 1.3.2: Representação esquemática de um DBD de receptor nuclear, mostrando os dois dedos de zinco, a caixa P (*P-Box*) e a caixa D (*D-Box*)

A região D é chamada dobradiça (hinge), por supostamente servir de ligação flexível entre o DBD e o LBD, permitindo a estes domínios a adoção de diferentes conformações sem impedimentos estéricos. Esta região também é bastante variável entre os receptores nucleares, e pode servir de sítio de acoplamento para proteínas co-repressoras^{8,9}.

A região E compreende o LBD, domínio que, embora razoavelmente variável em seqüência primária, tem estrutura tridimensional característica, em um enovelamento composto primordialmente por hélices (em geral doze) com um bolsão onde se liga o hormônio ou ligante exógeno. O LBD medeia a dimerização, a interação com proteínas de choque térmico e a transativação e possui uma função de ativação dependente do ligante (AF-2).

A região F corresponde à porção C-terminal da molécula, existindo em variados tamanhos e seqüências primárias, podendo inclusive ser inexistente em alguns receptores. Sua função é ainda desconhecida.

A transativação dos receptores nucleares através de ligantes é iniciada por uma mudança estrutural quando da ligação do hormônio. A hélice C-terminal do LBD fecha-se sobre este domínio, estabilizando a ligação do ligante e por vezes até fazendo contatos com o mesmo.

Forma-se uma superfície de interação para co-ativadores, havendo também interação com proteínas co-reguladoras.

Supõe-se que os receptores nucleares evoluíram de um receptor "órfão" (com ausência de ligante) ancestral e somente mais tarde adquiriu a propriedade de ligação a pequenas moléculas¹⁰. A associação de um LBD com um DBD provou ser uma união bem sucedida, o que se reflete no fato da evolução ter escolhido os receptores nucleares como o mediador dominante da fisiologia de diversos órgãos, e como regulador da morfogênese em insetos¹¹.

1.3.2 O receptor de hormônio tireoidiano

O receptor de hormônio tireoidiano (TR, do inglês *thyroid receptor*) pertence a família NR1 dos receptores nucleares, à qual pertencem também o receptor para ácido retinóico e para vitamina D, entre outros. Em humanos, ele se apresenta em duas formas, a hTRα (NR1A1), codificada pelo gene c-erbA-1 e hTRβ (NR1A2), codificada pelo gene c-erbA-2 gene. A ocorrência de diferentes processamentos de RNAm resulta em variados produtos gênicos, mostrados na Fig. 1.3.3.



Figura 1.3.3: As diferentes isoformas do receptor tireoidiano. Todas as seqüências acima são codificadas por dois genes, sendo os diferentes produtos gênicos devido ao fenômeno de processamento ("*splicing*") alternativo do RNAm.

Apenas quatro diferentes seqüências (hTR α_1 , hTR α_2 , hTR β_1 e hTR β_2) possuem simultaneamente os domínios funcionais DBD e LBD. Tais seqüências são expressas em praticamente todos os tecidos. Uma peculiaridade da proteína hTR α_2 , particularmente abundante no cérebro, é o fato dela não se ligar ao T₃, funcionando como inibidor do hTR $\alpha_1^{12,13}$.

Tanto o DBD como o LBD do receptor tireoidiano já foram resolvidos por difração de raiosx em associação a diferentes ligantes, parceiros de dimerização, elementos responsivos ou outras moléculas associadas, como pode ser visto na tabela 1.3.1. A isoforma α é a que menos possui estruturas depositadas no banco de dados *PDB*, constando com apenas uma estrutura de seu domínio de ligação ao ligante associado a um tiromimético seletivo para a isoforma β .

Código	Domínio	Demais moléculas na estrutura
1NAV	LBD(a)	[4-(4-hydroxy-3-isopropylphenoxy)-3,5-dimethylphenyl]acetic acid
1NAX	LBD(β)	[4-(4-hydroxy-3-isopropylphenoxy)-3,5-dimethylphenyl]acetic acid
1BSX	LBD(β)	Co-ativador GRIP1
1XZX	LBD(β)	Triiodotironina (T ₃)
1Y0X	LBD(β)	Tiroxina (T ₄)
1NQ0	LBD(β)*	TRIAC
1NQ1	LBD(β)*	TRIAC
1NQ2	LBD(β)*	TRIAC
1NUO	LBD(β)*	TRIAC
1N46	LBD(β)	[4-(4-hydroxy-3-isopropyl-phenoxy)-3,5-dimethyl-phenyl]-6-azauracil
1R6G	LBD(β)	2-[3,5-dibromo-4-(4-hydroxy-3-{hydroxy[(2-
		phenylethyl)amino]methyl}phenoxy)phenyl]ethane-1,1-diol
1Q4X	LBD(β)	GC-24
2NLL	DBD(β)	DBD do receptor RXR e DNA (elemento responsivo para o TR)

 Tabela 1.3.1: Estruturas tridimensionais de domínios do receptor tireoidiano depositadas no Protein Data Bank (PDB). Os domínios marcados com um asterisco (*) sofreram mutação.

1.3.3 Interações

A heterodimerização do TR com o receptor RXR (do inglês *Retinoic X Receptor*) aumenta consideravelmente sua capacidade de se ligar a seqüências específicas de DNA. As regiões relacionadas à interface de dimerização com o RXR encontram-se tanto no DBD como no LBD¹⁴. Os RARs (do inglês *Retinoic Acid Receptor*) também são parceiros de heterodimerização do TR para um elemento responsivo específico¹⁵.

Foi verificado também que os receptores COUP-TF (NR2F1 e NR2F2) também interagem com o TR, mas desabilitando suas funções¹⁶, contudo a formação desse tipo de heterodímero é bem mais fraca que a formação dos respectivos homodímeros¹⁷. Há evidências também da formação de heterodímeros com o PPAR (do inglês *Peroxisome proliferator-activated receptor*) por experimentos *in vitro*¹⁸, e com o SHP (do inglês *small heterodimerization partner*), receptor órfão que possui apenas o LBD, mas para ambos os casos ainda não há informações conclusivas a respeito da relevância biológicas de tais interações.

Adicionalmente, o TR interage com vários fatores de transcrição, proteínas integrantes da maquinaria de transcrição, correpresores e coativadores (revisão em Laudet *et al.*, 2002^{19}). Dados recentes indicam também que o TR é capaz de formar homotetrâmeros, que se dissociam na presença do T₃²⁰.

1.3.4 Ligantes

Além dos hormônios tireoidianos T₃ e T₄, outro ligante endógeno do TR é o TRIAC (3,3'5ácido triiodotiroacético), metabólito do T₃ cuja concentração aumenta sob condições patológicas, como o jejum. Uma interessante característica do TRIAC é o fato de se ligar de forma mais eficiente que o T₃ às isoformas β que ao hTR α 1²¹. Boa parte da pesquisa em ligantes sintéticos para o TR tem buscado a propriedade de β -seletividade, devido a efeitos diferentes da ativação das duas isoformas. Sabe-se que o hormônio tireoidiano tem considerável potência como redutor de colesterol no soro²² e estimula a taxa metabólica, promovendo perda de peso pelo aumento da termogênese²³. No entanto, variados efeitos deletérios como taquicardia e arritmia atrial têm sido associados aos hormônios tireoidianos²⁴⁻²⁹, tornando inviável a sua utilização para tratamento da obesidade e excesso de colesterol. O desenvolvimento de agonistas seletivos para o TR mostrou ser um campo de pesquisa extremamente promissor devido a evidências de que os supracitados problemas poderiam ser contornados através da ativação preferencial das isoformas β , reduzindo a ativação do hTR α_1 . Isso se deve ao fato de que os efeitos cardíacos dos hormônios tireoidianos estão relacionados à maior expressão da isoforma α no coração³⁰. Além disso, a redução de colesterol está relacionada à expressão predominante do TR β no fígado³¹. O composto GC-1³¹ é um tiromimético β -seletivo que vem apresentando promissores resultados em diversos tipos de testes *in vitro* e *in vivo* em diferentes organismos³³⁻³⁹. O GC-1 pode ser visto na figura abaixo.



Figura 1.3.4: Fórmula química do tiromimético GC-1.

Enquanto o T₃ têm constantes de dissociação 0.060 ± 0.004 nM e 0.087 ± 0.006 nM, respectivamente para as isoformas α e β , os valores correspondentes para o GC-1 são de 0.66 ± 0.05 nM e 0.10 ± 0.01 nM⁴⁰. Tais valores mostram que, embora o GC-1 ligue-se à isoforma β de forma comparável ao T₃, sua ligação à isoforma α é aproximadamente dez vezes mais fraca.

1.3.5 O sítio de ligação do TR

As isoformas $\alpha \in \beta$ do TR possuem sítios de ligação ao hormônio praticamente idênticos, sendo a única diferença entre aminoácidos a substituição de uma serina (isoforma α) para uma asparagina (isoforma β). Pode-se simplificar a análise do bolsão de ligação do hormônio subdividindo-o em três partes, como mostrado na figura 1.3.5. A região 1, mostrada em vermelho, é caracterizada pela presença de um único resíduo polar (His235 na isoforma α , correspondente ao His381 na isoforma β). Tal resíduo faz uma ponte de hidrogênio com o fenol do T₃, o mesmo acontecendo com praticamente todos os ligantes do TR para os quais existem estruturas no PDB. Análogos ao T₃ sintetizados sem o grupo fenol nessa posição tendem a

perder funcionalidade⁴¹. A região 2 caracteriza-se pela predominância de resíduos hidrofóbicos, enquanto a região 3 possui três argininas envolvidas na ligação do hormônio.



Figura 1.3.5: O sítio de ligação do TR, como visto na estrutura do hTR β ligado ao T₃. As regiões vermelha, cinza e azul correspondem às regiões 1, 2 e 3 descritas no texto. Resíduos apolares estão mostrados em cinza, resíduos de caráter básico em azul e resíduos de caráter ácido em laranja.

É na região 3 que se encontra a única diferença em seqüência primária entre os sítios ativos das isoformas $\alpha \in \beta$, citada anteriormente. Dessa forma, é esperado que as mudanças em modos de ligação entre proteína e ligante sejam notáveis nessa região. Na única comparação disponível no PDB entre a ligação de um tiromimético às duas isoformas⁴², tais variações no modo de ligação são extremamente sutis. No presente trabalho, analisaremos a base estrutural da seletividade do ligante GC-1, que, como será visto a seguir, envolve mudanças consideráveis na interação ligante-proteína.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

 Maglich, J. M., Sluder, A., Guan, X., Shi, Y., McKee, D. D., Carrick, K., Kamdar, K., Willson, T. M., Moore, J. T. (2001). Comparison of complete nuclear receptor sets from the human, *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila* genomes. *Genome Biology* **2**(8), research0029.1-research0029.7.

- [2] Giguère, V. (1999). Orphan Nuclear Receptors: From Gene to Function. *Endocr. Rev.* 20(5), 689-725.
- [3] Krust, A., Green, S., Argos, P., Kumar, V., Walter, P., Bornert, J. M., Chambon, P. (1986). The chicken oestrogen receptor sequence: homology with v-erbA and the human oestrogen and glucocorticoid receptors. *EMBO J.* 5(5), 891-897.
- [4] Giguère, V. (1994). Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins: complex interplay in retinoid signaling. *Endocr. Rev.* **15**, 61-79.
- [5] Chambon, P. (1996). A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J.***10**(9), 940-954.
- [6] Umesono, K., Evans, R. M. (1989). Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. *Cell* 57, 1139-1146.
- [7] Ribeiro, R. C., Apriletti, J. W., Wagner, R. L., West, B. L., Feng, W., Huber, R., Kushner, P. J., Nilsson, S., Scanlan, T., Fletterick, R. J., Schaufele, F., Baxter, J. D. (1998). Mechanisms of thyroid hormone action: insights from X-ray crystallographic and functional studies. *Recent Prog. Horm. Res.* 53, 351-392.
- [8] Horlein, A. J., Naar, A. M., Heinzel, T., Torchia, J., Gloss, B., Kurokawa, R., Ryan, A., Kamel, Y., Soderstrom, M., Glass, C. K., Rosenfeld, M. G. (1995). Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* **377**, 397–404.
- [9] Chen, J. D., Evans, R. M. (1995). A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* 377, 454–457.

