

-

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Faculdade de Farmácia
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

**Reconhecimento nucléico por domínios peptídicos
mínimos planejados a partir de receptores nucleares**

Guilherme dos Santos Mulé

Rio de Janeiro
2009

M954r Mulé, Guilherme dos Santos.

Reconhecimento nucléico por domínios peptídicos mínimos planejados a partir de receptores nucleares/ Guilherme dos Santos Mulé. – Rio de Janeiro: UFRJ / Faculdade de Farmácia, 57 p. il. 31 cm.

Orientador: Luís Maurício Trambaioli da Rocha Lima

Dissertação (mestrado) – UFRJ / Faculdade de Farmácia / Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2009.

Referências Bibliográficas: f. 49 - 57.

1. Reconhecimento nucléico específico. 2. Receptores nucleares. 3. Peptídeo. 4. Anisotropia. I. Lima, Luís Maurício Trambaioli da Rocha. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. III. Reconhecimento nucléico por domínios peptídicos mínimos planejados a partir de receptores nucleares.

CDD615.10724

-
GUILHERME DOS SANTOS MULÉ

Reconhecimento nucléico por domínios peptídicos mínimos planejados a partir de receptores nucleares.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Luís Maurício Trambaioli da Rocha e Lima
Co-orientador: Prof. Dr. Igor Polikarpov

**Rio de Janeiro
2009**

-

GUILHERME DOS SANTOS MULÉ

Reconhecimento nucléico por domínios peptídicos mínimos planejados a partir de receptores nucleares.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador:

Prof. Dr. Luís Maurício Trambaioli da Rocha e Lima
Faculdade de Farmácia – UFRJ

Co-orientador:

Prof. Dr. Igor Polikarpov
Instituto de Física de São Carlos – USP

Banca examinadora:

Prof. Dr. Álvaro Augusto da Costa Leitão - Instituto de Biofísica (IBCCF) - UFRJ

Prof. Dr. Carlos Rangel Rodrigues - Faculdade de Farmácia - UFRJ

Profa. Dra. Gisela Maria Dellamora Ortiz - Faculdade de Farmácia - UFRJ

AGRADECIMENTOS

À Dr^a. Gisela Dellamora Ortiz (coordenadora da Pós-Graduação) pela amizade, carinho e dedicação, principalmente nos momentos mais difíceis.

Ao Diretor da Faculdade de Farmácia Carlos Rangel por me apoiar e sempre querer o melhor para seus alunos.

Aos meus pais, meus irmãos, pelo amor, carinho e incentivo em todas as horas, além de serem grandes exemplos de caráter e sabedoria.

Ao meu amigo Daniel por ser tão companheiro, amigo e por sua ajuda em assuntos que domina.

Aos amigos Arthur, Zé, Fábio por todos os momentos de alegria.

Às amigas Érica, Bárbara, Monique e Ana Karla por todos os momentos de alegria.

A todos os amigos do LabCQ: Adriana, Joana, Vivian, Maria Tereza, Yara, Tailane, Fernanda, Júlia, Professora Valéria, Professora Sheila, Eliane, Bianca.

À professora Dr^a. Yraima, pela ajuda e por estar sempre disposta a ajudar.

À CAPES, pela Bolsa de Mestrado.

-

Ao meu orientador, professor Dr. Luis Maurício Trambaioli da Rocha e Lima, pela oportunidade de realizar um projeto de mestrado.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRJ pelos ensinamentos que me permitiram elaborar este trabalho de pesquisa.

-

À minha esposa Laís que, além de excelente esposa,
é um exemplo de profissionalismo, paciência e
amor para qualquer pessoa.

Ela incentivou-me e ajudou-me a cumprir esta fase.

Esta dissertação é dedicada a ela.

RESUMO

O reconhecimento molecular específico é um processo complexo que envolve a exata disposição espacial de funções químicas capazes de interagir com grupos complementares. Estas interações, que são caracterizadas por interações hidrofóbicas, interações eletrostáticas, ligações hidrogênio, ligações hidrogênio mediadas por moléculas de água, interações de Van der Waals e, por vezes, rearranjos conformacionais, estão dispostas em uma pequena região denominada sítio de reconhecimento, mesmo em proteínas de grandes dimensões.

Esta característica do reconhecimento específico, por exemplo, de um receptor nuclear com o DNA, ocorre através de uma pequena região, o que nos leva a uma condição de desenhar potenciais ligantes seletivos aos alvos em questão e, principalmente, ao DNA.

Como esta característica já foi observada investigando-se mecanismos de reconhecimento nucléico pela proteína E2 de papilomavírus, torna-se bastante importante explorar outros sistemas. Para isso, usamos regiões mínimas, chamadas alfa-hélices de reconhecimento, de receptores nucleares do hormônio da tireóide e do ácido retinóico responsáveis pela interação com o DNA através de sequências de bases específicas para esses receptores (elementos responsivos).

Essa interação foi avaliada através de peptídeos sintéticos correspondentes à alfa-hélice de reconhecimento nucléico responsáveis pelo contato específico com as bases do DNA e oligonucleotídeos sintéticos contendo sequências específicas (AGGTCA) e não específicas. A avaliação dessa possível interação foi monitorada, em diferentes concentrações de sal (NaCl), através de anisotropia de fluorescência.

Os dados obtidos mostraram que a especificidade de reconhecimento não foi observada neste sistema, uma vez que as interações ocorreram tanto em moléculas de DNA específicas como em não específicas de maneira muito semelhante. No entanto, os dois peptídeos analisados apresentaram nítida diferença de reconhecimento de todas as moléculas de DNA.

-

ABSTRACT

Specific molecular recognition is a complex process, involving the exact spatial arrangement of chemical groups able to interact with complementary roles. These interactions, which are characterized by hydrophobic interactions, electrostatic interactions, hydrogen bonds, hydrogen bonds mediated by water molecules, Van der Waals interactions and sometimes conformational rearrangements, are arranged in a small region named region of recognition, even when it concerns a protein of large dimensions. This characteristic of specific recognition, for example, a receiver with the nuclear DNA, occurs through a small region in a condition that leads us to draw potential selective binding targets and mainly concerned to DNA.

Since this feature has been observed when were investigated the mechanisms of nucleic recognition by the E2 protein of HPV, for example, it is very important to explore other systems.

To do this, we used minimal regions called alpha-helix for recognition of nuclear receptors of thyroid hormone and the retinoic acid, responsible for interaction with the DNA sequences through specific receptors (responsive elements). This recognition was assessed through synthetic peptides corresponding to the alpha-helix of nucleic recognition responsible for specific contact with the DNA bases and synthetic oligonucleotides containing both specific and non specific sequences (AGGTCA). The assessment of interaction was monitored at different concentrations of salt (NaCl) using fluorescence anisotropy.

The data showed that the specificity of recognition was not observed in this system, since the interactions occurred similarly both in DNA with specific and non specific sequence. However the two peptides showed clear differences in recognition of DNA.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Representação da cadeia de DNA.	18
Figura 2 - Diagrama da dinâmica de estados protéicos com DNA (LIMA & SILVA, 2004).	21
Figura 3 - Esquema representando alfa-hélice de reconhecimento RXR em DNA's DR1 e DR2 (Figura gerada pelo programa PyMol).	24
Figura 4 - Esquema representando alfa-hélice de reconhecimento α TR, em ângulos diferentes, à um DNA DR4 (Figura gerada pelo programa PyMol).	25
Figura 5 - Visão esquemática dos receptores nucleares. N-term: região amino-terminal; DBD: domínio de ligação ao DNA; LBD: domínio ligação ao ligante (Adaptada de ARANDA & PASCUAL, 2001).	30
Figura 6 - Teoria Anisotropia de Fluorescência (Adaptado de BEACON, 1995).	36
Figura 7 - Análise estrutural das proteína TR complexada a DNA cognato.	39
Figura 8 - Análise estrutural das proteína RXR complexada a DNA cognato.	39
Figura 9 - Bases de reconhecimento específicos dos receptores TR e RXR (RASTINEJAD, <i>et al.</i> , 1995).	41
Figura 10 - Posição e disposição dos polarizadores durante ensaio de anisotropia.	42
Figura 11 - Ligação de α TR com DNA's específicos.	48
Figura 12 - Ligação α RXR com DNA's específicos.	48
Figura 13 - Ligação α TR com DNA's não específicos.	49
Figura 14 - Ligação α TR DNA's específicos e não específicos.	49
Figura 15 - Ligação α TR com DNA's específicos e não específicos.	50
Figura 16- Ligação α RXR com DNA's específicos e não específicos.	51
Figura 17 - α TR interação com DNA's específicos e não específicos em diferentes concentrações de NaCl (10 mM, 20 mM e 50 mM).	53
Figura 18 - Dissociação da interação α TR / DNA com aumento da concentração de NaCl.	55
Figura 19 - Dissociação da interação α TR / DNA com o aumento da concentração de NaCl.	56
Figura 20- Dissociação da interação α RXR / DNA com o aumento da concentração de NaCl.	56
Figura 21 - Comparação entre TR e RXR interagindo com DNA's específicos e não específicos em concentração de 10	58

mM de NaCl.

Figura 22 - Estruturas químicas da lisina e arginina.	59
Figura 23 - Estruturas químicas da isoleucina e valina.	60
Figura 24 - Estruturas químicas da arginina e glutamina	61

-

LISTA DE QUADROS

	Página
Quadro 1 – Elementos responsivos de alguns receptores nucleares	32
Quadro 2 – Concentrações finais usadas na preparação da solução mix	44
Quadro 3 – Concentrações finais usadas na preparação da solução da cubeta	44
Quadro 4 – Concentrações finais da solução preparada na cubeta	45
Quadro 5 – Concentrações finais da solução mix2	46

LISTA DE SIGLAS

A – Adenina.

AR – Receptor nuclear de androgênios.

C – Citosina.

DBD – Domínio de ligação ao DNA (sigla do inglês *DNA Binding Domain*).

DNA – Ácido desoxirribonucléico.

DR – Sigla do inglês *direct repeats*.

DTT – 1,4-Ditiotreitol.

ER – Receptor nuclear de estrogênios.

F2 – Palíndromo invertido.

G - Guanina

GR – Receptor nuclear de glicocorticóides.

Hepes – Ácido N-(2-Hidróxietil)-piperazine-N'-2-etanosulfônico.

HREs – Sigla do inglês *Hormone Responsive Elements*.

LBD – Domínio de ligação do ligante (sigla do inglês *Ligand Binding Domain*).

MR – Receptor nuclear de mineralocorticóides.

NaCl – Cloreto de sódio.

NR – Receptores nucleares.