- [10] Escriva, H., Safi, R., Hanni, C., Langlois, M. C., Saumitou-Laprade, P., Stehelin, D., Capron,
 A., Pierce, R., Laudet, V. (1997). Ligand binding was acquired during evolution of nuclear receptors. *PNAS* 94(13), 6803-6808.
- [11] Mangelsdorf, D. J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schütz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P., Evans, R. M. (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83, 835-839.
- [12] Mitsuhashi, T., Tennyson, G. E, Nikodem, V. M. (1988). Alternative splicing generates messages encoding rat c-erbA proteins that do not bind thyroid hormone. *PNAS* 85(16), 5804-5808.
- [13] Izumo, S., Mahdavi, V. (1988). Thyroid hormone receptor alpha isoforms generated by alternative splicing differentially activate myosin HC gene transcription. *Nature* 334(6182), 539-542. Erratum: *Nature* 335(6192), 744.
- [14] Zechel, C., Shen, X. Q., Chen, J. Y., Chen, Z. P., Chambon, P., Gronemeyer, H. (1994). The dimerization interfaces formed between the DNA binding domains of RXR, RAR and TR determine the binding specificity and polarity of the full-length receptors to direct repeats. *EMBO J.* **13**(6), 1425-1433.
- [15] Umesono, K., Giguere, V., Glass, C. K., Rosenfeld M. G., Evans, R. M. (1988). Retinoic acid and thyroid hormone induce gene expression through a common responsive element. *Nature* 336(6196), 262-265.
- [16] Berrodin, T. J., Marks, M. S., Ozato, K., Linney, E., Lazar, M. A. (1992). Heterodimerization among thyroid hormone receptor, retinoic acid receptor, retinoid X receptor, chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor, and an endogenous liver protein. *Mol. Endocrinol.* 6(9), 1468-1478.

- [17] Butler, A. J., Parker, M. G. (1995). COUP-TF II homodimers are formed in preference to heterodimers with RXR alpha or TR beta in intact cells. *Nucleic Acids Res.* 23(20), 4143-4150.
- [18] Bogazzi, F., Hudson, L. D., Nikodem, V. M. (1994). A novel heterodimerization partner for thyroid hormone receptor. Peroxisome proliferator-activated receptor. *J. Biol. Chem.* 269(16), 11683-11686.
- [19] Laudet, V., Gronemeyer, H. (2002). The nuclear receptor factsbook. Academic Press. London, England.
- [20] Figueira, A. C. M., Dias, S. M. G., Apriletti, J. W., Baxter, J. D., Webb, P., Neves, F. A. R., Simeoni, L. A., Ribeiro, R. C. J., Polikarpov, I. (2005). Human thyroid receptor forms tetramers in solution, which dissociate into dimers upon ligand binding. *Cell Biochem. Biophys* (aceito para publicação).
- [21] Messier, N., Langlois, M. F. (2000). Triac regulation of transcription is T(3) receptor isoform- and response element-specific. *Mol. Cell Endocrinol.* 165(1-2), 57-66.
- [22] Boyd, G. S., Oliver, M. F. (1960). Thyroid hormones and plasma lipids. *Br. Med. Bull.* 16, 138-142.
- [23] Mariash, C.N. (1998). The thyroid and obesity revisited. Thyroid Today. 21 (3), 1-9.
- [24] Johansson, C., Vennstrom, B., Thoren, P. (1998). Evidence that decreased heart rate in thyroid hormone receptor-alpha1-deficient mice is an intrinsic defect. *Am. J. Physiol.* 275(2 pt 2), R460-646.
- [25] Wikstrom, L., Johansson, C., Salto, C., Barlow, C., Campos Barros, A., Baas, F., Forrest, D, Thoren, P., Vennstrom, B. (1998). Abnormal heart rate and body temperature in mice lacking thyroid hormone receptor alpha 1. *EMBO J.* **17**(2), 455-461.
- [26] Gothe, S., Wang, Z., Ng, L., Kindblom, J. M., Barros, A.C., Ohlsson, C., Vennstrom, B., Forrest, D. (1999). Mice devoid of all known thyroid hormone receptors are viable but exhibit

disorders of the pituitary-thyroid axis, growth, and bone maturation. *Genes Dev.* **13**, 1329-1341.

- [27] Gauthier, K., Chassande, O., Plateroti, M., Roux, J. P., Legrand, C., Pain, B., Rousset, B., Weiss, R., Trouillas, J., Samarut, J. (1999). Different functions for the thyroid hormone receptors TRalpha and TRbeta in the control of thyroid hormone production and post-natal development. *EMBO J.* **18**(3), 623-631.
- [28] Dillmann, W.H. (1990). Biochemical basis of thyroid hormone action in the heart. Am. J. Med. 88(6), 626-630.
- [29] Dillmann, W.H. (1996). Editorial: thyroid hormone action and cardiac contractility a complex affair. Endocrinology 137(3), 799-801.
- [30] Blange, I., Drvota, V., Yen, P.M., Sylven, C. (1997). Species differences in cardiac thyroid hormone receptor isoforms protein abundance. *Biol. Pharm. Bull.* 20(11), 1123-1126.
- [31] Schwartz, H. L., Strait, K. A., Ling, N. C., Oppenheimer, J. H. (1992). Quantitation of rat tissue thyroid hormone binding receptor isoforms by immunoprecipitation of nuclear triiodothyronine binding capacity. *J. Biol. Chem.* 267(17), 11794–11799.
- [32] Chiellini, G., Apriletti, J.W., Yoshihara, H.A.I., Baxter, J. D., Ribeiro, R.C., Scanlan, L.N. (1998). A high-affinity subtype-selective agonist ligand for the thyroid hormone receptor. *Chem. Biol.* 5(6), 299-306.
- [33] Baxter, J. D., Webb, P., Grover, G., Scanlan, T. S. (2004). Selective activation of thyroid hormone signaling pathways by GC-1: a new approach to controlling cholesterol and body weight. *Trends in Endocrinol. Metabol.* **15**(4), 154-157.
- [34] Grover, G. J., Egan, D. M., Sleph, P. G., Beehler, B. C., Chiellini, G., Nguyen, N.-H., Baxter, J. D., Scanlan, T. S. (2004). Effects of the thyroid hormone receptor agonist GC-1 on metabolic rate and cholesterol in rats and primates: selective actions relative to 3,5,3'-triiodo-L-thyronine. *Endocrinology* 145(4), 1656-1661.
- [35] Freitas, F. R., Capelo, L. P., O'Shea P. J., Jorgetti, V., Moriscot, A. S., Scanlan, T. S., Williams, G. R., Zorn, T. M., Gouveia, C. H. (2005). The thyroid hormone receptor betaspecific agonist GC-1 selectively affects the bone development of hypothyroid rats. *J. Bone Miner. Res.* **20**(2), 294-304.
- [36] Mishra, M. K., Wilson, F. E., Scanlan, T. S., Chiellini, G. (2004). Thyroid hormonedependent seasonality in American tree sparrows (Spizella arborea): effects of GC-1, a thyroid receptor beta-selective agonist, and of iopanoic acid, a deiodinase inhibitor. *J. Comp. Physiol.* **174**(6), 471-479.
- [37] Furlow, J. D., Yang, H. Y., Hsu, M., Lim, W., Ermio, D. J., Chiellini, G., Scanlan, T. S. (2004). Induction of larval tissue resorption in Xenopus laevis tadpoles by the thyroid hormone receptor agonist GC-1. *J. Biol. Chem.* **279**(25), 26555-26562.
- [38] Manzano, J., Morte, B., Scanlan, T. S., Bernal, J. (2003). Differential effects of triiodothyronine and the thyroid hormone receptor beta-specific agonist GC-1 on thyroid hormone target genes in the brain. *Endocrinology*. **144**(12), 5480-5487.
- [39] Trost, S. U., Swanson, E., Gloss, B., Wang-Iverson, D.B., Zhang, H., Volodarsky, T., Grover, G.J., Baxter, J.D., Chiellini, G., Scanlan, T.S., Dillman, W.H. (2000). The thyroid hormone receptor-beta-selective agonist GC-1 differentially affects plasma lipids and cardiac activity. *Endocrinology*. **141**(9), 3057-3064.
- [40] Yoshihara, H. A. I., Apriletti, J. W., Baxter, J. D., Scanlan, T. S. (2003). Structural determinants of selective thyromimetics. *J. Med. Chem.* 46(14), 3152-3161.

- [41] Dow, R.L., Schneider, S.R., Paight, E.S., Hank, R.F., Chiang, P., Cornelius, P., Lee, E., Newsome, W.P., Swick, A.G., Spitzer, J., Hargrove, D.M., Patterson, T.A., Pandit, J., Chrunyk, B.A., LeMotte, P.K., Danley, D.E., Rosner, M.H., Ammirati, M.J., Simons, S.P., Schulte, G.K., Tate, B.F., DaSilva-Jardine, P. (2003). Discovery of a novel series of 6azauracil-based thyroid hormone receptor ligands: potent, TR beta subtype-selective thyromimetics. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **13**(3), 379-382.
- [42] Ye, L., Li, Y.-L., Mellström, K., Mellin, C., Bladh, L.-G., Koehler, K., Garg, N., Collazo, A. M. G., Litten, C., Husman, B., Persson, K., Ljunggren, J., Grover, G., Sleph, P. G., George, R., Malm, J., (2003). Thyroid receptor ligands. 1. Agonist ligands selective for the thyroid receptor beta1. *J. Med. Chem.* 46(9), 1580-1588.

2. Técnicas Físicas e

Computacionais

2.1 Modelagem molecular por homologia

2.1.1 Dificuldades teóricas e abordagens ao problema de modelagem molecular

Tão logo a incapacidade da mecânica newtoniana em descrever o comportamento de sistemas de dimensões atômicas foi suplantada pela bem-sucedida mecânica quântica, formulada de formas diferentes (mas equivalentes) por Werner Heisenberg e Erwin Schrödinger, outro problema considerável veio à tona: apesar da capacidade da teoria em prever importantes resultados experimentais com precisão, a utilização da mesma para sistemas minimamente mais complexos tornava-se impraticável por pura limitação matemática.

Adotando a formulação ondulatória de Schrödinger, um sistema submetido a um potencial V deve obedecer à equação que leva seu nome (escrita abaixo na forma independente do tempo):

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

Seja H um operador (chamado hamiltoniano) definido da seguinte forma:

$$H = \frac{-\hbar^2}{2m}\nabla^2 + V$$

podemos escrever a equação de Schrödinger como:

$$H\psi = E\psi$$

Essa é uma equação de auto-valor, e resolvê-la consiste, portanto, em encontrar as autofunções ψ (funções de onda) e os auto-valores E (energias possíveis do sistema, chamadas auto-energias) para os quais a equação é verdadeira dado o hamiltoniano do sistema.

Infelizmente, a equação de Schrödinger só pode ser resolvida de forma exata para poucos problemas, como aqueles tradicionalmente apresentados no início dos cursos de mecânica quântica: o de uma partícula movendo-se numa caixa, o oscilador harmônico e o átomo de hidrogênio.

Para sistemas de vários elétrons, resolver a equação de Schrödinger está muito longe de ser um problema trivial – ela não pode ser resolvida de forma exata nem mesmo para o átomo de hélio. Conclui-se de imediato, portanto, que valer-se da mecânica quântica para abordar o problema de obter a conformação nativa de uma proteína, sistema que envolve milhares de átomos, é impraticável.

Deve-se ressaltar, porém, que para a biologia estrutural a estrutura eletrônica não é objetivo primordial, e sim a conformação da cadeia peptídica. Desta forma, podem-se utilizar modelos empíricos como os campos de força, na técnica conhecida como mecânica molecular. A mecânica molecular é baseada em um modelo simples de interações, levando em conta a variação de comprimentos de ligação, aumento e diminuição de ângulos entre átomos e rotações em torno de ligações simples. Campos de força podem funcionar a contento mesmo quando essas contribuições são descritas por funções simples como a Lei de Hooke do oscilador harmônico simples.

A parametrização de um campo de força é feita de forma a otimizar os resultados para certa propriedade (em nosso caso, o interesse primordial são as propriedades estruturais, embora seja também possível reproduzir parâmetros espectroscópicos, por exemplo). É provável que a otimização para uma dada propriedade implique em perda de precisão para outra. As formas funcionais empregadas em mecânica molecular buscam, portanto, equilibrar precisão para a propriedade desejada e eficiência computacional.

A maioria dos campos de força para modelagem molecular possui pelo menos os seguintes componentes: penalidades energéticas para o desvio dos comprimentos e ângulos de ligação de seus valores de "equilíbrio" (aqueles medidos experimentalmente ou cuja determinação teórica é factível), uma função para descrever como varia a energia quando

ligações são rotacionadas e termos para descrever interações entre partes não ligadas do sistema. Para os primeiros são utilizados potenciais harmônicos em torno das citadas posições de equilíbrio, enquanto os últimos são geralmente modelados usando um termo para interações eletrostáticas e outro para interações de van der Waals.

Enquanto para interações eletrostáticas utiliza-se o potencial de Couloumb, o potencial mais utilizado para modelar interações de van der Waals é a função 12-6 de Lennard-Jones¹, que tem a seguinte forma para a interação entre dois átomos:

$$v(r) = 4\varepsilon \left[\left(\frac{\sigma}{r}\right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r}\right)^{6} \right]$$

 σ é chamado diâmetro colisional e dá a separação para a qual a energia é zero

 ϵ é a profundidade do poço de potencial.

A característica principal do potencial de Lennard-Jones é ter uma parte atrativa variando com r⁻⁶ e uma repulsiva com r⁻¹². Embora o termo em r⁻⁶ esteja de acordo com tratamentos teóricos como a formulação de Drude, não há argumentos a favor do termo em r⁻¹² – cálculos a partir da mecânica quântica sugerem uma forma exponencial (apud Leach, 2001²). Esse termo descreve bem gases nobres, mas torna-se mais abrupto para outros sistemas, o que não impede, porém, a vasta utilização desse potencial, visto que a diminuição de precisão é recompensada pelo ganho de eficiência computacional obtido ao calcular o termo em -12 rapidamente ao elevar o termo em -6 ao quadrado. A figura 2.1.1 descreve graficamente a forma do potencial 12-6 de Lennard-Jones.



Figura 2.1.1: À esquerda, os parâmetros $\sigma \in \varepsilon$ do potencial 12-6 de Lennard-Jones estão explicitados graficamente. O valor r_m corresponde à posição de equilíbrio. À direita, o gráfico do referido potencial, em verde, é mostrado conjuntamente com sua parte atrativa (em vermelho) e repulsiva (em azul).

Após a definição do campo de força, seus parâmetros devem ser determinados para cada combinação de átomos ou classe de moléculas. Não se trata de um processo simples, visto que os dados experimentais podem ser de difícil obtenção ou simplesmente não existirem. Recorrese, então, à mecânica quântica para suprir os dados necessários à parametrização dos campos de força usados em mecânica molecular. Lifson e Warchel³ utilizaram o método de mínimos quadrados na determinação de parâmetros ótimos para o ajuste de dados termodinâmicos, conformações de equilíbrio e freqüências vibracionais. Já Maple *et al.*⁴ desenvolveram um campo de força baseado em cálculos *ab initio* usando mecânica quântica.

A determinação da estrutura tridimensional de uma proteína tendo apenas o conhecimento de sua seqüência de aminoácidos é um problema sem solução imediata. A utilização da mecânica molecular é de considerável importância na abordagem de tal problema. Na seção seguinte, uma propriedade adicional das proteínas será utilizada para tratá-lo.

2.1.2 Modelagem por homologia

A técnica de modelagem molecular de proteínas conhecida como por modelagem por homologia ou modelagem comparativa consiste em explorar similaridades estruturais entre proteínas, construindo um modelo tridimensional a partir de uma ou mais estruturas conhecidas de proteínas relacionadas. Para isso, é necessário escolher criteriosamente a proteína molde – a similaridade següencial costuma ser um dos fatores mais importantes.

Chothia e Lesk⁵ guantificaram a relação entre similaridade de següência e de conformação tridimensional (estrutura terciária) interpolando valores de similaridade seqüencial e o desvio padrão da superposição das estruturas. Durante os testes iniciais da técnica de modelagem por homologia para o presente trabalho, uma série de modelagens automatizadas, através do servidor Swiss-Model⁶, foi testada para a família de receptores nucleares. Um dos domínios de tais proteínas, chamado LBD (do inglês ligand-binding domain, domínio de ligação ao ligante), possui enovelamento altamente conservado, consistindo numa forma globular composta principalmente por hélices-a. O processo consistiu em modelar cada LBD de receptor usando como modelo outros receptores com variados graus de identidade seqüencial, e verificar quão próximo eles estavam das estruturas determinadas cristalograficamente. Há uma tendência semelhante àquela verificada por Chothia e Lesk para comparação entre estruturas experimentais, como pode ser verificado na figura 2.1.2. Nesta figura, o gráfico à esquerda mostra os resultados de Chothia e Lesk, para o qual o desvio médio quadrático (Δ) para átomos da cadeia principal distantes não mais de 3Å um do outro (região denominada núcleo da proteína) está relacionada à fração de resíduos mutados (H) pela relação Δ =0.40e^{1.87H}. No gráfico à esquerda, são comparados os desvios médios quadráticos para átomos da cadeia principal de estruturas cristalográficas e modelos gerados por homologia com diferentes graus de identidade següencial.



Figura 2.1.2: À esquerda, é mostrada a relação entre identidade seqüencial e o desvio médio quadrático (*R.M.S.*) entre proteínas de estruturas determinadas experimentalmente, como verificado por Chothia & Lesk⁵. À direita, é mostrado um gráfico da variação do *R.M.S.* entre proteína modelada e estrutura experimental de acordo com a identidade seqüencial entre a proteína a ser modelada e aquela utilizada como molde.

O processo de modelagem por homologia consiste basicamente em cinco passos⁷:

- 1) Identificação de estruturas relacionadas
- 2) Escolha de um ou mais moldes
- 3) Alinhamento entre o molde e a proteína a ser modelada
- 4) Construção do modelo
- 5) Validação do modelo

Há duas classes de algoritmos dedicados ao alinhamento de seqüência, usados para objetivos distintos. Algoritmos como o de Needleman e Wunsch⁸ e o de Smith e Waterman⁹ produzem alinhamentos ótimos^{*} e costumam ser usados para o alinhamento de um número pequeno de seqüências – em geral quando a(s) proteína(s) molde já foram escolhidas. Se a

^{*} em Ciência da Computação, o termo "ótimo" costuma ser utilizado com dois significados. Quando, como no presente texto, ele se refere a soluções de problemas, ele indica não ser possível encontrar outra solução de melhor qualidade segundo o critério de comparação do algoritmo. Já um algoritmo ótimo é aquele capaz de resolver dado problema com o menor número de passos possível – formalmente, dizse que um algoritmo ótimo tem complexidade da ordem do limite inferior de passos para a resolução de um problema; intuitivamente, é aquele que apresenta a menor complexidade dentre todos os possíveis algoritmos para resolver o mesmo problema¹⁰.

decisão quanto à proteína molde a ser utilizada ainda não houver sido tomada, um procedimento comumente utilizado consiste em confrontar a seqüência da proteína que se deseja modelar com um banco de dados de seqüências – no caso, aquelas de estrutura conhecida, disponíveis para a comunidade acadêmica através do PDB – Protein Data Bank¹¹. Para tanto, são utilizados algoritmos aproximativos, como o BLAST¹² e o FASTA¹³. No processo de modelagem por homologia, geralmente se utilizam algoritmos aproximativos no passo um (identificação de estruturas relacionadas) e um algoritmo determinístico no passo três (alinhamento entre o molde e a proteína a ser modelada).

Uma vez que o alinhamento entre a(s) seqüência(s) da(s) proteína(s)-molde e daquela a ser modelada é determinado, prossegue-se para a geração do modelo, o que no presente caso foi feito através do programa Modeller¹⁴. Tal software utiliza restrições espaciais concomitantemente com otimização energética para produzir modelos.

Inicialmente, uma grande quantidade de restrições para distâncias e ángulos diédricos para a seqüência alvo é calculada através do seu alinhamento com a estrutura molde. Tais restrições são descritas como funções de densidade de probabilidade (pdfs - do inglês probability density functions), que podem ser modificadas pelo usuário caso seja desejável relaxar ou restringir tais parâmetros. O método utilizado para gerar tais restrições foi definido através de análise estatística de várias proteínas homólogas. As restrições espaciais são utilizadas em conjunto com termos energéticos do campo de força CHARMM¹⁵ para gerar uma única função a ser otimizada com através de dinâmica molecular utilizando a meta-heurística do recozimento simulado (do inglês *simulated annealing*, por vezes traduzido também como *têmpera simulada*).

Após a produção do modelo, é necessário ter critérios para julgar sua qualidade. O primeiro deles costuma ser o mapa de Ramachandran¹⁶, que mostra a distribuição dos ângulos torsionais $\varphi \in \psi$ para cada aminoácido. Há regiões energeticamente favoráveis para cada

34

resíduo, e a presença de um aminoácido fora dessas regiões indica um erro ou algum fenômeno não convencional naquele local, como uma interação forte causando deslocamento. Tais ângulos, entre outros parâmetros estereoquímicos, são verificados através do *software Procheck*¹⁷. A saída gráfica desse software para o mapa de Ramachandran é mostrada na Fig. 2.1.3.



Figura 2.1.3: O mapa de Ramachandran é uma importante ferramenta para validação de uma estrutura protéica. As regiões energeticamente favoráveis estão mostradas em cores, sendo aquelas em vermelho as mais prováveis. Em um bom modelo, seja provindo de dados experimentais ou produzido por modelagem, a grande maioria dos resíduos deve ter valores para $\varphi e \psi$ nessas regiões – é o caso do mapa da esquerda, referente à estrutura da serina-protease subtilisina, determinada à resolução de 0.78Å (código no PDB: 1GCI). A presença de um resíduo em regiões não-permitidas (em branco) pode indicar, por exemplo, uma distorção causada por uma interação forte. Já quando há um grande número de resíduos em tais regiões, é mais provável que o modelo tenha sido construído de forma errônea, ou, no caso de uma estrutura experimental, que o mapa de densidade eletrônica tenha sido mal interpretado. O mapa de Ramachandran à direita é da estrutura da α -bungarotoxina, determinada a 2.5Å (código no PDB: 2ABX).

O programa Verify3D^{18,19} julga a verossimilhança da vizinhança de cada aminoácido através de três propriedades: a área exposta ao solvente, a fração da área de cadeia lateral coberta por átomos polares e a estrutura secundária local. A combinação desses três parâmetros permite colocar o resíduo em uma de dezoito regiões, como mostrado na figura 2.1.4. Para cada tipo de resíduo há um escore que reflete a sua compatibilidade com tal região (definida previamente por análise estatística de proteínas de estrutura conhecida).



Figura 2.1.4: O programa Verify3D utiliza classifica o ambiente químico em oito regiões, de acordo com o valor da área enterrada e a fração da área da cadeia lateral coberta por átomos polares, como mostrado à direita. Além disso, há certa preferência dos resíduos por certas estruturas secundárias, o que multiplica as regiões por três (no caso do resíduo estar numa hélice-alfa, numa folha-beta, ou outra estrutura), resultando em dezoito possíveis regiões. Conjuntos de resíduos consecutivos são avaliados de acordo com a probabilidade de ocorrência nessas regiões, e o resultado é dado na forma gráfica, como mostrado à direita.

O software WHATCHECK²⁰ verifica uma larga gama de possíveis erros em estruturas tridimensionais modeladas ou experimentais, como atribuições não convencionais de célula unitária, valores do coeficiente de Matthews²¹ fora da faixa considerada aceitável, erros de nomenclatura, ausência de átomos, ângulos e distâncias de ligação, planaridade e ângulos torsionais de cadeias laterais, choques entre átomos, posicionamento de moléculas de água, pontes de hidrogênio, etc.