RE - Elementos responsivos (sigla do inglês *responsive elements*).

PNAs – Sigla do inglês *Peptides nucleic acids*.

PPAR – Sigla do inglês *Peroxisome proliferator-activated receptor*.

PR – Receptor nuclear de progesterona.

RAR – Receptor nuclear de ácido retinóico.

RNA – Ácido ribonucléico.

RNAi – RNA inibitório.

RXR – Receptor nuclear do ácido 9-cis retinóico.

T - Timina

TH - Hormônios tireoidianos.

TR – Receptor nuclear do hormônio da tireóide.

TRE – DNA palíndromo.

TREs – Sigla do inglês *thyroid hormone response elements*.

U – Uracila.

-

VDR – Receptor nuclear de vitamina D.

α TR - alfa-hélice de reconhecimento nucléico da proteína receptora de hormônio tireoideano.

α RXR - hélice de reconhecimento nucléico da proteína receptora de 9-cis-retinóide.

α E2 – alfa-hélice de reconhecimento nucléico da proteína E2 de papilomavírus.

-

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	16
1.1 A MOLÉCULA DE DNA	16
1.2 BASES MOLECULARES E ESTRUTURAIS DO RECONHECIMENTO NUCLEICO ESPECÍFICO E CONTEXTO LOCAL	19
1.2.1 Interações Eletrostáticas	22
1.3 DETERMINAR AS BASES ESTRUTURAIS E MOLECULARES DA INTERAÇÃO ENTRE $\alpha E2$, αTR E αRXR COM SEUS CONSENSOS NUCLÉICOS	23
1.4 PEPTÍDEOS COMO POTÊNCIAIS TERAPÊUTICOS	25
1.5 RECEPTORES NUCLEARES	27
1.5.1 A superfamília dos receptores nucleares	28
1.5.2 Estrutura geral dos receptores nucleares	29
1.5.3 Ligação dos receptores nucleares ao DNA	30
1.5.4 Os receptores nucleares de hormônios tireoidianos, (TRs)	33
1.5.5 Receptor X de retinóide, (RXR)	34
1.6 ANISOTROPIA DE FLUORESCÊNCIA	35
2 OBJETIVOS	37
2.1 OBJETIVOS GERAIS	37
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
3 METODOLOGIA	38
3.1 PEPTÍDEOS SINTÉTICOS	38
3.2 OLIGONUCLEOTÍDEOS SINTÉTICOS	40
3.3 LIGAÇÃO A OLIGONUCLEOTÍDEOS	41
3.4 ANISOTROPIA DE FLUORESCÊNCIA DE FLUORESCÉINA	41
3.5 ANÁLISE TITULOMÉTRICA DE INTERAÇÃO PEPTÍDEO:DNA	43
3.6 ANÁLISE TITULOMÉTRICA DE DISSOCIAÇÃO PEPTÍDEO:DNA PELA ADIÇÃO DE NaCl	44
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5 CONCLUSÕES	62
6 PERSPECTIVAS	63
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

1 INTRODUÇÃO

1.1 A MOLÉCULA DE DNA

O ácido desoxirribonucléico (DNA) é um composto orgânico cujas moléculas contêm as informações genéticas que coordenam o desenvolvimento e funcionamento de todos os seres vivos. O seu principal papel é armazenar as informações necessárias para a construção das proteínas a partir de RNAs. Os segmentos de DNA que são responsáveis por carregar a informação genética são denominados genes. O restante da sequência de DNA tem importância estrutural ou está envolvido na regulação do uso da informação genética (ALBERTS *et al.*, 1997).

A estrutura da molécula de DNA foi descoberta conjuntamente por James Watson e Francis Crick em 1953, o que lhes valeu o Prémio Nobel de Fisiologia ou Medicina em 1962, juntamente com Maurice Wilkins (WATSON & CRICK, 1953).

Do ponto de vista químico, o DNA é um longo polímero de unidades simples, monômeros de nucleotídeos, cujo cerne é formado por açúcares e fosfato intercalados unidos por ligações fosfodiéster. Ligada à molécula de açúcar está uma de quatro bases nitrogenadas e é essa sequência de bases ao longo da molécula de DNA que carrega a informação genética. A leitura destas sequências é feita através do código genético, o qual especifica a sequência linear dos aminoácidos das proteínas. A tradução é feita por um RNA mensageiro (RNAm) que é sintetizado a partir da cadeia de DNA por um processo chamado transcrição e posteriormente a informação contida neste é traduzida em proteínas pelo processo de tradução. Embora a maioria do RNA produzido seja usado na síntese de proteínas, algum RNA tem função estrutural, como por exemplo o RNA ribossômico (RNAr)(ALBERTS *et al.*, 1997).

Dentro da célula, o DNA é organizado numa estrutura chamada cromossomo e o conjunto de cromossomos de uma célula forma o cariótipo. Antes da divisão celular os cromossomos são duplicados através de um processo chamado replicação. Eucariontes têm o seu DNA localizado e organizado dentro do núcleo, enquanto que procariontes o tem disperso pelo citoplasma. Dentro dos cromossomas, proteínas da cromatina, como as histonas, compactam e organizam o DNA. Estas estruturas compactas guiam as interações entre o DNA e outras proteínas, ajudando a controlar que partes serão desenoveladas para que o DNA possa sofrer o processo de transcrição. O DNA é responsável pela transmissão das características hereditárias de cada espécie de ser vivo (SANDMAN *et al.*, 1998; DAME, 2005).

O DNA é um longo polímero formado por unidades repetidas chamadas nucleotídeos. A cadeia de DNA tem 2,2 a 2,4 nanômetros de largura e um nucleotídeo possui aproximadamente 0,33 nanômetros de comprimento. Embora os monômeros, nucleotídeos, que constituem o DNA sejam muito pequenos, polímeros de DNA pode ser moléculas enormes com milhões de nucleotídeos. Por exemplo, o maior cromossomo humano (cromossomo 1) possui 220 milhões de pares de bases de comprimento (MANDELKERN *et al.*, 1981; GREGORY, 2006).

Em organismos vivos, o DNA não existe como uma molécula única (fita simples), mas sim como um par de moléculas firmemente associadas. As duas longas fitas de DNA enrolam-se formando uma dupla hélice (Figura 1). Os nucleotídeos estão presentes em ambas as fitas da dupla hélice, unidos com nucleótídeos da mesma fita por ligações fosfodiéster e à fita complementar através de ligações hidrogênio formadas pelas suas bases. Uma base ligada a um açúcar é chamada nucleosídeo e uma base ligada a um açúcar e um ou mais fosfatos é chamada nucleotídeo. Portanto, o DNA pode ser referido como um polinucleotídeo (WATSON & CRICK, 1953).

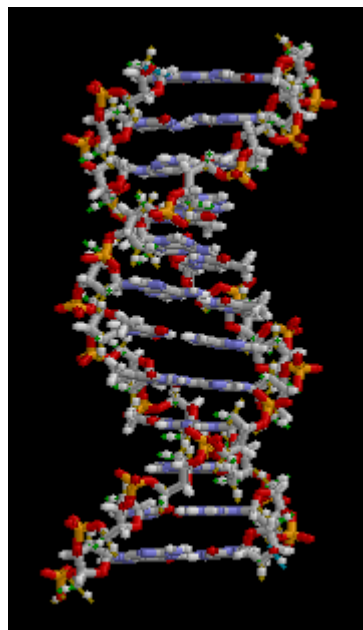


Figura 1 – Representação da cadeia de DNA.
Adaptada de (ALBERTS *et al.*, 1997)

O cerne (*backbone*) da fita de DNA é formado por fosfato e resíduos de açúcar dispostos alternadamente. O açúcar no DNA é 2-desoxirribose, uma pentose (açúcar com cinco carbonos). Os açúcares são unidos por grupos de fosfato que formam ligações fosfodiéster entre o terceiro e o quinto átomos de carbono dos anéis de açúcar adjacentes. Estas ligações assimétricas significam que uma fita de DNA tem uma direção. Numa dupla hélice, a direção dos nucleotídeos de uma fita é oposta à direção dos nucleotídeos da outra fita. O formato das fitas do DNA é designado anti-paralelo. As terminações assimétricas das fitas de DNA são designadas terminais 5' (cinco linha) e 3' (três linha). Uma das principais diferenças entre o DNA e o RNA encontra-se no açúcar, com a substituição da 2-desoxirribose no DNA pela ribose no RNA (ALBERTS *et al.*, 1997).

A dupla hélice do DNA é estabilizada por ligações hidrogênio entre as bases presas às duas fitas. As quatro bases encontradas no DNA são a adenina (A), citosina (C), guanina (G) e timina (T). Estas bases são classificadas em dois tipos: a adenina e guanina são compostos

heterocíclicos chamados purinas, enquanto que a citosina e timina são pirimidinas. Uma quinta base (uma pirimidina) chamada uracila (U) aparece no RNA e substitui a timina; a uracila difere da timina pela falta de um grupo metila no seu anel. A uracila normalmente não está presente no DNA, só ocorrendo como um produto da decomposição da citosina (ALBERTS *et al.*, 1997).

O DNA, normalmente, encontra-se em forma de uma espiral, portanto as fitas de DNA giram uma sobre a outra e acabam por formar fendas entre os cernes de fosfatos deixando expostas as faces das bases nitrogenadas que não estão unidas por ligações hidrogênio com a base complementar. Há dois tipos de fendas na superfície da dupla hélice: uma com 22 Å denominada fenda maior e outra com 12 Å designada de fenda menor (WING, *et al.*, 1980).

A principal função das fendas do DNA é fornecer a informação sobre as bases que se encontram ligadas numa determinada região da dupla fita sem a necessidade de abri-la. Como é de se esperar, a fenda maior oferece maior acessibilidade de ligação com proteínas do que a fenda menor, mas isso não quer dizer que a fenda menor não possa interagir com proteínas (PABO & SAUER, 1984).

1.2 BASES MOLECULARES E ESTRUTURAIS DO RECONHECIMENTO NUCLÉICO ESPECÍFICO EM CONTEXTO LOCAL

Quando proteínas agem em sequências específicas do DNA, o alvo é constituído por uma mínima fração do DNA. Algumas dessas proteínas localizam rapidamente seus alvos específicos, porém algumas passam por um mecanismo que engloba um reconhecimento em sequência randômica do DNA, isto é, uma sequência não específica e por mecanismos de translocação intramolecular alcançam a sequência específica de reconhecimento relacionada à esta proteína (HALFORD & MARKO, 2004).