A utilização de métodos de validação de estrutura como os descritos acima permite produzir modelos de qualidade, que podem se mostrar úteis para certas perguntas biológicas. A modelagem por homologia costuma apresentar bons resultados, sendo capaz de prever estruturas com precisão comparável àquelas determinadas experimentalmente a baixa resolução²².

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Lennard-Jones, J. E. (1924). On the determination of molecular fields. II. From the equation of state of a gas. *Proc. R. Soc. Lond.* A106, 463-477.
- [2] Leach, A. R. (2001). *Molecular modeling: principles and applications, 2nd Edition*. Pearson Education Limited. Essex, England.
- [3] Lifson, S., Warshel, A. (1968). Consistent force field for calculation of conformations, vibrational spectra and enthalpies of cycloalkane and n-alkane molecules. *J. Chem. Phys.* 49, 5116-5129.
- [4] Maple, J. R., Dinur, U., Hagler, A. T. (1988). Derivation of force fields for molecular mechanics and molecular dynamics from *ab initio* energy surfaces. *PNAS*. **85**, 5350-5354.
- [5] Chothia, C., Lesk, A. M. (1986). The relation between the divergence of sequence and structure in proteins. *EMBO J.* 5(4), 823-826.
- [6] Guex, N., Peitsch, M. C. (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modelling. *Electrophoresis* 18, 2714-2723.
- [7] Fiser, A., Šali, A. (2003). Modeller: generation and refinement of homology-based protein structure models. *Methods in Enzymology* **374**, 461-491.
- [8] Needleman, S. B., Wunsch, C. D. (1970). A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequences of two proteins. *J. Mol. Biol.* 48, 443-453.
- [9] Smith, T. F., Waterman, M. S. (1981). Identification of common molecular subsequences. J. Mol. Biol. 265, 217-241.
- [10] Szwarcfiter, J. L., Markenzon, L. (1994). *Estruturas de dados e seus algoritmos*. Livros Técnicos e Científicos. Rio de Janeiro, Brasil.
- [11] Bernstein, F. C., Koetzle, T. F., Williams, G. J. B., Meyer, E., Bryce, M. D., Rogers, J. R., Kennard, O., Shikanouchi, T., Tasumi, M. (1977). The Protein Data Bank: a computer-based archival file for macromolecular structures. *J. Mol. Biol.* **112**, 535-542.

- [12] Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Anang, Z., Miller, W., Lipman, D. J. (1997).
 Gapped BLAST and PSI-BLST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.* 25, 3389-3402.
- [13] Pearson, W. R. (1990). Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA. *Methods in Enzymology* 183, 63-98.
- [14] Šali, A., Blundell, T. L. (1993). Comparative protein modeling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* 234, 779-815.
- [15] MacKerell Jr., A. D., Bashford D., Bellott M., Dunbrack Jr. R. L., Evanseck J. D., Field M. J., Fischer S., Gao J., Guo H., Ha S., Joseph-McCarthy D., Kuchnir L., Kuczera K., Lau F. T. K., Mattos C., Michnick S., Ngo T., Nguyen D. T., Prodhom B., Reiher III, W. E., Roux B., Schlenkrich M., Smith J. C., Stote R., Straub J., Watanabe M., Wiorkiewicz-Kuczera J., Yin D., Karplus M. (1963). All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *J. Phys. Chem. B* 102, 3586-3616.
- [16] Ramachandran G. N., Ramakrishnan C., Sasisekharan V. (1963). Stereochemistry of polypeptide chain configurations. J. Mol. Biol. 7, 95-99.
- [17] Laskowski R.A., MacArthur M.W., Moss D. S., Thornton, J. M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. J. Appl. Cryst. 26, 283-291.
- [18] Bowie J. U., Lüthy R., Eisenberg D. (1991). A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure. *Science* 253, 164-170.
- [19] Lüthy R., Bowie, J. U., Eisenberg, D. (1992). Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Nature* **356**, 83-85.
- [20] Hooft, R. W. W., Vriend, G., Sander, C., Abola, E. E. (1996). Errors in protein structures. *Nature* 381, 272-272.
- [21] Matthews, B. W. (1968). Solvent content of protein crystals. J. Mol. Biol. 33, 491-497.
- [22] Martí-Renom, M. A., Stuart, A., Fiser, A., Sánchez, R., Melo, F., Šali, A. (2000). Comparative protein structure modeling of genes and genomes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 29, 291-325.

2.2 Substituição molecular

2.2.1 Cristalografia de raios-x

A Cristalografia de Raios-X é uma poderosa ferramenta para determinação de estruturas e caracterização de materiais, cuja teoria vem sendo desenvolvida desde a observação do fenômeno da difração de raios-x em cristais por Max Von Laue, em experimento realizado conjuntamente com W. Friedrich e P. Knipping. Aplicando seus conhecimentos sobre a difração da luz por redes de uma e duas dimensões, Laue formulou uma teoria de difração de raios-x para estruturas tridimensionais (cristais) ainda em 1912, obtendo assim o prêmio Nobel de Física dois anos depois.

Nos textos introdutórios de cristalografia¹⁻³, é de praxe apresentar a teoria do espalhamento para um elétron, um átomo, uma célula unitária, e finalmente para um cristal. É apresentado o *fator de espalhamento atômico* (também conhecido como *fator de forma*) *f_i*, que denota a razão entre as amplitudes de espalhamento por um átomo e por um elétron isolado. Tal valor varia com o átomo e com o ângulo de espalhamento, e sua determinação precisa ainda é objeto de estudo⁴.

Para uma célula unitária, o espalhamento total devido a um plano *hkl* é dado por uma grandeza chamada *fator de estrutura* F(hkl), função dos fatores de espalhamento atômico f_i e das posições *xyz* dos átomos, como mostrado abaixo:

$$\mathbf{F}(hkl) = \sum_{j} f_{j} \exp[2\pi i (hx + ky + lz)]$$

Quando fazemos uma medida de difração de raios-x, coletamos diversos picos de difração, cuja intensidade é proporcional ao quadrado da amplitude do fator de estrutura, e desejamos obter a densidade eletrônica dentro de uma célula unitária. A densidade eletrônica $\rho(xyz)$ aparece explicitamente quando o fator de estrutura é dado na forma integral:

$$\mathbf{F}(hkl) = \int_{\substack{c \in lula\\unit a \\ unit a \\ ia}} \rho(xyz) \exp[2\pi i (hx + ky + lz)] dV$$

Fazendo a transformada de Fourier inversa do fator de estrutura, podemos expressar a densidade eletrônica da seguinte forma:

$$\rho(xyz) = \frac{1}{V} \sum_{h} \sum_{k} \sum_{l} \mathbf{F}(hkl) \exp\left[-2\pi i (hx + ky + lz)\right]$$

Por ser uma grandeza complexa, *F*(*hkl*) pode ser escrito como /*F*/*exp[iα*], e assim temos:

$$\rho(xyz) = \frac{1}{V} \sum_{h} \sum_{k} \sum_{l} |\mathbf{F}(hkl)| \exp\left[-2\pi i(hx + ky + lz) + i\alpha(hkl)\right]$$

A determinação da densidade eletrônica, portanto, depende apenas do conhecimento prévio de uma quantidade suficiente de fatores de estrutura. A informação experimental obtida de um padrão de difração, porém, é incompleta. Enquanto os módulos do fator de estrutura |F(hkl)| podem ser obtidos das intensidades dos picos de difração, as fases $\alpha(hkl)$ não estão disponíveis experimentalmente. Este é o *problema das fases*, que a princípio parecia ser um obstáculo intransponível para a cristalografia. As primeiras determinações de estruturas cristalinas envolviam princípios geométricos e métodos de tentativa e erro⁵⁻⁹. Porém, para moléculas maiores, tais métodos eram impraticáveis. Métodos de substituição isomorfa foram tentados¹⁰, mas poucos compostos cristalizavam como pares isomorfos, e dessa forma apenas estruturas simples eram resolvidas, o que causava grande frustração pelo fato de haver muitos cristais de estruturas mais complexas que difratavam muito bem.

2.2.2 A função de Patterson

Debruçando-se sobre esse problema e consultando especialistas na teoria de Fourier, A. L. Patterson demarcou um dos grandes momentos da ciência cristalográfica ao propor, em 1934, sua "série em |F|²", hoje conhecida como *Função de Patterson*¹¹. O advento desta função permitiu obter informações de grande valia a respeito da estrutura cristalina sem a necessidade das fases, e é usada em larga escala até os dias de hoje.

A função de Patterson é definida como a convolução da densidade eletrônica com ela mesma, invertida com respeito à origem:

$$P(u) = \rho(r) * \rho(-r) = \int_{S} \rho(r)\rho(u+r)dr$$

Ou, explicitando as três dimensões e o volume da célula unitária V:

$$P(uvw) = \left(\frac{1}{V}\right) \int \int \int \rho(x, y, z) \rho(x+u, y+v, z+w) dx dy dz$$

A transformada de Fourier dessa função é $|F(hkl)|^2$, e, portanto, ela pode ser construída utilizando apenas os módulos dos fatores de estruturas, obtidos experimentalmente das intensidades dos picos de difração, como no somatório de Fourier mostrado abaixo:

$$P(uvw) = \sum_{hkl} |F_{hkl}|^2 \cos 2\pi (hu + kv + lw)$$

Dada a representação na forma de integral da função de Patterson, podemos verificar que P(uvw) apresentará máximos sempre que houver átomos nos pontos (x, y, z) e (x+u, y+v, z+w); isto é, quando o vetor (u, v, w) representar a distância vetorial entre dois átomos. A altura desse pico será proporcional ao produto dos números atômicos dos dois átomos em cada extremidade do vetor. Se há N átomos na estrutura, teremos N² vetores interatômicos, e portanto N² picos no mapa de Patterson, dos quais N estão na origem e representam o vetor que liga um átomo a ele mesmo. A figura 2.2.1 mostra um mapa de Patterson teórico para uma estrutura simples.



Figura 2.2.1: Uma distribuição simples em uma rede de duas dimensões (esquerda) e seu correspondente mapa de Patterson (direita).

Em estruturas de proteínas, em que o número de átomos é da ordem de 10³, o número de vetores é da ordem de 10⁶, e dessa forma os mapas de Patterson de cristais de proteínas não podem ser interpretados diretamente. Ainda assim, a função de Patterson tem valor incomensurável em cristalografia de proteínas. O mais óbvio é a localização de átomos pesados em sua estrutura – como proteínas são compostas primordialmente por átomos leves como carbono, hidrogênio e oxigênio, a presença de átomos pesados produzirá picos de intensidade diferenciada no mapa de Patterson. Dessa forma, tornou-se útil a introdução de átomos pesados em estruturas de difícil determinação, caso dos cristais de proteínas. O cálculo da função de Patterson será de grande valia no método conhecido como *substituição molecular*, como será visto na próxima seção.

2.2.3 Substituição molecular

O processo de resolução de uma estrutura de macromolécula envolve a obtenção de um modelo inicial e seu subseqüente refinamento, de forma a minimizar a diferença entre os dados teóricos e experimentais (geralmente quantificados pelos fatores de estruturas calculados do modelo e aqueles obtidos experimentalmente). Dentre os métodos comumente utilizados para gerar (ou obter) as fases dos fatores de estrutura e assim produzir um modelo inicial, o método da substituição molecular é muito provavelmente o que mais rapidamente leva a esse objetivo, embora a sua eficácia dependa da existência de uma proteína de estrutura similar àquela que se deseja resolver.

O princípio básico da substituição molecular envolve inicialmente o alinhamento das funções de Patterson para a proteína modelo, de estrutura conhecida, e da proteína a ser resolvida. Para a primeira, a função é construída utilizando a formulação integral – visto que a densidade eletrônica para todo o espaço na célula unitária pode ser calculada com uma tabela de átomos e suas coordenadas. Já para a segunda, utiliza-se os módulos dos fatores de estrutura, informação obtida experimentalmente após a coleta e processamento dos dados de difração de raios-x. O mapa de Patterson, como visto na seção anterior, é uma coletânea de vetores interatômicos. Entre átomos na mesma molécula, temos vetores interatômicos (chamados também de "*self-Patterson vectors*") relativamente curtos, com suas extremidades não muito longe da origem. Na ausência de vetores intermoleculares ("*cross-Patterson vectors*"), a região interna do mapa de Patterson será muito parecida para proteínas de estrutura semelhante, exceto por uma rotação apropriada. Se uma das funções for mantida fixa e a outra for rotacionada, podemos encontrar a orientação correta quando houver a maior concordância entre os dois mapas. Michael Rossmann e David Blow¹² abordaram esse problema partindo de uma *função sobreposição*, mostrada abaixo:

$$R = \iiint_{U} \rho(x_{1}, x_{2}, x_{3}) \rho(x'_{1}, x'_{2}, x'_{3}) dx_{1} dx_{2} dx_{3}$$

Tal função, quando calculada para um dado volume U, tende claramente a fornecer valores altos quando a densidade eletrônica em (x_1, x_2, x_3) for igual ou semelhante à de (x'_1, x'_2, x'_3) , produzidos por rotação. Após a expansão da densidade eletrônica ρ em série de Fourier, obtém-se a seguinte expressão para a função sobreposição:

$$R = \sum_{\mathbf{h}} \left[\left| F_{\mathbf{h}} \right|^2 \left\{ \sum_{\mathbf{p}} \left| F_{\mathbf{p}} \right|^2 G \right\} \right]$$

G é uma *função interferência*, que tem valores altos apenas quando o ponto **p** no espaço recíproco é trazido para as proximidades de **h** por rotação. Deve-se ressaltar que tal função utiliza como coeficientes apenas os quadrados dos módulos dos fatores de estrutura, possibilitando, como esperado, obter a correta rotação para alinhamento utilizando apenas as intensidades experimentais dos picos de difração para a molécula a ser resolvida.

O passo subseqüente na substituição molecular é obter a translação. Ela pode ser obtida por tentativa e erro, movendo a molécula conhecida pela assimétrica, calculando os módulos dos fatores de estrutura e comparando-os com aqueles obtidos experimentalmente. O método de Crowther e Blow¹³, implementado comumente até os dias de hoje, consiste em sobrepor o mapa de Patterson do cristal observado e o conjunto de vetores de Patterson intermoleculares na estrutura modelo. Para duas moléculas 0 e 1, tal conjunto pode ser escrito como:

$$P_{01}(\mathbf{u}) = \int_{V} \rho_0(\mathbf{x}) \rho_1(\mathbf{x} + \mathbf{u}) d\mathbf{x}$$

chamando de *t* o vetor translação que leva um ponto de 0 ao ponto equivalente em 1, pode-se definir a translação como função de tal vetor:

$$T(\mathbf{t}) = \int_{V} P_{01}(\mathbf{u}, \mathbf{t}) P(\mathbf{u}) d\mathbf{u}$$

Dessa forma, quando *t* se aproxima do vetor intermolecular, há correlação entre a construção da função de Patterson para vetores intermoleculares P_{01} e a função de Patterson observada P, resultando num grande valor positivo para T. Após expansão em série de Fourier da função de Patterson e apropriadas manipulações matemáticas, obtém-se a seguinte expressão para a função T:

$$T(\mathbf{t}) = \sum_{\mathbf{h}} I_{obs}(\mathbf{h}) F_M(\mathbf{h}) F_M^*(\mathbf{h}\mathbf{A}) \exp(-2\pi i \mathbf{h}\mathbf{t})$$

Onde **A** é a matriz relativa a uma dada operação de simetria.

Dessa forma, a correlação entre um conjunto de vetores intermoleculares para uma estrutura modelo M e a função de Patterson observada pode ser calculada por uma série de Fourier cujos coeficientes podem ser computados facilmente.

Após as duas etapas (e se possível também entre as duas), a orientação deve ser ajustada por um método de otimização de forma a produzir o melhor modelo inicial. Atualmente, a substituição molecular é o método mais rápido de gerar o primeiro modelo de uma estrutura cristalográfica.

2.2.4 Refinamento

Após a obtenção de um modelo inicial, é necessário *refiná-lo*. Após uma substituição molecular, isso implica em modificar o modelo de forma a refletir a proteína que se deseja resolver, o que geralmente envolve a modificação, inserção e/ou exclusão de resíduos, e o seu ajuste ao mapa de densidade eletrônica. Idealmente, deve ser possível explicar toda a densidade eletrônica observada, que será preenchida não apenas pela proteína, mas por moléculas de água ordenadas (comuns na superfície da proteína), ligantes, e demais compostos presentes na solução de cristalização.

Para o refinamento são utilizados programas que manipulam diretamente o modelo, e métodos de otimização para ajuste fino entre modelo e densidade eletrônica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] Cullity, B. D. (1956). *Elements of x-ray diffraction, 2nd Edition*. Addison-Wesley Publishing Company, Inc. Reading, USA.

- [2] Blundell, T. L., Johnson, L. N. (1976). *Protein Crystallography.* Academic Press, Inc. London, England.
- [3] Drenth, J. (1994). *Principles of protein x-ray crystallography*. Springer-Verlag New York, Inc. New York, USA.
- [4] Su, Z., Coppens, P. (1997). Relativistic X-ray Elastic Scattering Factors for Neutral Atoms Z
 = 1-54 from Multiconfiguration Dirac-Fock Wavefunctions in the 0-12Å⁻¹ sinθ/λ Range, and Six-Gaussian Analytical Expressions in the 0-6Å⁻¹ Range. *Acta Cryst.* **A53**(6), 749-762.
- [5] Bragg, W. L. (1913). The structure of some crystals as indicated by their diffraction of xrays. *Proc. Roy. Soc.* A89, 248-277.
- [6] Bragg, W. H., Bragg, W. L. (1913). The structure of diamond. Nature 91, 557.
- [7] Bernal, J. D. (1924). The structure of graphite. Proc. Roy. Soc. A106, 749-773.
- [8] Lonsdale, K. (1929). The structure of benzene ring in C₆(CH₃)₆. *Proc. Roy. Soc.* A123, 494-515.
- [9] Lonsdale, K. (1931). An x-ray analysis of the structure of hexachlorobenzene using the Fourier method. Proc. Roy. Soc. A133, 536-552.
- [10] Bernal, J. D., Crowfoot, D. (1934). X-ray photographs of crystalline pepsin. *Nature* A123, 494-515.
- [11] Patterson, A. L. (1934). A Fourier series method for the determination of the components of interatomic distances in crystals. *Phys. Rev* 46, 372-376.
- [12] Rossmann, M. G., Blow, D. M. (1962). The detection of sub-units within the crystallographic asymmetric unit. *Acta Crystallogr.* **15**, 24-31.
- [13] Crowther, R. A., Blow, D. M. (1967). A method of positioning a known molecule in an unknown crystal structure. Acta Crystallogr. 15, 23-544-548.

3. Materiais e Métodos

3.1 Modelagem molecular da TBG

3.1.1 Objetos de estudo

A técnica de modelagem por homologia foi aplicada para quatro casos:

1) TBG selvagem

2) Mutante K332Xfs: deleção de uma base no códon que codificaria para lisina na posição 332, resultando em uma mutação por deslocamento no quadro de leitura (*frame shift*), resultando na síntese de mais 42 aminoácidos sem relação com a seqüência original.

3) Mutante Q223X: fim prematuro no resíduo 223 devido ao surgimento de um códon de parada.

4) Mutante S61C: troca de uma serina por cisteína na posição 61, além da presença do polimorfismo L283F, que isoladamente não causa efeito aparente na molécula¹.

3.1.2 Escolha da proteína molde

A escolha da proteína molde para a modelagem da TBG não é um problema trivial. O critério padrão, de preferência pela estrutura disponível de maior grau de homologia, não deve ser seguido cegamente, em especial para o nosso caso, devido a dois importantes fatores relativos à TBG:

1) Ausência de análogo funcional com estrutura resolvida

A grande maioria das serpinas possui atividade inibitória (daí o nome da família), o que se reflete na quantidade de estruturas resolvidas até a presente data. A proteína mais próxima da TBG em estrutura e função é provavelmente a CBG (do inglês *corticosteroid-binding globulin*), que também possui a propriedade de carrear hormônio e cuja seqüência de resíduos também a classifica como serpina. Ela também não possui estrutura tridimensional resolvida,

mas uma discussão a respeito da ligação e mecanismo de liberação de hormônio foi recentemente publicada valendo-se também da modelagem por homologia usando serpinas inibitórias como molde².

2) Existência de diferentes conformações para as proteínas de sua família

Como descrito na seção 1.2, a TBG é incluída, por critérios de identidade seqüencial, na superfamília das serpinas, proteínas caracterizadas por apresentarem consideráveis mudanças conformacionais devidas à sua atividade. Deve-se, portanto, escolher como molde uma proteína cristalizada em sua forma nativa para modelar a TBG não-clivada. A α1-anti-tripsina é considerada arquétipo estrutural da família das serpinas³ e foi resolvida em sua forma nativa. Por conseguinte, ela é utilizada para modelar inclusive serpinas não inibitórias como a TBG⁴ e a CBG².

3) Evidências da existência de pontes dissulfeto na TBG

Estudos bioquímicos feitos por Gershengorn *et al.*⁵ indicam que a TBG possui duas pontes dissulfeto. A interpretação dessa informação torna-se difícil com a utilização da antitripsina como molde, visto que tal proteína possui apenas um resíduo de cisteína, sem alinhamento aparente com qualquer uma das cisteínas da TBG. Dessa forma, pode ser útil valer-se também da estrutura da anti-trombina, que possui três pontes dissulfeto. O alinhamento de seqüência da TBG, da α 1-anti-tripsina e da anti-trombina é mostrada na figura 3.1.1.

	1									100
TBG	М	SPFLYLVLLV	LGLHATIHCA	SPEGKVTACH	SSQPNATLYK	MSSINADFAF	NLYRRFTVET	PDK-NIFFSP	VSISAALVML	SFGACCSTQT
ANTI-TRIPS			MDPQG	DAAQ <mark>K</mark> TDTS <mark>H</mark>	HDQDHP T FNK	ITPNLAEFAF	SLYRQLAHQS	NST-NIFFSP	VSIATAFAML	SLG TKADTHD
ANTI-TROMB	HGSPVDICTA	KP RDIPMNPM	CIYRSPEKKA	TEDEGSEQKI	PEATNRRVWE	LSKANSRFAT	TF Y QH LA DSK	NDNDNIFLSP	LSISTAFAMT	K LGA CNDTLQ
Consenso		.p	a	$\ldots .k \ldots .h$	q.n.tk	.sna.FAf	.lYr.la	ndNIFfSP	vSIstAfaMl	slGac.dT
	101									200
TBG	EIVETLGFN-	LTDTPMVEIQ	HGFQHLICSL	-NFPKKELEL	QIGNALFIGK	HLKPLAKFLN	DVKTLYETEV	FSTDFS-NIS	AAKQEINSHV	EMQTKGKVVG
ANTI-TRIPS	EILEGLNFN-	LTEIPEAQIH	EGFQELLRTL	-NQPDSQLQL	TTGNGLFLSE	GLKLVDKFLE	DVKKLYHSEA	FTVNFG-DTE	EAKKQINDYV	EKGTQGKIVD
ANTI-TROMB	QLMEVFKFDT	ISEKTSDQIH	FFFAKLNCRL	YRKANKSSKL	VSANRLFGDK	SLTFNETYQD	ISELVYGAKL	QPLDFKENAE	QSRAAINKWV	SNKTEGRITD
Consenso	#i.E.l.F#.	lt#.p#Ih	.gFq.L.c.L	.n.p.k.l.L	gN.LFk	.Lkk%l#	dvk.lYe.	f#F#.e	.akINV	eT.Gk!vd
	2.0.1									200
TDC	ZUI ODIKDN	TTMUT UNIVITI	EKA ONA NDED	DOWTEDCCCE	TTORTTHOU	DMMUOMEOVY	UT VEMPT NOT	UI OMDVERNA		COMPRIENT
ANTT TOTOC	LI-QUERPN	TUEALUNITE	FRAGWARFED	VEDTEERD F	UVDOVTTVEV	PMMHQMEQII DMMKDI CMEN	TOUCKELEENCI	VLQMDISKNA	TATEFIDD F	GUMESVEARM
ANTI TROMP	LVRELDRD	TUINITIY	FRGRWERFFE	DENTREEP-F	KADC ECCEA	CMMYOECKED	VDDUARCTOU	LEIDEKCODI	TATEF LFD-E	GREQUEENEL
ANTI-IROMB	VIFSEAINEL	TVLVLVNIII	FRGLWRSRFS	PENIKKELPI	RADG-ESCOR	SMMIQEGRER	IKKVALGIQV	TELFFKGDDI	THVLILERE	COLARVEREL
Consenso	1:	IV.VLVNYI.	rkg.wpr.	pe	Dv	pres.q.g.s.	er	viim.y#a	La.I.BFK.E	9.9VE.e9
	301									400
TBG	SSKTLKKWNR	LLOKGWVDLF	VPKESTSATY	DIGATLIKMG	TOHAYS-ENA	DESGLITEDN-	-GLKLSNAAH	KAVLHIGEKG	TEAAAVPEVE	LSDOPENTEL
ANTI-TRIPS	THDITIKELE	NEDRRSASLH	LPKLSTTGTY	DLKSVLGOLG	TTKVFS-NGA	DLSGVTEEA-	-PLKLSKAVH	KAVLTIDEKG	TEAAGAMELE	ATPMST
ANTI-TROMB	TPEVLOEWLD	ELEEMMLVVH	MPRERIEDGE	SLKEOLODMG	LVDLESPEKS	KLPGTVAEGR	DDLYVSDAFH	KAFLEVNEEG	SEAAASTAVV	TAGRSLNP-N
Consenso	tl.kwl.	.1#1h	.PkfsTt%	dLk. L. SG	i%S.#.a	dlsG.te#		KAVL. !. EkG	tEAAave	s.n
	401			434						
TBG	HPIIQIDRSF	MLLILERSTR	SILFLGKVVN	PTEA						
ANTI-TRIPS	PPEVKFNKPF	VFLMIEQNTK	SPLFMGKVVN	PTQK						
ANTI-TROMB	RVTFKANRPF	LVF I R <mark>E</mark> VPLN	TIIFMGRVAN	PCVK						
Consenso	.p.,k.#rpF		silF\$GkVvN	Pt.k						