O reconhecimento molecular específico é um processo complexo, que envolve a exata disposição espacial de grupos químicos capazes de interagir com funções complementares, o balanço exato de interações hidrofóbicas, interações eletroestáticas, ligações hidrogênio, ligações hidrogênio mediadas por moléculas de água, interações de Van der Waals e, por vezes, rearranjos conformacionais (LUSCOMBE *et al.*, 2001).

Esse conjunto de interações, normalmente, está disposto numa pequena região, denominada de reconhecimento, ainda que a proteína seja de grandes dimensões. Isso sempre levou a crer que é necessário um contexto “global”, ou seja, na proteína enovelada, para que o reconhecimento ocorra, tendo que haver os menores ajustes conformacionais possíveis para que os contatos sejam estabelecidos. A determinação da capacidade de reconhecimento do DNA por pequenos peptídeos através de uma grande especificidade pode nos levar a uma condição de desenhar potenciais ligantes seletivos aos alvos em questão e, principalmente, ao DNA. Os ácidos nucléicos peptídicos (PNAs) são exemplos de peptídeos que interagem com o DNA. Eles foram descritos cerca de uma década atrás. Sua alta afinidade por ligações e excelente estabilidade diante da degradação enzimática fazem dos PNAs grandes candidatos a terapias mediadas por controle genético. Um exemplo disso é a sua capacidade de inibir a expressão de CD40 que é uma proteína de membrana presente em células de macrófagos e linfócitos B, o que suscitou a pretensão e o interesse em usá-los em terapias de doenças antiinflamatórias e autoimunes (SEEMAN *et al.*, 1976; MAIER *et al.*, 2005).

A determinação de um padrão de reconhecimento e ligação ao DNA por proteínas ou peptídeos e a habilidade de modular interfaces existentes e criar novas interfaces poderia ser extremamente útil para muitas aplicações biológicas e médicas (HAVRANEK *et al.*, 2004).

Uma característica bastante curiosa e importante sobre reconhecimento específico em DNA é que este tipo de reconhecimento pode ocorrer mesmo quando o DNA está desenovelado ou quando o DNA está compactado em nucleossomas, o que ocorre com

alquilantes de DNA como a duocramicina e a iatacamicina, que reconhecem sequências de três bases adenina, especificamente (TRZUPEK *et al.*, 2006).

Investigando-se os mecanismos de reconhecimento nucléico pela proteína E2 de papilomavírus, observou-se que um estado monomérico é passível de existir e capaz de reconhecer DNA. Isso levou Lima & Silva, 2004, a crer que uma proteína desprovida de estrutura (desenovelada) poderia realizar reconhecimento específico, via acoplamento entre enovelamento e interação, por um balanço de reações, como exemplificado no diagrama a seguir, onde E é um monômero desenovelado, D é um DNA, E_2 é um dímero enovelado, ED é um complexo monômero: DNA, e E_2D é um complexo dímero:DNA (Figura 2). Nesta proposta, todo o sistema está em equilíbrio e pode transitar entre todos os estados. Assim, não seria inesperado observar interações acopladas entre ligação de monômero a DNA e o enovelamento protéico, levando à consolidação de um complexo E:D (LIMA & SILVA, 2004).

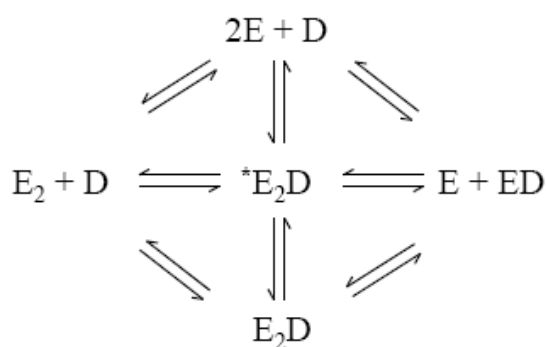


Figura 2 - Diagrama da dinâmica de estados protéicos com DNA (LIMA & SILVA, 2004).

1.2.1 Interações Eletrostáticas

Além dos fatores já descritos, as interações eletrostáticas são de grande importância neste reconhecimento, uma vez que o DNA é uma macromolécula com alta densidade de cargas negativas em sua superfície, o que a difere das demais. Assim, as ligações entre proteínas e DNA são dependentes da presença de íons de baixo peso molecular, como cátions que atuam na neutralização da superfície do DNA. Em virtude das cargas negativas na superfície do DNA, qualquer mudança na concentração de sais no meio promoverá alterações termodinâmicas que são caracterizadas pela interação do DNA com contra-íons (HARD & LUNDBACK, 1996). O efeito de contra íons pelos cátions é função tanto da sua concentração como do tipo de cátion. Na maioria dos casos este efeito é inespecífico e dependente da densidade de carga dos cátions, controlando assim a capacidade de neutralização das cargas de fosfatos. Qualquer processo que altere a densidade de cargas, como ligação de proteínas, por exemplo, poderá ser afetado pela concentração de sais. Um aumento na concentração de sais leva a uma constante de ligação (K) DNA – Sal mais favorável do que uma constante de ligação (K') entre um ligante qualquer, como uma proteína, e o DNA. Após a ligação com a proteína, esses contra-íons são deslocados da superfície do DNA para o solvente. Este deslocamento favorece a ligação devido ao aumento da entropia que está associada à reorganização do solvente assim como à reorganização dos íons, como evidenciado por estudos de complexos proteínas – DNA e peptídeos não específicos – DNA. (RECORD Jr. *et al.*, 1976; HARD & LUNDBACK, 1996; JAYARAM & JAIM, 2004).

1.3 DETERMINAÇÃO DAS BASES ESTRUTURAIS E MOLECULARES DA INTERAÇÃO ENTRE α E2, α TR E α RXR COM SEUS CONSENSOS NUCLÉICOS

Para explorar a hipótese de um reconhecimento molecular por sequências mínimas, um peptídeo muito curto, correspondente apenas a α E2 (hélice de reconhecimento nucléico da proteína E2 de papilomavírus), foi desenhado, sintetizado e avaliado quanto à capacidade de se ligar a DNA. Observou-se que o peptídeo livre em solução é desprovido de estrutura tridimensional (desenovelado), mas guarda a capacidade de realização de reconhecimento de consenso nucléico específico. Estes resultados são inovadores na literatura, criando um novo paradigma de que reconhecimento nucléico específico está acoplado a um contexto local e não global e portanto, passível de ocorrer quando uma proteína está desprovida de estrutura como, por exemplo, a baixíssimos níveis de expressão celular (BARATA *et al.*, 2006). Mais ainda, tais resultados apontam a possibilidade de se desenhar compostos peptídeo-miméticos, passíveis de administração, que poderiam fazer reconhecimento *in vivo* específico e agir como antagonistas competitivos de reguladores transcricionais.

Para investigar se esta propriedade de reconhecimento nucléico específico por sequências mínimas protéicas é um fenômeno particular ou um caso geral, esta dissertação visa a explorar a capacidade de peptídeos sintéticos correspondentes ao domínio de interação com DNA de outros receptores nucleares (NR), α TR (alfa-hélice de reconhecimento nucléico da proteína receptora de hormônio tireoideano) (Figura 4) e α RXR (hélice de reconhecimento nucléico da proteína receptora de 9-cis-retinóide) (Figura 3) se ligar especificamente as sequências de bases AGGTCA, denominadas elementos responsivos (RE) reconhecidas por estes receptores.

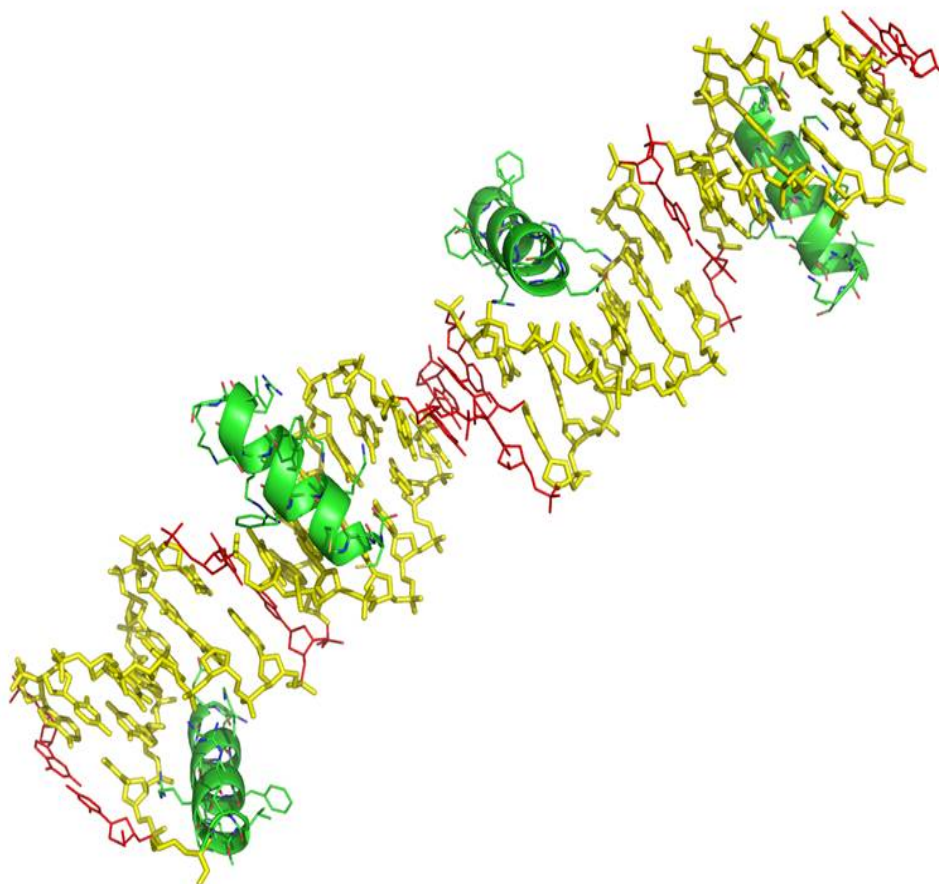


Figura 3 – Esquema representando alfa-hélice de reconhecimento α RXR em DNA's DR1 e DR2 (Figura gerada pelo programa PyMol).