Figura 3.1.1: Alinhamento de seqüência entre a TBG, a α1-anti-tripsina e a anti-trombina, produzido pelo programa Multalin⁶. Resíduos de cisteína são mostrados em verde.

Dessa forma, a estrutura da anti-tripsina resolvida a 2.0Å por Elliot *et al.*⁷ foi utilizada para modelar a proteína selvagem e os mutantes K332Xfs e Q223X, enquanto a da anti-trombina resolvida a 2.6Å por Skinner *et al.*⁸ foi utilizada para o mutante S61C, onde há o surgimento de uma cisteína adicional.

3.1.3 A questão da glicosilação

A TBG apresenta ligação covalente com quatro heterossacarídeos, caracterizados por Zinn *et al.*⁹ Optamos por não modelar tais cadeias, visto que a ligação ao hormônio tireoidiano, a microheterogeneidade e a imunorreatividade da TBG deglicosilada é idêntica à da TBG selvagem^{10,11}. Os sítios de glicosilação, porém, podem ser previstos utilizando programas que identificam as seqüências que os determinam, e foram localizados para avaliar possíveis interferências devido a mutações. Tal precaução se deve ao fato de existir uma mutação conhecida, implicando em deficiência parcial de TBG, cujo motivo da falha na secreção da proteína foi atribuído à criação de um sítio adicional, que de fato é glicosilado¹².

3.1.4 Produção, validação e análise dos modelos

Para cada uma das quatro construções (TBG-N, TBG-K332Xfs, TBG-Q223X e TBG-S61C), cem modelos foram gerados utilizando o programa *Modeller*¹³. O método utilizado para a modelagem foi a randomização inicial das coordenadas do modelo e sua conseqüente otimização. As coordenadas cartesianas foram deslocadas de até 4Å, e selecionou-se o grau máximo de otimização para os modelos. O critério de seleção para escolha do melhores modelos para cada caso foram a função energética gerada pelo programa e a qualidade do mapa de Ramachandran¹⁴, gerado pelo programa *Procheck*¹⁵ – dentre os dez modelos com menor energia gerado, selecionou-se aquele com melhor mapa de Ramachandran (escolhendo o de energia mais baixa no caso de haver mais de um modelo com quantidades iguais de resíduos fora das regiões favoráveis). Informações adicionais a respeito da qualidade dos modelos foram verificadas utilizando os programas *WHATCHECK*¹⁶ e *Verify3D*^{17,18}, descritos na seção 2.1.2. A análise dos modelos foi feita valendo-se dos programas gráficos *O*¹⁹ e *Swiss-PDBViewer*²⁰, sendo as figuras ilustrativas produzidas pelo software *Pymof*²¹.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Refetoff, S. (1989). Inherited thyroxine-binding globulin abnormalities in man. *Endocr. Rev.* 10(3), 275-293.
- [2] Dey, R., Roychowdhury, P. (2003). Homology model of human corticosteroid binding globulin: a study of its steroid binding ability and a plausible mechanism of steroid hormone release at the site of inflammation. *J. Mol. Model.* **9**(3), 183-189.

- [3] Huber, R., Carrell, R. W. (1989). Implications of the three-dimensional structure of alpha 1antitrypsin for structure and function of serpins. *Biochemistry* **28**(23), 8951-8966.
- [4] Jarvis, J. A., Munro, S. L. A., Craik, D. J. (1992). Homology model of thyroxine binding globulin and elucidation of the thyroid-hormone binding-site. *PEDS* 5(1), 61-67.
- [5] Gershengorn, M. C., Cheng, S.-Y., Lippoldt, R. E., Lord, R. S., Robbins, J. (1977). Characterization of human thyroxine-binding globulin. *J. Biol. Chem.* **252**(23), 8713-8718.
- [6] Corpet, F. (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl. Acids Res.* 16(22), 10881-10890.
- [7] Elliott, P. R., Pei, X. Y., Dafforn, T., Lomas, D. A. (2000). Topography of a 2.0Å Structure of Alpha1-Antitrypsin Reveals Targets for Rational Drug Design to Prevent Conformational Disease. *Protein Sci.* 9(7), 1274-1281.
- [8] Skinner, R., Abrahams, J. P., Whisstock, J. C., Lesk, A. M., Carrell, R. W., Wardell, M. R. (1997). The 2.6Å structure of antithrombin indicates a conformational change at the heparin binding site. *J. Mol. Biol.* 266(3), 601-609.
- [9] Zinn, A. B., Marshall, J. S., Carlson, D. M. (1978). Preparation of glycopeptides and oligosaccharides from thyroxine-binding globulin. *J. Biol. Chem.* **253**, 6768-6773.
- [10] Murata, Y., Magner, J. A., Refetoff, S. (1986). The role of glycosylation in the molecular conformation and secretion of thyroxine-binding globulin. *Endocrinology* **118**, 1614-1621.
- [11] Grimaldi, S., Lio, S., Iacovacci, P., Carlini, F., Monaco, F., Roche, J. (1986). Polymorphisme de la globuline du serum humain fixant la thyroxine TBG; existence d'une forme nouvelle de protéine sérique sans pouvoir fixateur décelable de triiodothyronine. *C. R. Soc. Biol.* 180, 277-283.
- [12] Kambe, F., Seo, H., Mori, Y., Murata, Y., Janssen, O. E., Refetoff, S., Matsui, N. (1992). An additional carbohydrate chain in the variant thyroxine-binding globulin-Gary (TBG^{Asn-96}) impairs its secretion. *Mol. Endocrinol.* 6(3), 443-449.

- [13] Šali, A., Blundell, T. L. (1993). Comparative protein modeling by satisfaction of spatial restraints. J. Mol. Biol. 234, 779-815.
- [14] Ramachandran G. N., Ramakrishnan C., Sasisekharan V. (1963). Stereochemistry of Polypeptide Chain Configurations. *J. Mol. Biol.* 7, 95-99.
- [15] Laskowski R. A., MacArthur M. W., Moss D. S., Thornton, J. M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.* 26, 283-291.
- [16] Hooft, R. W. W., Vriend, G., Sander, C., Abola, E. E. (1996). Errors in protein structures. *Nature* 381, 272-272.
- [17] Bowie J. U., Lüthy R., Eisenberg D. (1991). A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure. *Science* 253, 164-170.
- [18] Lüthy R., Bowie, J. U., Eisenberg, D. (1992). Assessment of protein models with threedimensional profiles. *Nature* **356**, 83-85.
- [19] Jones, T. A., Zou, J. Y., Cowan, S. W., Kjeldgaard, M. (1991). Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Cryst.* A47(2), 110-119.
- [20] Guex, N., Peitsch, M. C. (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18, 2714-2723.
- [21] DeLano, W. L. (2002). The PyMol Molecular Graphics System. DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA. http://www.pymol.org

3.2 Resolução das estruturas dos LBDs de hTRα e hTRβ com GC-1

3.2.1 Cristalização e resolução de estrutura do hTRα-LBD

Os cristais de hTRα-LBD ligados GC-1 foram crescidos no Grupo de Cristalografia do Instituto de Física como parte dos estudos de doutorado do aluno Fábio M. Nunes, sendo a fase de resolução estrutural auxiliada pelo aluno de pós-doutorado Ricardo Aparício e seu supervisor. Os dados referentes à cristalização, que ocorre sob as mesmas condições que o complexo hTRα-LBD cristalizados com T₃, foram publicados em 2004¹. O resumo dos dados a respeito da estrutura refinada encontra-se na tabela abaixo.

Grupo espacial	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (19)
Dimensões da célula unitária (Å)	a=59.914 b=80.351 c=102.886
Resolução máxima (Å)	1.85
Resolução mínima (Å)	43.44
R _{factor}	0.15
R _{free}	0.19
Total de reflexões	40931
Reflexões teste	2172 (5%)
Completeza	100%

Tabela 3.2.1: Parâmetros da estrutura refinada do hTRα-LBD com GC-1.

3.2.2 Cristalização do hTRβ-LBD e coleta de dados

A cristalização do domínio LBD do hTR β ligado ao GC-1 foi efetuada também no Grupo de Cristalografia do Instituto de Física de São Carlos como parte dos estudos de doutorado da aluna Sandra Martha G. Dias, estando os dados referentes à cristalização da proteína descritos em sua tese de doutorado². Setenta imagens foram coletadas, com passo ($\Delta \phi$) de um grau, num total de 96227 reflexões totais, sendo 11297 únicas. Foram encontradas, porém, dificuldades para o refinamento da estrutura após o processamento dos dados e a substituição molecular. Para o presente trabalho, o conjunto de dados foi reprocessado utilizando o pacote de programas *HKL*³, seguindo-se a substituição molecular e refinamento do modelo.

3.2.3 Processamento dos dados e substituição molecular

Os resultados e estatísticas da indexação, integração e escalonamento do conjunto de dados estão mostrados na tabela abaixo:

Grupo espacial	P3 ₁ 21
Dimensões da célula unitária (Å)	a=b=68.996 c=130.862
Resolução máxima (Å)	2.55
Resolução mínima (Å)	59.8
Mosaicidade (°)	0.44
Reflexões únicas	11297
Completeza	96.9%
R _{sym} (camada externa)	4.8% (50%)
I/σ (camada externa)	17.9 (2.3)

Tabela 3.2.2: Dados cristalográficos referentes ao hTRβ-LBD com GC-1.

O escalonamento foi feito utilizando dez camadas de resolução. Após o processamento dos dados, foi feito o cálculo do volume de Matthews⁴ para estimar a quantidade de cadeias na unidade assimétrica, obtendo-se o resultado de um monômero.

A substituição molecular mostrou-se trivial, visto que já existiam estruturas conhecidas da mesma proteína, mas com diferentes ligantes². Obteve-se uma única solução utilizando o programa *AMoRe*⁵.

3.2.4 Refinamento

O modelo inicial foi refinado alternando modificações manuais, usando os programas O^6 e $Coot^7$, e ciclos de refinamento através do programa Refmac⁸. A estrutura apresentou uma região desordenada entre os resíduos Ala55 até Lys63, que não pôde ser modelada. O modelo consistiu, então, dos resíduos 1-54 e 64-247, 36 moléculas de água e o ligante GC-1. As estatísticas finais estão mostradas na tabela 3.2.3.

Reflexões únicas para o R _{free}	591 (5%)
R _{factor}	20%
R _{free}	27.6%
R.M.S.D para comprimentos de ligação (Å)	0.03
R.M.S.D para ângulos de ligação (°)	3.08

Tabela 3.2.3: Estatísticas finais para a estrutura do hTRβ-LBD com GC-1.

Na figura 3.2.1, podemos ver o sítio de ligação do hTRβ e o GC-1, como vistos no

modelo cristalográfico final obtido após o refinamento.



Figura 3.2.1: Detalhe do sítio de ligação do hTRβ como visto na estrutura cristalográfica refinada para o presente trabalho. O GC-1, mostrado em amarelo (oxigênios em vermelho), está circundado pela densidade eletrônica experimental, em laranja.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Nunes, F. M., Aparicio, R., Santos, M. A. M., Portugal, R. V., Dias, S. M. G., Neves, F. A. R., Simeoni, L. A., Baxter, J. D., Webb, P., Polikarpov, I. (2004). Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of isoform alpha1 of the human thyroid hormone receptor ligandbinding domain. *Acta Crystallogr.* D60(10), 1867-1870.
- [2] Dias, S. M. G. (2004). Estudos estruturais dos receptors nucleares humanos dos hormônios tireoidianos isoforma β1 (hTRβ1) e do ácido retinóico 9-cis isoforma α (hRXRα). Tese

(Doutorado em Física Aplicada), Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo.

- [3] Otwinowski, Z., Minor, W. (1997). Processing of x-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol.* 276, 307-326.
- [4] Matthews, B. W. (1968). Solvent content of protein crystals. J. Mol. Biol. 33(2), 491-497.
- [5] Navaza, J. (2001). Implementation of molecular replacement in AMoRe. *Acta Crystallogr*.D57(10), 1367-1372.
- [6] Jones, T. A., Zou, J. Y., Cowan, S. W., Kjeldgaard, M. (1991). Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallogr.* A47(2), 110-119.
- [7] Emsley, P., Cowtan, K. (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics. Acta Crystallogr. D60, 2126-2132.
- [8] Murshudov, G. N., Vagin, A. A., Dodson, E. J. (1997). Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Cryst.* D53(3), 240-255.

4. Resultados e Discussão

4.1 A TBG e mutantes ocorrentes no Brasil

4.1.1 TBG-CD causada por mutantes recém-descritos no Brasil

Até o presente, quinze diferentes mutações causadoras da deficiência completa da TBG (*TBG-CD*) foram reportadas, sendo a maioria delas causadas por mutações pontuais originando substituição de resíduo ou proteínas truncadas, levando à falha na sua secreção. Em recente estudo envolvendo famílias brasileiras¹, foram detectadas três mutações responsáveis pela TBG-CD, sendo duas inéditas. Nesse estudo, quatro brasileiros do sexo masculino de cidades diferentes e famílias aparentemente não relacionadas tiveram o diagnóstico da TBG-CD pelo seguinte quadro: funcionamento tireoidiano normal, baixo valor total de T₄ sérico, níveis normais de T₄ livre e TSH, e ausência da TBG com base em ensaio com sensibilidade de 0.8mg/l. Pacientes e parentes tiverem seus níveis de T₄ total, T₄ livre, TSH e TBG medidos, e DNA isolado e amplificado para seqüenciamento. Cem outros brasileiros escolhidos aleatoriamente tiveram seu gene codificante para a TBG seqüenciado para comparação.

Em duas das famílias estudadas encontrou-se a mutação K332Xfs, na qual uma deleção no códon 332 do éxon 4 do gene da TBG gera uma mudança do quadro de leitura, resultando em 42 aminoácidos incorretos, com a porção C-terminal 21 resíduos mais curta. Tal mutação não foi encontrada no conjunto-teste de cem indivíduos.

Em outra família foi encontrada a mutação S61C, causada por uma mudança de base (4560C>G), associada ao polimorfismo L283F, que individualmente não causa falha detectável na proteína secretada². A freqüência do polimorfismo L283F é de 17% na população brasileira.

Finalmente, a quarta família apresentava a mutação Q223X, causada pela mudança de base 6095C>T, que gera um códon de parada. Essa mutação já havia sido descrita em Portugal³.

No presente trabalho, modelos tridimensionais da TBG selvagem e dos supracitados mutantes foram gerados através da técnica de modelagem por homologia, como descrito na seção 3.1, com o objetivo de discutir as causas da inviabilidade das proteínas mutantes, que de acordo com os testes efetuados não são detectáveis no soro, provavelmente devido à falha na secreção.

4.1.2 Modelo da proteína selvagem

O modelo da TBG em sua forma selvagem se apresenta em um enovelamento α/β , como esperado para as estruturas conhecidas de serpinas. Dois estudos a respeito da relação entre estruturas secundárias da TBG foram conduzidos utilizando a técnica de dicroísmo circular (*CD*, do inglês *circular dichroism*). De acordo com Gershengorn *et al.*⁴, aproximadamente metade dos resíduos da TBG estão divididos em fitas- β e hélices- α . Segundo Raouf *et al.*⁵, a TBG possui 24% de resíduos em fitas- β , e a mesma quantidade em hélices- α . No modelo gerado com a serpina α 1-anti-tripsina, 27% dos 395 resíduos encontram-se em hélices- α e 31% em fitas- β . O modelo e seu mapa de Ramachandran estão mostrados na figura 4.1.1.



Figura 4.1.1: Modelo da TBG selvagem e seu mapa de Ramachandran. No modelo, à esquerda, são mostradas em azul as regiões com baixo escore de ambiente químico de acordo com o programa *Verify3D*. No mapa de Ramachandran, à direita, está assinalado o resíduo LYS243, que se encontra fora das regiões favoráveis do mapa.
No mapa de Ramachandran, um único resíduo aparece fora das regiões favoráveis. Trata-se da lisina 243, cujo resíduo correspondente na anti-tripsina é uma glicina. A substituição de um resíduo sem cadeia lateral por outro de tamanho considerável provavelmente implicará em uma mudança local nos ângulos $\varphi \in \psi$, que o programa de modelagem pode não ter construído com sucesso.

Embora o programa *Whatcheck* não tenha fornecido informações de interesse para a discussão do modelo, servindo apenas como ferramenta de validação, o oposto ocorreu quando da avaliação do modelo pelo programa *Verify3D*. O modelo da TBG selvagem apresenta duas seqüências de resíduos com baixos escores, o que encoraja uma inspeção dessas duas regiões. Ao analisar a saída do mesmo programa para a proteína molde, verifica-se que esta também possui uma seqüência de baixos escores, que coincide com uma das regiões ocorrentes no modelo. Trata-se do RSL, *loop* reativo característico das serpinas que, devido ao seu próprio mecanismo de ação, tende a ser instável quando exposto ao solvente, caso da conformação da anti-tripsina na estrutura utilizada.

Já a segunda região, quando analisada através de um programa gráfico (ver Figura 4.1.1), revela-se localizada na região de encontro das três folhas-β da proteína, onde, supõe-se, está o sítio de ligação de hormônio tireoidiano⁶. Tais resultados são compatíveis com a idéia de que a TBG assemelha-se a uma serpina metaestável passível de mudança de conformação quando da ligação do hormônio⁷. A comparação das saídas do programa *Verify3D* para a anti-tripsina em seu estado nativo e para o modelo da TBG são mostrados na figura 4.1.2.

61



Figura 4.1.2: Gráfico da variação resíduo a resíduo do escore calculado pelo programa *Verify3D* para a proteína molde α1-antitripsina (esquerda) e para o modelo da TBG (direita).

4.1.3 Modelagem dos mutantes

O modelo do mutante K332Xfs, juntamente com seu mapa de Ramachandran está mostrado na figura 4.1.3.



Figura 4.1.3: Modelo do mutante K332Xfs (esquerda) e seu mapa de Ramachandran (direita). A seqüência marcada em cinza corresponde àquela cujos resíduos foram trocados devido à mudança do quadro de leitura a partir do resíduo 332 (em azul).

É pouco provável que o mutante consiga se enovelar como mostrado no modelo, visto que uma grande quantidade de resíduos que deveriam formar fitas-β (mostradas em cinza) está trocada devido à natureza da mutação (mudança do quadro de leitura). Isso se reflete na análise dos escores gerados pelo programa Verify3D, mostrados na figura 4.1.4.



Figura 4.1.4: Gráfico da variação resíduo a resíduo do escore calculado pelo programa *Verify3D* para o modelo do mutante K332Xfs.

Fingerhut *et al.*⁸ verificaram que mutações por mudança de quadro de leitura invariavelmente devem levar à TBG-CD, visto que a região C-terminal da proteína é parte de seu núcleo e portanto mesmo pequenas deleções afetariam o enovelamento da proteína, causando sua degradação no retículo endoplasmático.

No caso do mutante Q223X, a inviabilidade da proteína resultante é evidente. A figura abaixo mostra seu modelo e mapa de Ramachandran.



Figura 4.1.5: Modelo do mutante Q223X (esquerda) e seu mapa de Ramachandran (direita).

No caso desse mutante, o enovelamento da proteína torna-se impraticável, dada a falta da maior parte dos resíduos que formam suas folhas-β.

O levantamento de hipóteses para a inviabilidade do mutante S61C, porém, não é tão direto como nos casos anteriores. O modelo de tal mutante e seu mapa de Ramachandran podem ser vistos na figura abaixo.



Figura 4.1.6: Modelo do mutante S61C (esquerda) e seu mapa de Ramachandran (direita). Na figura do modelo, os resíduos marcados em azul correspondem à mutação S61C (esquerda) e ao polimorfismo L283F (direita).

As duas substituições são distantes em estrutura primária e terciária, e no caso da troca S61C o tamanho das cadeias laterais dos resíduos é comparável. Também não há mudança aparente no escore de empacotamento, como visto no gráfico para os escores gerados pelo programa *Verify3D*, mostrado abaixo.



Figura 4.1.7: Escores resíduo a resíduo para o mutante S61C.

Há registro de um mutante da TBG onde a inviabilidade da proteína é atribuída à criação de um novo sítio de N-glicosilação, que de fato é glicosilado gerando uma proteína aberrante⁹. Por esse motivo, investigou-se a existência de uma possível interferência da mutação nos sítios de glicosilação e a possível geração de um novo sítio de glicosilação na proteína, o que também não se confirmou.

A análise do modelo na região da mutação revela, porém, uma possível causa para a inviabilidade da proteína. A cisteína 61, adveniente da mutação, deve ter proximidade física com pelo menos dois outros resíduos de cisteína, como mostrado na figura 4.1.8.



Figura 4.1.8: Detalhe da região do modelo onde ocorre a mutação S61C.

Desta forma, uma possível explicação para a impossibilidade da detecção deste mutante no soro seria a possibilidade de formação errônea de pontes dissulfeto nessa região, resultando em enovelamento incorreto e, por conseguinte, falha na secreção da proteína.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andreoni, D. M., Bleicher, L., Guimarães, G. S., Carvalho, G. A., Vieira, J. G. H., Cerutti, J. M., Polikarpov, I., Maciel, R. M. B. (2005). Novel mutations causing complete T4-binding globulin deficiency (TBG-CD): clinical, molecular and structural aspects. *J. Clin. Endoc. Metab.* (submetido para publicação).
- [2] Refetoff, S., Murata, Y., Mori, Y., Janssen, O. E., Takeda, K., Hayashi, Y. (1996). Thyroxinebinding globulin: organization of the gene and variants. *Horm. Res.* 45(3-5), 128-138.
 Erratum: *Horm. Res.* 46(1), 37.
- [3] Domingues, R., Bugalho, M. J., Garrão, A., Boavida, J. M., Sobrinho, L. (2002). Two novel variants in the thyroxine-binding globulin (TBG) gene behind the diagnosis of TBG deficiency. *Eur. J. Endocrinol.* **146**, 485-490.
- [4] Gershengorn, M. C., Cheng, S. Y., Lippoldt, R. E., Lord, R. S., Robbins, J. (1977). Characterization of human thyroxine-binding globulin. Evidence for a single polypeptide chain. J. Bio. Chem. 253(23), 8713-8718.
- [5] Raouf, A. A., Geisow, M. J., O'Gorman, P., Marsden, P., Howorth, P. J. (1980). A method for the preparation of human thyroxine-binding globulin; its importance in the establishment of an accurate and specific radioimmunoassay. *Clin. Chim. Acta.* **104**(1), 25-41.
- [6] Buettner, C., Grasberger, H., Hermansdorfer, K., Chen, B., Treske, B., Janssen, O. E. (1999). Characterization of the thyroxine-binding site of thyroxine-binding globulin by sitedirected mutagenesis. *Mol. Endocrinol.* **13**(11), 1864-1872.
- [7] Suda, S. A., Gettins, P. G. W., Patston, P. A. (2000). Linkage between the hormone binding site and the reactive center loop of thyroxine binding globulin. *Arch. Biochem. Biophys.* 384(1), 31-36.