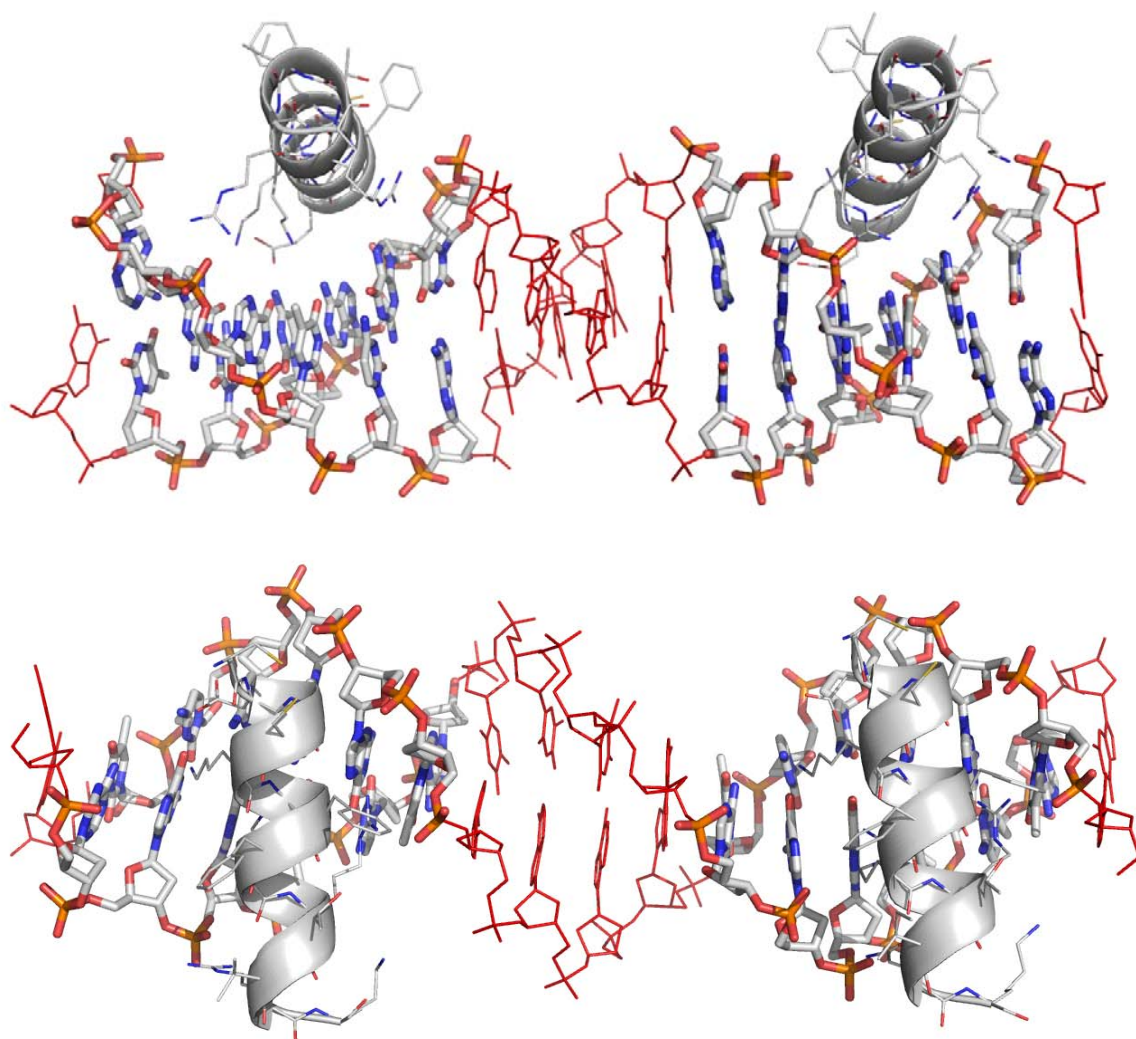


Figura 4 – Esquema representando alfa-hélice de reconhecimento α TR, em ângulos diferentes, a um DNA DR4 (Figura gerada pelo programa PyMol).

1.4 PEPTÍDEOS COMO POTENCIAIS TERAPÊUTICOS

A tecnologia de se produzir moléculas pequenas com potencial terapêutico, envolve a seleção de peptídeos ou polipeptídeos com capacidade de mimetizar proteínas maiores. A intenção é proporcionar produtos relativamente simples, estáveis e de fácil obtenção. Isso se deve ao fato de intervirem em todos os processos biológicos e reações, caracterizando-se por

elevada eficiência e potência, ou seja, atuam especificamente e em baixas concentrações. Esses peptídeos podem servir como agonistas ou antagonistas de receptores protéicos.

Os estudos recentes em biotecnologia tornam possível a produção de grande variedade de proteínas e peptídeos. Os peptídeos e proteínas fisiológicas são subdivididos segundo seu emprego. Por exemplo, aqueles utilizados para terapia de substituição incluem fatores de coagulação, insulina, hormônio do crescimento e eritropoetina. Os produtos com fins terapêuticos em concentrações não fisiológicas incluem interferonas, citocinas, ativadores de plasminogênio tecidual e uroquinase. Já se encontram em estudos clínicos diversas proteínas e peptídeos com ação terapêutica e também já estão sendo usados na terapêutica (SILVA *et al.*, 2002).

Exemplo disso é a capacidade de um peptídeo mimético de proteínas anti apoptóticas ser capaz de deslocar essas proteínas e fazer com isso que a resposta de apoptose, que é bastante importante em cânceres, prevaleça. Logicamente, algumas modificações devem ser feitas neste peptídeo para que ele possa ser administrado e manter-se inalterado na circulação por um tempo razoável para sua atividade. Neste caso específico relatado anteriormente, a alternativa foi a de acoplar uma cadeia de hidrocarbonetos na estrutura do peptídeo (WALENSKY, *et al.*, 2004). Porém, outras técnicas de modificação de peptídeos, para melhorar sua biodisponibilidade e resistência à proteases intracelulares, também são conhecidas, sendo a mais comum, e já utilizada no mercado farmacêutico, o acoplamento de cadeias de polietilenoglicol (ROBERTS *et al.*, 2002).

Outros exemplos de aplicação em terapias estão sendo estudados para uma grande gama de doenças, Kumar e colaboradores mostram em um de seus trabalhos a capacidade de um peptídeo derivado de uma glicoproteína do vírus da raiva, através de um acoplamento a uma sequência de nove argininas, de se ligar com um RNA inibitório (RNAi) e, com isso,

romper a barreira hematoencefálica fazendo com que este RNAi chegue em células nervosas e promova nestas efeitos protetores contra encefalites (KUMAR *et al*, 2007).

O uso de peptídeos como potenciais agentes terapêuticos pode ir mais além. Um peptídeo construído para mimetizar glicoproteínas gB e gH do citomegalovírus foi sintetizado e os resultados foram surpreendentes. O peptídeo conseguiu se ligar aos receptores das glicoproteínas do citomegalovírus, impedindo que o vírus se ligasse à célula hospedeira e promovesse sua entrada (ENGLISH *et al*, 2006).

Até mesmo efeitos antiinflamatórios e de prevenção de doenças isquêmicas, Alzheimer e esclerose múltipla, podem ser modulados por um peptídeo. É o caso do peptídeo NSA-9 derivado do fragmento 2 da protrombina, que é capaz de produzir melhora dessas doenças em ratos (KIM *et al.*, 2008).

1.5 RECEPTORES NUCLEARES

A maioria dos organismos comunica-se através de sinais. Entre as células, essa comunicação ocorre através de secreções de centenas de tipos de moléculas sinalizadoras, incluindo proteínas, pequenos peptídeos, aminoácidos, nucleotídeos, esteróides, retinóides, derivados de ácidos graxos e gases, como óxido nítrico e monóxido de carbono. As células alvo respondem, independentemente da natureza desses sinais, por intermédio de proteínas específicas denominadas receptores. A ligação entre as moléculas sinalizadoras e seus receptores específicos desencadeia vários processos de respostas nas células alvo. Os receptores podem ser proteínas transmembranas localizados na superfície da célula alvo. Quando se ligam a uma molécula sinalizadora extracelular (ligantes hidrofílicos), estes receptores se tornam ativados e iniciam uma cascata de sinais intracelulares que alteram o comportamento da célula alvo (GRONEMEYER *et al.*, 2004).

Outros tipos de receptores estão localizados no interior da célula alvo e o ligante sinalizador penetra na célula a fim de ativá-lo. Por isso, estas moléculas devem ser suficientemente pequenas e hidrofóbicas para se difundirem através da membrana plasmática. A maioria dos receptores que se localiza e age no núcleo das células são membros da superfamília de receptores nucleares, geralmente proteínas de 50 a 100 kDa, envolvidas em várias funções fisiológicas importantes do organismo, pois são potentes reguladores do desenvolvimento, divisão e diferenciação celular, metabolismo e homeostase (EVANS, 1988; MORAS & GRONEMEYER, 1998; MCKENNA *et al.* 1999; GLASS & ROSENFELD, 2000; CHAWLA, *et al.*, 2001; BENOIT *et al.*, 2004). Os receptores nucleares são sinalizadores intracelulares muito importantes, pois são responsáveis por diferentes sinais internos e externos que possuem influência direta na regulação de programas genéticos. A regulação genética modulada por eles afeta diversos aspectos da vida de organismos multicelulares que o possuem como, por exemplo, reprodução, embriogênese e homeostase, assim como mecanismos de morte celular.

Estes receptores são estruturas chaves no controle e no desenvolvimento de diversas doenças como, por exemplo, diversos tipos de cânceres. Doenças relacionadas a glicocorticóides, vitamina D, retinóides, hormônios tireoidianos, estrogênios e androgênios, que também podem ser controladas a partir desses receptores, também são exemplos de alvos de classes de fármacos que estão sendo bastante utilizados pela classe médica e também pesquisados por diversos grupos de pesquisa.

1.5.1 A superfamília dos receptores nucleares

Atualmente são conhecidos diversos tipos de receptores nucleares em vários reinos dos seres vivos, proteínas estas de grande importância na escala evolutiva que se percebe entre invertebrados e vertebrados. Em humanos sabe-se da existência de 48 genes pertencentes a

esta família (HODGKIN, 1999; MAGLICH *et al.*, 2001; FISCHER *et al.*, 2003).

Receptores de hormônios lipofílicos (esteróides, retinóides, vitamina D e tireoidianos), de metabólitos endógenos (ácidos biliares, ácidos graxos, eicoisanóides e oxisterol), e de xenobióticos (que induzem a produção de enzimas do citocromo P450, modulando processos de metabolização e desintoxicação) pertencem à superfamília dos receptores nucleares (FISCHER *et al.*, 2003). Desta maneira, a ação destes receptores está ligada tanto à via de sinalização endócrina como à das vias autócrina e parácrina.