- [8] Fingerhut, A., Reutrakul, S., Knuedeler, S. D., Moeller, L. C., Greenlee, C., Refetoff, S., Janssen, O. E. (2004). Partial deficiency of thyroxine-binding globulin-Allentown is due to a mutation in the signal peptide. *J. Clin. Endoc. Metab.* **89**(5), 2477-2483.
- [9] Kambe, F., Seo, H., Mori, Y., Murata, Y., Janssen, O. E., Refetoff, S., Matsui, N. (1992). An additional carbohydrate chain in the variant thyroxine-binding globulin-Gary (TBG^{Asn-96}) impairs its secretion. *Mol. Endocrinol.* 6(3), 443-449.

4.2 A seletividade do tiromimético GC-1

4.2.1 Ligação do composto à proteína

A molécula de GC-1 liga-se ao sítio pela combinação de interações hidrofóbicas e duas regiões envolvendo pontes de hidrogênio, como descrito na seção 1.3.5. Sobrepondo as duas estruturas, é possível inferir a respeito das regiões da proteína e do ligante envolvidas na seletividade. A figura 4.2.1 mostra as duas estruturas sobrepostas no sítio de ligação.



Figura 4.2.1: Sobreposição dos sítios ativos para o hTRα (magenta) e hTRβ (verde).

Não são observadas diferenças consideráveis na região próxima ao grupo fenol – exceto pelos resíduos Met388/242 e Phe401/255, que apresentam algumas mudanças nos ângulos torsionais, as orientações das cadeias laterais dos resíduos é conservada. O mesmo ocorre na região central, onde apenas a metionina 259/113 e a isoleucina 222//76 apresentam mudanças perceptíveis de orientação. Na terceira região, porém, há diferenças evidentes para as duas estruturas. No hTRβ, uma arginina da hélice 3 e duas da hélice 6 estão orientadas na direção

do grupo carboxil do ligante, e as interações envolvendo tais resíduos de arginina e o grupo ácido do GC-1 são mediados por moléculas de água.

No hTRα, o esquema de ligações apresenta diferenças consideráveis. Em primeiro lugar, o oxigênio éter da molécula do GC-1 forma uma ponte de hidrogênio com o resíduo Ser277, que existe apenas no hTRα. Há também uma ponte de hidrogênio entre a carbonila da cadeia principal do resíduo Ile221 e a hidroxila da Ser277, interação que não poderia acontecer no hTRβ, que tem uma asparagina na posição equivalente. Essas interações deslocam o resíduo Ser277 de 1.64Å quando comparado ao hTRα ligado ao T₃. Tal deslocamento, e também o tamanho reduzido da serina quando comparada à asparagina, provê espaço para uma conformação alternativa da arginina 228 orientada na direção da serina 277, e portanto distanciando-se do grupo carboxil do GC-1. Nas figuras abaixo são mostradas as diferenças de ligação para as duas isoformas.



Figura 4.2.2: Esquema de ligação do GC-1 para o hTR α (magenta) na conformação produtiva, sobreposto à estrutura do hTR β (verde).



Figura 4.2.3: Esquema de ligação do GC-1 para o hTR α (magenta) na conformação não-produtiva, sobreposto à estrutura do hTR β (verde).

Na primeira figura, a primeira configuração de proteína e ligante para o hTR α é sobreposta ao hTR β . A única diferença relevante são as interações entre o ligante e o resíduo Ser277 e entre este resíduo e o lle221, mostradas em tracejado. As interações com os resíduos de arginina são mediadas por moléculas de águas, que tem posições bem conservadas nas duas isoformas e, na figura, são mostradas para a isoforma α . Pode ser vista nessa conformação uma molécula de água com ocupância 0.5 fora do sítio ativo. Na segunda figura, é mostrada a conformação alternativa em que se apresentam a proteína e o ligante na estrutura do hTR α , novamente sobrepostos à isoforma β . Um resíduo de arginina (Arg228) desloca-se para longe do ligante fazendo uma nova interação (novamente mostrada em tracejado) com a proteína no resíduo Ser277. Por conseqüência, o ligante também apresenta mudança de conformação no grupo carboxil para o hTR α e a molécula de água que se encontrava fora do sítio desloca-se para dentro do mesmo, mediando a ligação entre ligante e proteína.



Figura 4.2.4: Visualização esquemática das interações entre o hTR α e o ligante GC-1 na conformação produtiva (esquerda), e entre o hTR β e o mesmo ligante (direita). Os átomos e resíduos mostrados com traços vermelhos estão relacionados a interações hidrofóbicas.



Figura 4.2.5: Interações entre o hTRα e o ligante GC-1 na conformação não-produtiva.

A existência, para o hTRα, de um modo de ligação alternativo de caráter não produtivo, explica a diferença de afinidade entre o composto para as duas isoformas.

4.2.2 Comparação com outros tiromiméticos β-seletivos

A ligação de um tiromimético sem o oxigênio éter citado às duas isoformas do hTR foi descrita recentemente¹. Como esperado, não se mantém o esquema geral de ligação descrito para o GC-1. Ao contrário deste, para o qual há dois modos de ligação claramente diferentes para as duas isoformas, as estruturas do hTR α e do hTR β ligados ao [4-(4-hydroxy-3-isopropy/phenoxy)-3,5-dimethy/pheny/]acetic acid mostram pouquíssimas diferenças visíveis. A ponte de hidrogênio envolvendo o resíduo variante (Ser277 no hTR α e Asn331 no hTR β) e o ligante está presente nas duas estruturas, mas conectando o NH da cadeia principal e o grupo carboxil do ligante. Além disso, uma ponte de hidrogênio conectando os citados resíduos e uma arginina direcionada ao grupo carboxil do ligante também está presente nas duas isoformas. Para este ligante, apenas o deslocamento da arginina causada pelo tamanho maior da asparagina quando comparada à serina pode ser considerada a causa principal da seletividade do ligante.

Em artigo publicado por Yoshihara *et al.*², são mostrados resultados referentes a uma série de tiromiméticos, incluindo o GC-1. A tabela abaixo compara a taxa de seletividade entre os compostos e a presença do oxigênio carboxílico.

Composto	Seletividade	Oxigênio éter
GC-1	10±2	Presente
Ether-bridged GC-1	10±2	Presente
Propionic acid GC-1	4.5±0.6	Ausente
Methylene-bridged GC-1	2.3±0.3	Ausente
DIMIT	2.0±0.3	Ausente

Tabela 4.2.1: Comparação entre tiromiméticos seletivos e a presença do oxigênio éter.

Observa-se que os compostos com maiores seletividades foram aqueles com o átomo de oxigênio na posição descrita para o GC-1, o que leva a especular-se ser ele de grande

importância para o desenvolvimento de compostos β-seletivos para o receptor do hormônio tireoidiano.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ye, L., Li, Y.-L., Mellström, K., Mellin, C., Bladh, L.-G., Koehler, K., Garg, N., Collazo, A. M. G., Litten, C., Husman, B., Persson, K., Ljunggren, J., Grover, G., Sleph, P. G., George, R., Malm, J. (2003). Thyroid receptor ligands. 1. Agonist ligands selective for the thyroid receptor beta1. *J. Med. Chem.* **46**(9), 1580-1588.
- [2] Yoshihara, H. A. I., Apriletti, J. W., Baxter, J. D., Scanlan, T. S. (2003). Structural determinants of selective thyromimetics. *J. Med. Chem.* 46(14), 3152-3161.

5. Conclusões

5 Conclusões

Aspectos estruturais da globulina de ligação à tiroxina (TBG) foram analisados através da técnica computacional de modelagem por homologia. Foram construídos modelos para a proteína em sua forma selvagem e para três mutantes encontrados em famílias brasileiras que apresentavam casos de deficiência completa da TBG (*TBG-CD*). A análise do modelo da proteína em sua forma selvagem apresentou novos indícios da localização de seu sítio de ligação entre as três folhas-β e da possibilidade de mudança conformacional característica das serpinas inibitórias. Para os mutantes, foram verificados os aspectos estruturais relacionados à inviabilidade de tais proteínas, não detectáveis no soro dos pacientes que apresentam a mutação. Para dois dos mutantes (K332Xfs e Q223X) é evidente a impossibilidade de enovelamento correto, enquanto para o terceiro (S61C associado ao polimorfismo L283F) pôde-se apenas conjeturar a respeito de sua inviabilidade relacionando-a a uma possível interação indesejável entre a cisteína adveniente da mutação com uma dentre outras próximas fisicamente, gerando falha no correto enovelamento da proteína.

O conjunto de dados coletado para o cristal de hTR β ligado ao tiromimético GC-1 foi reprocessado, teve suas fases geradas pelo método da substituição molecular, e em seguida o modelo refinado. A comparação dessa estrutura cristalográfica com aquela obtida para o hTR α ligado ao GC-1 permitiu estudar a propriedade β -seletiva de tal composto. Foi possível verificar que o esquema de ligação entre proteína e ligante tem diferenças consideráveis entre as duas isoformas, sendo a ligação entre GC-1 e hTR α caracterizada pela existência de duas conformações para o ligante e para o resíduo Arg228, envolvido na fixação do tiromimético no sítio ativo. Uma das conformações é bastante semelhante à ligação do composto à isoforma β , enquanto a outra é claramente não produtiva, explicando a diferença em afinidade do composto para as duas isoformas.

O mecanismo de β -seletividade do GC-1 aparenta estar fortemente relacionado à existência de um oxigênio éter, inexistente nos hormônios tireoidianos T₃ e T₄. Tal fato, aliado a outros dados publicados a respeito de tiromiméticos com e sem tal átomo sugere ser essa modificação um interessante caminho a ser explorado no planejamento racional de ligantes para o receptor tireoidiano.

Livros Grátis

(<u>http://www.livrosgratis.com.br</u>)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração Baixar livros de Agronomia Baixar livros de Arquitetura Baixar livros de Artes Baixar livros de Astronomia Baixar livros de Biologia Geral Baixar livros de Ciência da Computação Baixar livros de Ciência da Informação Baixar livros de Ciência Política Baixar livros de Ciências da Saúde Baixar livros de Comunicação Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE Baixar livros de Defesa civil Baixar livros de Direito Baixar livros de Direitos humanos Baixar livros de Economia Baixar livros de Economia Doméstica Baixar livros de Educação Baixar livros de Educação - Trânsito Baixar livros de Educação Física Baixar livros de Engenharia Aeroespacial Baixar livros de Farmácia Baixar livros de Filosofia Baixar livros de Física Baixar livros de Geociências Baixar livros de Geografia Baixar livros de História Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura Baixar livros de Literatura de Cordel Baixar livros de Literatura Infantil Baixar livros de Matemática Baixar livros de Medicina Baixar livros de Medicina Veterinária Baixar livros de Meio Ambiente Baixar livros de Meteorologia Baixar Monografias e TCC Baixar livros Multidisciplinar Baixar livros de Música Baixar livros de Psicologia Baixar livros de Química Baixar livros de Saúde Coletiva Baixar livros de Servico Social Baixar livros de Sociologia Baixar livros de Teologia Baixar livros de Trabalho Baixar livros de Turismo