1.5.2 Estrutura geral dos receptores nucleares

Os membros desta superfamília possuem três domínios principais conforme apresentado na Figura 5. Cada um destes domínios desempenha uma determinada função. O primeiro domínio é o N-terminal, contendo função de ativação transcricional 1 (AF1), que promove a ativação da transcrição na ausência do hormônio (ARANDA & PASCUAL, 2001). Isto ocorre quando os receptores nucleares recrutam fatores auxiliares chamados co-reguladores, que podem atuar como co-ativadores, ativando a transcrição de genes, ou co-repressores que são responsáveis pela repressão da transcrição (MCKENNA *et al.*, 1999). O segundo domínio, conhecido como domínio de ligação ao DNA (DBD) é altamente conservado e possui aproximadamente 70 – 80 aminoácidos. O terceiro domínio que possui cerca de 250 resíduos de aminoácidos, é denominado de domínio de ligação do ligante (LBD). O LBD tem a seqüência de DNA moderadamente conservada entre os membros da família e é responsável pela ligação do receptor ao hormônio (TSAI & O'MALLEY, 1994; EVANS, 1988; MCKENNA *et al.*, 1999; GLASS & ROSENFELD, 2000; CHAWLA, *et al.*, 2001; FISCHER *et al.*, 2003; BENOIT *et al.*, 2004). Os domínios DBD e LBD estão conectados por uma curta região chamada *hinge* ou dobradiça, que participa na interação dos receptores nucleares com os co-repressores (BANIAHMAD, *et al.*, 1995; HORLEIN, *et al.*, 1995;

CHEN & EVANS, 1995; ARANDA & PASCUAL, 2001) e supostamente age como uma dobradiça (*hinge*), permitindo o movimento entre os dois módulos para o encaixe no DNA (RIBEIRO *et al.*, 1995; RIBEIRO *et al.*, 1998; BARRA *et al.*, 2004).

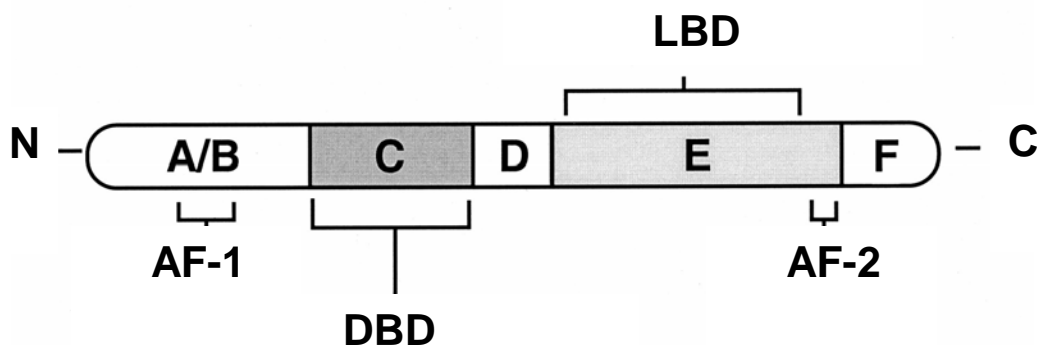


Figura 5 - Visão esquemática dos receptores nucleares. N-term: região amino-terminal; DBD: domínio de ligação ao DNA; LBD: domínio de ligação ao ligante (Adaptada de ARANDA & PASCUAL, 2001).

1.5.3 Ligação dos receptores nucleares ao DNA

Como é sabido, os receptores nucleares sofrem ligação dos hormônios e, por este fato, são regulados, agindo como fatores de transcrição quando se ligam nos promotores dos genes alvos (LAUDET & GRONEMEYER, 2002).

As sequências de bases reguladas pelos hormônios apresentam como função o reconhecimento específico dos receptores, desta forma compõem os chamados elementos responsivos ao hormônio (HREs *Hormone Responsive Elements*). Estes HREs são formados pelo motivo hexamérico 5'- PuGGTCA - 3', sendo Pu = A ou G. Entretanto, eventos como mutações, extensões e duplicações e variações nesta sequências ocorrem e essas variações são

as que caracterizam todos os receptores nucleares conhecidos (LAUDET & GRONEMEYER, 2002).

Alguns dos elementos responsivos de alguns receptores nucleares estão mostrados no Quadro 1.

Os HREs podem estar dispostos em orientações diferentes, direta, palindrômica ou palindrômica invertida, e podem ser encontrados separados por um número variável de nucleotídeos. É importante ressaltar que cada receptor reconhece e tem afinidade de ligação por um ou mais espaçamentos e orientações de organização (GLASS, 1994).

Quadro 1 – Elementos responsivos de alguns receptores nucleares (adaptado de LAUDET & GRONEMEYER, 2002).

Recptores nucleares	Elementos responsivos (HREs)
TR	AGGTCA n AGGTCA (DR4) AGGTCA n ACTGGA (PAL) GGGTCA n ACTGGG (PAL) AGGTCA n TGACCT (PAL inv)
RXR	AGGTCA n AGGTCA (DR1 ,DR2, DR3, DR4, DR5) GGGTCA n GGGTCA (DR1, DR2, DR3, DR4, DR5) ACTGGA n AGGTCA (PAL inv) ACTGGG n GGGTCA (PAL inv)
ER	AGGTCA n ACTGGA (PAL) GGGTCA n ACTGGG (PAL) AGGTCA n AGGTCA (DR3)
GR	AGGACA n ACAGGA (PAL) GGGTCA n ACTGGG (PAL) AGAACA n ACAAGA (PAL) GGAACA n ACAAGG (PAL)
MR	GGTACA n TGTTCT (DR3)
AR	GGTACA n TGTTCT (DR3)
PR	GGTACA n TGTTCT (DR3)
VDR	GGTTCA n GGTTCA (DR3) AGGTCA n AGGTCA (DR3)

1.5.4 Os receptores nucleares de hormônios tireoidianos (TRs)

Os TRs, como todos os membros da superfamília dos receptores nucleares, são proteínas modulares (RIBEIRO *et al.*, 1995). O domínio amino-terminal não é conservado entre os membros da superfamília. O DBD, módulo mais conservado, possui 50% de homologia com os membros da família e o LBD possui 20% de homologia. Os TH (hormônios tireoidianos) modulam a expressão gênica ligando-se aos dois tipos de TRs, os quais agem como fatores de transcrição. Os TRs interagem constitutivamente, normalmente formando dímeros, com as seqüências específicas de DNA chamadas de elementos responsivos ao TH (TREs, *thyroid hormone response elements*) que contêm seqüência-consenso **AGGTCA** (meio-sítio) na região promotora de genes alvo, ao qual se liga cada um dos monômeros (GLASS, 1994; RIBEIRO *et al.*, 1998). As seqüências destes TREs são relativamente conservadas, formando hexâmeros organizados em diferentes orientações (direta, invertida ou evertida) e separadas por um número variável de nucleotídeos (GLASS, 1994). Na subclasse que agrupa os TRs, receptores nucleares de ácido retinóico (RARs) receptores nucleares de vitamina D (VDRs) e *Peroxisome proliferator-activated receptor* (PPAR), os receptores formam heterodímeros com o RXR e se ligam a repetições diretas (DRs, *Direct Repeats*) do hexâmero AGGTCA {AGGTCA(N)AGGTCA}. Neste caso, o número de bases (n) que separa cada hexâmero determina a especificidade da ligação (UMESONO *et al.*, 1991). Os receptores desta subclasse encontram-se ligados aos seus respectivos elementos de resposta no DNA-alvo mesmo na ausência do hormônio. Para o TR esse espaçamento ocorre por quatro bases (5'- **AGGTCANNNNAGGTCA** -3', DR-4). Além disso, os TRs reconhecem e ligam as seqüências de DNA organizadas como palíndromo 5'- **AGGTCA TGACCT**-3' (TRE) e palíndromo invertido 5'-**TGACCTNNNNNNAGGTCA**-3' (invPAL6 or F2) (RIBEIRO *et al.*, 1992; RIBEIRO *et al.*, 1995; RIBEIRO *et al.*, 1998; GLASS, 1994).

1.5.5 Receptor X de retinóide, (RXR)

Os receptores X de retinóide, cujo ligante é o ácido retinóico *9-cis*, são codificados por três genes, constituindo-se, portanto, em três subtipos diferentes: RXR α , RXR β e RXR γ , os quais diferem na região N-terminal (região A/B), possivelmente controlando a expressão de genes diferentes. O RXR possui a peculiaridade de estar envolvido em múltiplos mecanismos de transcrição, ora atuando como homodímeros, ora como heterodímeros associado a parceiros diversos (ZHANG *et al.*, 1992). Nos heterodímeros formados com a subclasse do TR (FORMAN *et al.*, 1995), com exceção do PPAR e receptores órfãos, o RXR não é ativado pelo seu próprio ligante e funciona como um parceiro silencioso. Isto porque, quando associado ao RAR em elementos responsivos DR-2 e DR-5, com VDR em DR-3 e o TR em DR-4, o RXR encontra-se ligado ao hexâmero AGGTCA na posição 5', onde sua conformação é alostericamente alterada pelo parceiro, impedindo-o de ser ativado pelo ácido *9-cis* retinóico. No entanto, heterodímeros de RXR com receptores órfãos, como o LXR e NGFI-8/NURR1 (PERLMANN & JANSSON, 1995), podem ser ativados pelo ácido *9-cis* retinóico em variantes de DR-4 e DR-5, respectivamente. Por isso, estes complexos são considerados permissíveis à ação do ácido *9-cis* retinóico. Outro heterodímero permissível ao ácido *9-cis* retinóico é o complexo formado entre PPAR e RXR que atua em DR-1. Neste elemento, a polaridade de ligação é invertida, ou seja, o RXR liga-se ao hexâmero AGGTCA situado na posição 3'. Sendo assim, este heterodímero pode ser ativado pelos ligantes de ambos receptores, independente e sinergicamente (KLIEWER *et al.*, 1992). No entanto, este papel do parceiro silencioso pode ser alterado pelas trocas de aminoácidos devido à mutações que fazem parte da pequena rede dos resíduos energeticamente acoplados (SHULMAN *et al.*, 2004). Esta rede foi identificada por uma análise estatística acoplada (SCA, *statistical coupling analysis*) (LOCKLESS & RANGANATHAN, 1999; SUEL *et al.*, 2003).

Este tipo de regulação alostérica da resposta do RXR ao seu ligante faz com que ações específicas do ácido 9-*cis* retinóico sejam restritas aos homodímeros de RXR ou aos heterodímeros deste com parceiros permissivos. Como os DR-1 são os sítios preferenciais da ação de homodímeros de RXR (GLASS, 1994). Sabe-se que a heterodimerização com o RAR (Receptor nuclear de ácido retinóico) nestes elementos leva à inibição da resposta mediada pelos retinóides. Logo, a transcrição mediada por homodímeros de RXR estaria restrita a contextos de DR-1, em que a disponibilidade de RAR é limitada e a presença do ácido 9-*cis* retinóico é abundante, favorecendo a formação de homodímeros de RXR nestes elementos. No entanto, diante de evidências de um papel mais amplo do ácido 9-*cis* retinóico (DAVIS *et al.*, 1994) e da flexibilidade de atuação de heterodímeros do RXR em múltiplas DRs, é possível que os homodímeros de RXR atuem em outras DRs além de DR-1.

1.6 ANISOTROPIA DE FLUORESCÊNCIA

A anisotropia de fluorescência é uma ótima ferramenta para o estudo de interações moleculares. Os ensaios feitos por este método são feitos em solução e necessitam de pequenas concentrações de amostras para serem realizados. As amostras não são modificadas durante a análise e por isso podem ser analisadas mais de uma vez, até mesmo mudando-se condições como: concentração de ligantes, pH, temperatura e concentração de sal (BEACON, 1995).

Os valores de anisotropia conseguidos durante um ensaio são proporcionais ao grau de rotação da molécula ou do complexo formado. O grau de rotação está diretamente ligado a três fatores: viscosidade, temperatura e volume molecular. Se durante todo um ensaio mantêm-se constantes a temperatura e a viscosidade do meio, o valor obtido estará

unicamente relacionado ao volume molecular (LUNDBLAD *et al.*, 2006) (BEACON, 1995)

como mostra a Figura 6.

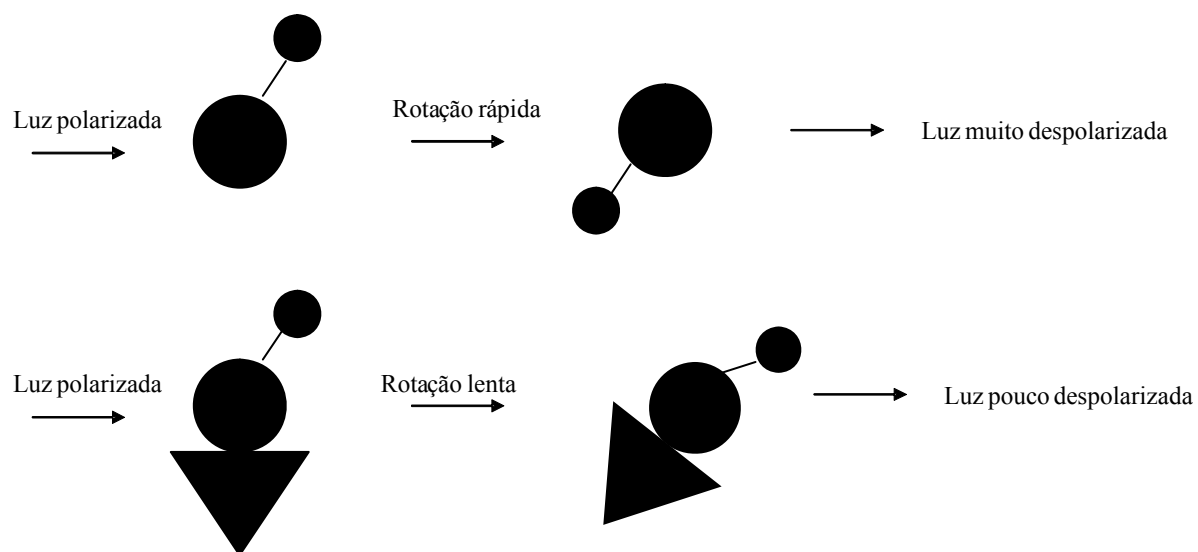


Figura 6 – Teoria Anisotropia de Fluorescência (Adaptado de BEACON, 1995).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

O objetivo deste trabalho é estudar a interação entre peptídeos sintéticos, com sequência correspondente à alfa-hélice de reconhecimento nucléico das proteínas RXR e TR, com oligonucleotídeos sintéticos contendo os elementos responsivos para estes receptores nucleares.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Medir a interação entre peptídeos correspondentes à sequências mínimas de DBD de TR e RXR com DNA (ER's) específico e não específico;
- Medir em diferentes concentrações de cloreto de sódio (NaCl) a interação entre os peptídeos correspondentes a sequências mínimas de DBD, α TR e α RXR, com DNA específico, que contém elementos responsivos para TR e RXR e não específico, que não possuem elementos responsivos;
- Verificar o processo de dissociação do peptídeo já ligado aos DNA específico e não específico por aumento gradual da concentração de sal.
- Comparar as interações de α TR e α RXR com os DNA específico e não específico.

3 METODOLOGIA

3.1 PEPTÍDEOS SINTÉTICOS

Os peptídeos correspondentes à hélice de reconhecimento das sequências consenso de DNA dos receptores nucleares da tireóide (TR) e do ácido 9-cis retinóico (RXR) foram obtidos por síntese química em fase sólida, purificados em HPLC (> 95 % pureza). Estes peptídeos foram produzidos pela empresa Genemed Synthesis Inc, com os seguintes lotes:

α RXR – lote 10060598

α TR – lote 10060599

Os peptídeos foram ressuspensos com uma solução de 1,4-ditiotreitol (DTT) 50 mM e estocados em temperatura de -20°C e somente foram retiradas no momento da utilização sendo mantidos em gelo. Após sua utilização eram novamente congelados em temperatura de -20°C.

As sequências dos peptídeos são as seguintes:

α TR – N-term. Cisteína – Glutâmico – Glicina – Cisteína – Lisina – Glicina – Fenilalanina – Fenilalanina – Arginina – Arginina – Treonina – Isoleucina – Glutamina – Lisina – C term.

α RXR – N-term. Cisteína – Glutâmico – Glicina – Cisteína – Lisina – Glicina – Fenilalanina – Fenilalanina – Lisina – Arginina – Treonina – Valina – Arginina – Lisina – C term.

As sequências peptídicas foram planejadas baseadas nas interações descritas entre as proteínas RXR e TR com um elemento responsivo a partir de dado cristalográfico

(www.pdb.org, entrada 2NLL.pdb), como pode ser visto nas Figuras 7 e 8 a seguir (a partir de PDBsum, www.pdb.org).

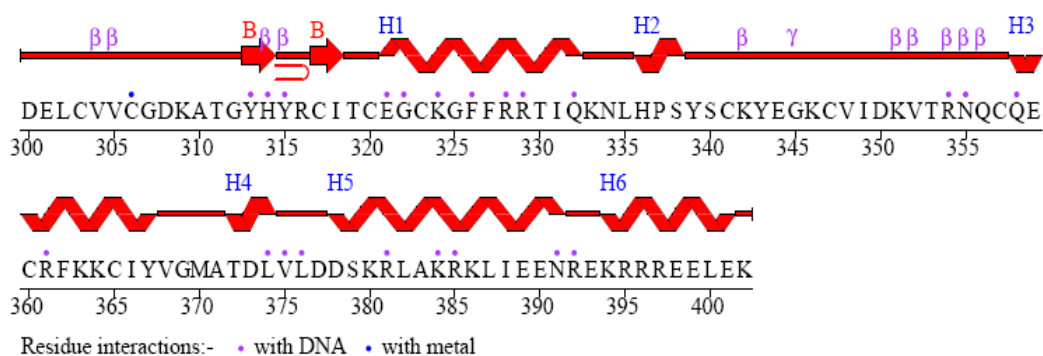


Figura 7 – Análise estrutural da proteína TR complexada a DNA cognato.

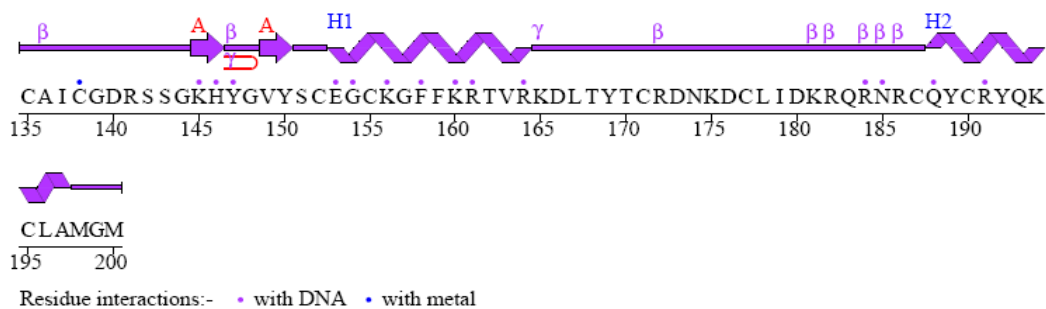


Figura 8 – Análise estrutural da proteína RXR complexada a DNA cognato.

3.2 OLIGONUCLEOTÍDEOS SINTÉTICOS

Os oligonucleotídeos utilizados nesta dissertação foram adquiridos comercialmente e obtidos por síntese química em fase sólida, purificados em HPLC (> 95 % pureza). Todos os oligonucleotídeos apresentaram-se em dupla fita e possuíam uma molécula de fluoresceína acoplada em sua extremidade 5' (figura 9). Todos os oligonucleotídeos foram estocados em temperatura de -20°C e os tubos em que foram armazenados eram recobertos por papel alumínio para protegê-los da ação da luz sobre a fluoresceína.

As sequências dos oligonucleotídeos utilizados nesta dissertação encontram-se abaixo e nas moléculas específicas as sequências de reconhecimento encontram-se sublinhadas.

Específicos:

DR1 – 5' AGCTTCAGGTCAGAGGTCAGAG 3'

DR4 – 5' AGCTTCAGGTCACAGGAGGTCAGAG 3'

F2 – 5' AGCTTATTGACCTCAGCTGAGGTCAAGTTACG 3'

TRE – 5' ATATTCAGGTCATGACCTGAATAT 3'

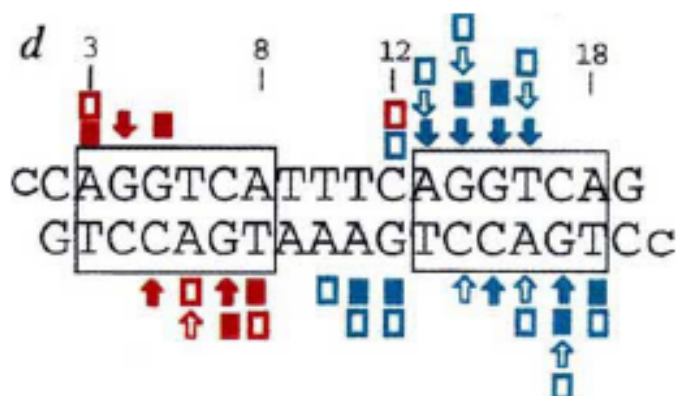
MEIO SÍTIO (MS) - 5'AGCTAAAGGTCAGATC 3'

Não específicos:

p53 - 5'TAATTAGGCATGTCTAGGAAA 3'

reCA – 5'ACTGTATGAGCATACAGTA 3'

ABDS – 5'GTAACCGAAATCGGTTGA 3'



Setas sólidas – contato direto com base
Retângulos sólidos – contato com fosfatos
Setas abertas – contatos com bases mediados por água
Retângulos abertos – contatos com fosfatos mediados por água.

Figura 9 - Bases de reconhecimento específico dos receptores TR e RXR (RASTINEJAD *et al.*, 1995).

3.3 LIGAÇÃO A OLIGONUCLEOTÍDEOS

Inicialmente foi abordada a interação entre os peptídeos e os oligonucleotídeos, específicos (contendo sequência cognata AGGTC A dupla-fita) e não específicos, empregando-se medidas de anisotropia de fluorescência da fluoresceína ligada à extremidade 5' de uma das fitas do DNA.

3.4 ANISOTROPIA DE FLUORESCÊNCIA DE FLUORESCÉINA

A formação de complexo entre peptídeo e DNA foi medida utilizando-se a técnica de anisotropia de fluorescência em formato “L” FP3600 (LAKOWICS, 1999; LUNDBLAD *et al.*, 2006) em equipamento Jasco FP3600. A excitação foi feita a 480 nm e a emissão medida a 520 nm. Os valores de anisotropia de fluorescência foram calculados conforme a equação 1.

Equação 1:

$$A = (I_{vv} - I_{vh}) / (I_{vv} + 2GI_{vh})$$

$$G = I_{hv} / I_{hh}$$

Sendo:

I_{vv} a intensidade de emissão quando o polarizador da excitação e da emissão estão orientados verticalmente.

I_{vh} a intensidade de emissão quando o polarizador da excitação se encontra na posição vertical e o polarizador da emissão se encontra orientado horizontalmente.

I_{hh} a intensidade de emissão quando o polarizador da excitação e da emissão estão orientados horizontalmente.

I_{hv} a intensidade de emissão quando o polarizador da excitação se encontra na posição horizontal e o polarizador da emissão se encontra orientado verticalmente.

A Figura 10 mostra a disposição dos polarizadores e suas posições durante um ensaio de medidas de anisotropia.

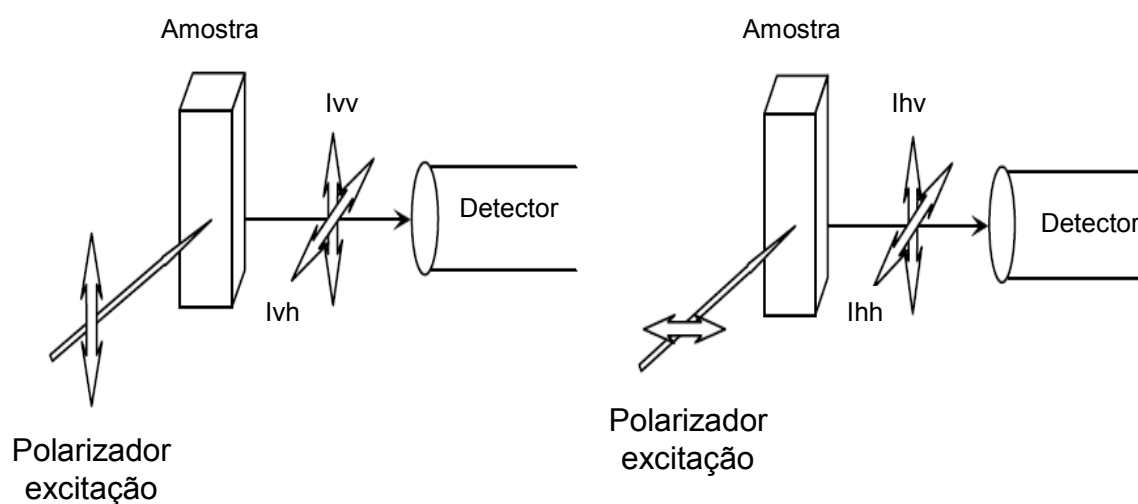


Figura 10 – Posição e disposição dos polarizadores durante ensaio de anisotropia.
Adaptado de: BEACON™ FLUORESCENCE POLARIZATION SYSTEM. Manual: Applications Guide.

3.5 ANÁLISE TITULOMÉTRICA DE INTERAÇÃO PEPTÍDEO:DNA

As análises foram feitas pela adição sequencial de uma solução contendo tampão Hepes (Ácido N-(2-Hidróxi-*etil*)-piperazine-N'-2-etanosulfônico) pH = 8,0, Glicerol, 1,4-Ditiotreitol (DTT), peptídeo (α TR ou α RXR) e NaCl, a qual foi denominada mix, à uma amostra contendo tampão Hepes pH = 8,0, Glicerol, DTT, NaCl e DNA específico (DR1 ou DR4 ou F2 ou TER ou MS) ou não específico (p53 ou reCA ou ABDS) em pequenos volumes (de 1 a 5 μ l), seguidos de homogeneização e equilíbrio subsequente por 5 a 10 minutos, na temperatura de 25°C, antes de realizar a medida. Depois da adição de cada alíquota da solução mix foram realizadas medidas de intensidade de fluorescência nas quatro combinações possíveis de posição dos polarizadores (H/H , H/V, V/V, V/H), os quais eram movidos manualmente. A solução mix ficou acondicionada em gelo durante todo o ensaio. A diluição máxima das amostras nesse tipo de procedimento não ultrapassou 10 % (v/v) do volume inicial. Para cada combinação de um dos dois peptídeos α TR e α RXR com todos os DNA's, específicos e não específicos, foram realizadas medições em três diferentes concentrações de NaCl 10 mM, 20 mM e 50 mM.

Os quadros 2 e 3 resumem as concentrações usadas tanto na solução mix, que foi sendo adicionada durante o ensaio ao conteúdo da cubeta, quanto da solução preparada na própria cubeta, respectivamente.

Quadro 2 – Concentrações finais usadas na preparação da solução mix

Reagente	Concentração final
Tampão Hepes pH = 8,0	20 mM
NaCl	10, 20 ou 50 mM
Glicerol	5%
DTT	5 mM
α TR / α RXR	600 μ M
Água destilada	qsp x μ L

Quadro 3 – Concentrações finais usadas na preparação da solução da cubeta.

Reagente	Concentração final
Tampão Hepes pH = 8,0	20 mM
NaCl	10, 20 ou 50 mM
Glicerol	5%
DTT	5 mM
DNA	50 nM
Água destilada	qsp 300 μ L

3.6 ANÁLISE TITULOMÉTRICA DE DISSOCIAÇÃO PEPTÍDEO:DNA PELA ADIÇÃO DE NaCl

Este ensaio foi procedido através da adição gradual de uma solução contendo tampão Hepes pH = 8,0, glicerol, DTT e NaCl, a qual denominamos de mix2, à uma solução preparada e colocada em cubeta de quartzo, contendo tampão Hepes pH = 8, glicerol, DTT, NaCl 2 mM, peptídeos α TR ou α RXR, DNA específico (DR1 ou DR4 ou F2 ou TER ou MS) ou não específico (p53 ou reCA ou ABDS). A adição em pequenos volumes (de 1 a 5 μ l),

seguidos de homogeneização e equilíbrio subsequente por 5 a 10 minutos, na temperatura de 25°C, antes de realizar a medida. Depois da adição de cada alíquota da solução mix2 foram realizadas medidas de intensidade de fluorescência nas quatro combinações possíveis de posição dos polarizadores (H/H, H/V, V/V, V/H), os quais eram movidos manualmente. Ao final foi acrescentado pequeno volume, 2 µL de solução de NaCl concentrada (4 M) para garantir que a dissociação ocorresse completamente.

A solução mix2 ficou acondicionada em gelo durante todo o ensaio. A diluição máxima das amostras nesse tipo de procedimento não ultrapassou 10 % (v/v) do volume inicial.

As concentrações finais de cada uma destas soluções estão mostrados nos quadros 4 e 5.

Quadro 4 – Concentrações finais da solução preparada na cubeta.

Reagente	Concentração final
Tampão Hepes pH = 8	20 mM
NaCl	2 µM
glicerol	5%
DTT	5 mM
αTR / αRXR	80 µM
DNA	5 nM
Água destilada	qsp x µL

Quadro 5 – Concentrações finais da solução mix2.

Reagente	Concentração final
Tampão Hepes pH = 8	20 mM
NaCl	800 μ M
glicerol	5%
DTT	5 mM
Água destilada	qsp x μ L

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para se determinar as possíveis ligações entre α TR e α RXR com o DNA específico e não específico foram realizados ensaios de anisotropia de fluorescência.

Nas figuras apresentadas a seguir podemos observar que os peptídeos α TR e α RXR, em concentração de NaCl de 10 mM, interagem com o DNAs específicos isto é, que contém a sequência de bases AGGTCA em diferentes disposições e espaçamentos. A avaliação desta interação é observada com o aumento da anisotropia que ocorre à medida que as concentrações de α TR e α RXR são aumentadas, uma vez que o aumento da concentração desses peptídeos favorece a ligação com o DNA. Após a ligação entre peptídeo e DNA, ocorre um aumento do volume final do complexo formado que é maior que o volume do DNA sem sofrer ligação do peptídeo adicionado. Sendo o fundamento da anisotropia medir o desvio da luz polarizada em função do grau de rotação do complexo, quanto maior o volume final do complexo formado menor será sua velocidade de rotação no meio e, por consequência, menor será o desvio da luz polarizada incidida, ocasionando valores crescentes de anisotropia.

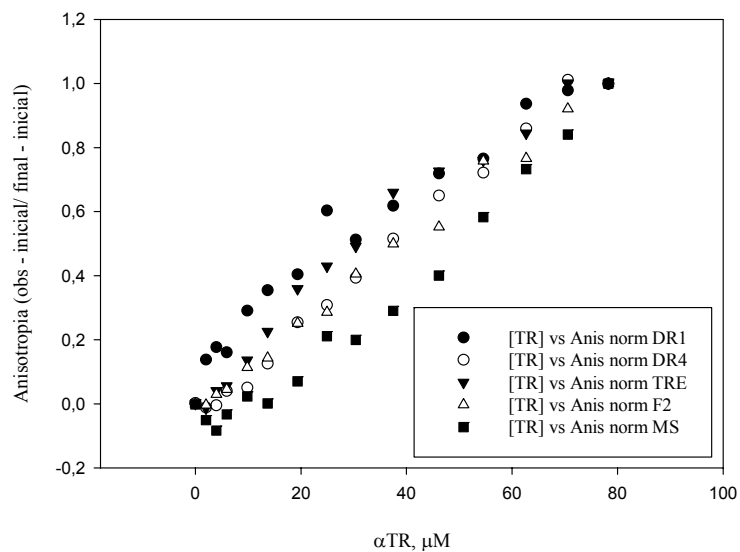


Figura 11 – Ligação de α TR com DNA's específicos.

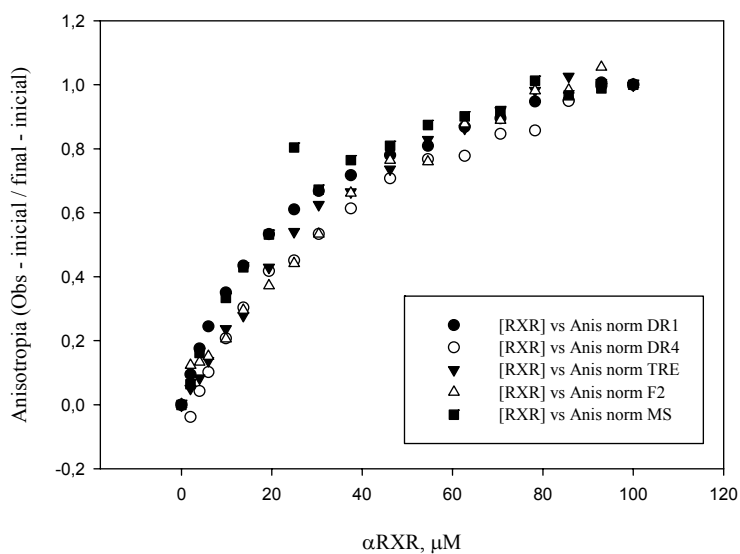


Figura 12 – Ligação α RXR com DNA's específicos.

Para verificar se esse reconhecimento dos peptídeos α TR e α RXR é realmente específico em DNA que possuem a sequência consenso AGGTCA, realizou-se também medidas de anisotropia de fluorescência com DNA que não possuem essas sequências, isto é DNA não específico. Nas figuras representadas a seguir podemos observar que também

ocorreu ligação dos peptídeos aos DNAs não específicos, tanto no caso do peptídeo α TR como no caso do peptídeo α RXR.

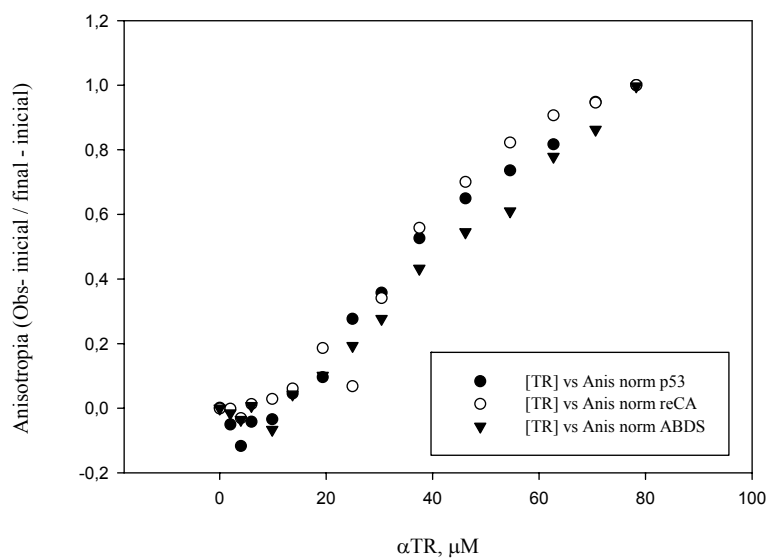


Figura 13 – Ligação α TR com DNA's não específicos.

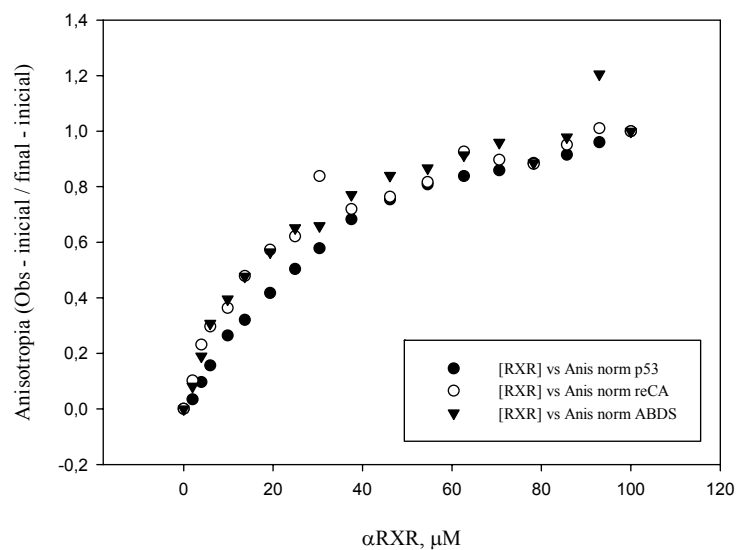


Figura 14 – Ligação α RXR com DNA's não específicos.

Para uma melhor visualização e análise das interações dos peptídeos α TR e α RXR com os DNAs específicos e não específicos as figuras 15 e 16, a seguir, possuem em uma só representação gráfica ambos os casos citados.

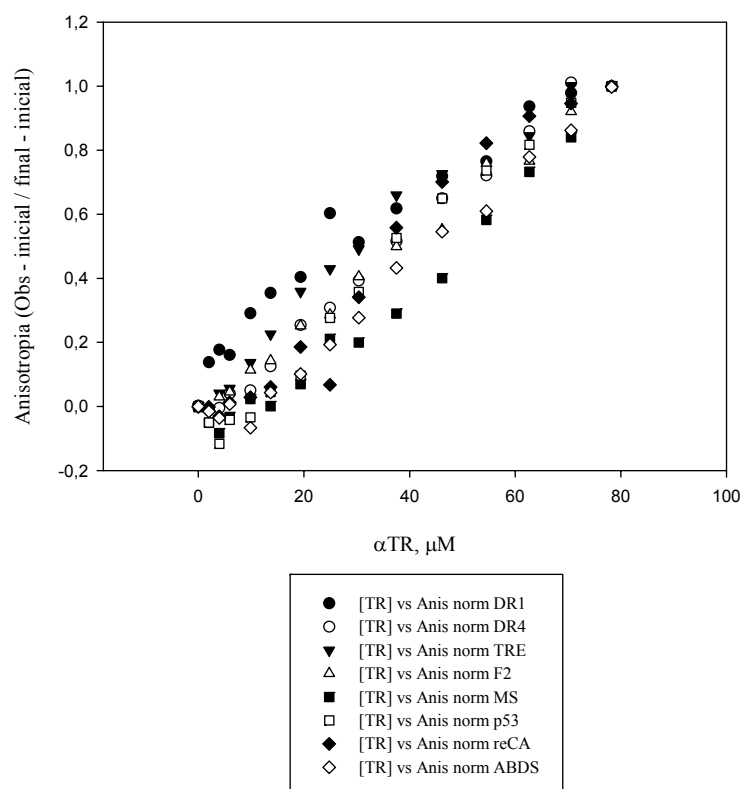


Figura 15 – Ligação α TR com DNA's específicos e não específicos.

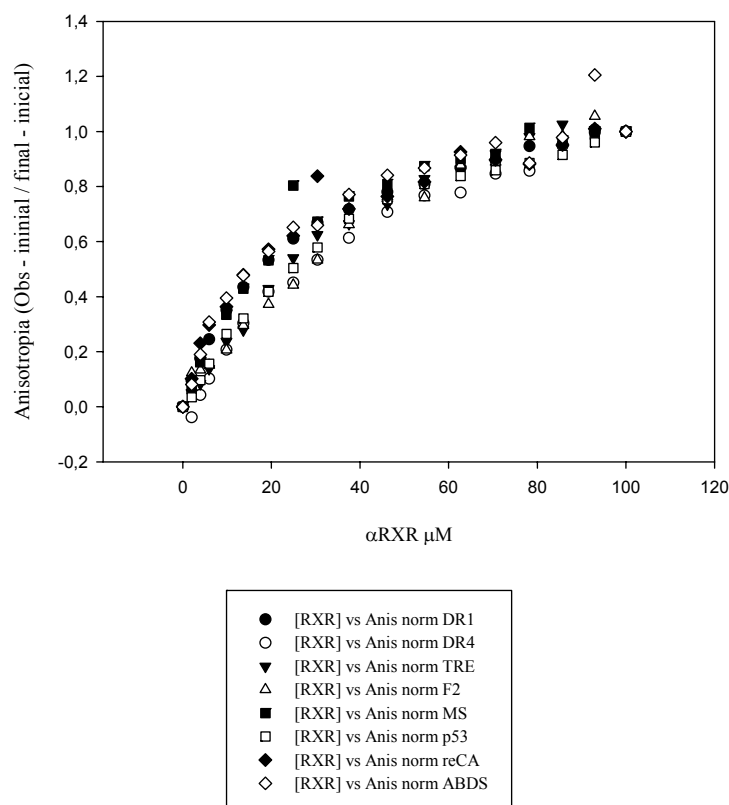


Figura 16 – Ligação α RXR com DNA's específicos e não específicos.

Esses resultados levam à conclusão de que a ausência da estrutura global do receptor nuclear, ou pelo menos a totalidade de um de seus domínios não impede a interação com as moléculas de DNA testadas, mas diminui muito sua afinidade de ligação ao DNA a ponto de não se conseguir concluir se a ligação ocorre preferencialmente em DNA específico quando comparados a DNA não específico.

Observou-se também que concentrações de NaCl maiores que 10 mM diminuem fortemente as interações dos peptídeos com os DNAs de ambos os tipos mostrando que o aumento da concentração de sal promove uma força iônica suficiente para deslocar as interações α TR/DNA e α RXR/DNA, assim a constante de equilíbrio DNA-sal torna-se mais favorável que a constante de equilíbrio DNA-peptídeo. Esse decréscimo progressivo de afinidade é esperado uma vez que contatos iônicos estão envolvidos na interação. Isto foi

observado principalmente na concentração de 50 mM, na qual a força iônica é maior devido a maior concentração de NaCl presente (RECORD Jr. *et al.*, 1976)

As figuras 17 e 18 mostram as interações entre os peptídeos α TR/DNA e α RXR/DNA, respectivamente, nas três concentrações de NaCl, demonstrando que quanto maior a concentração de sal menor é a fração de peptídeo ligado aos dois tipos de DNA.

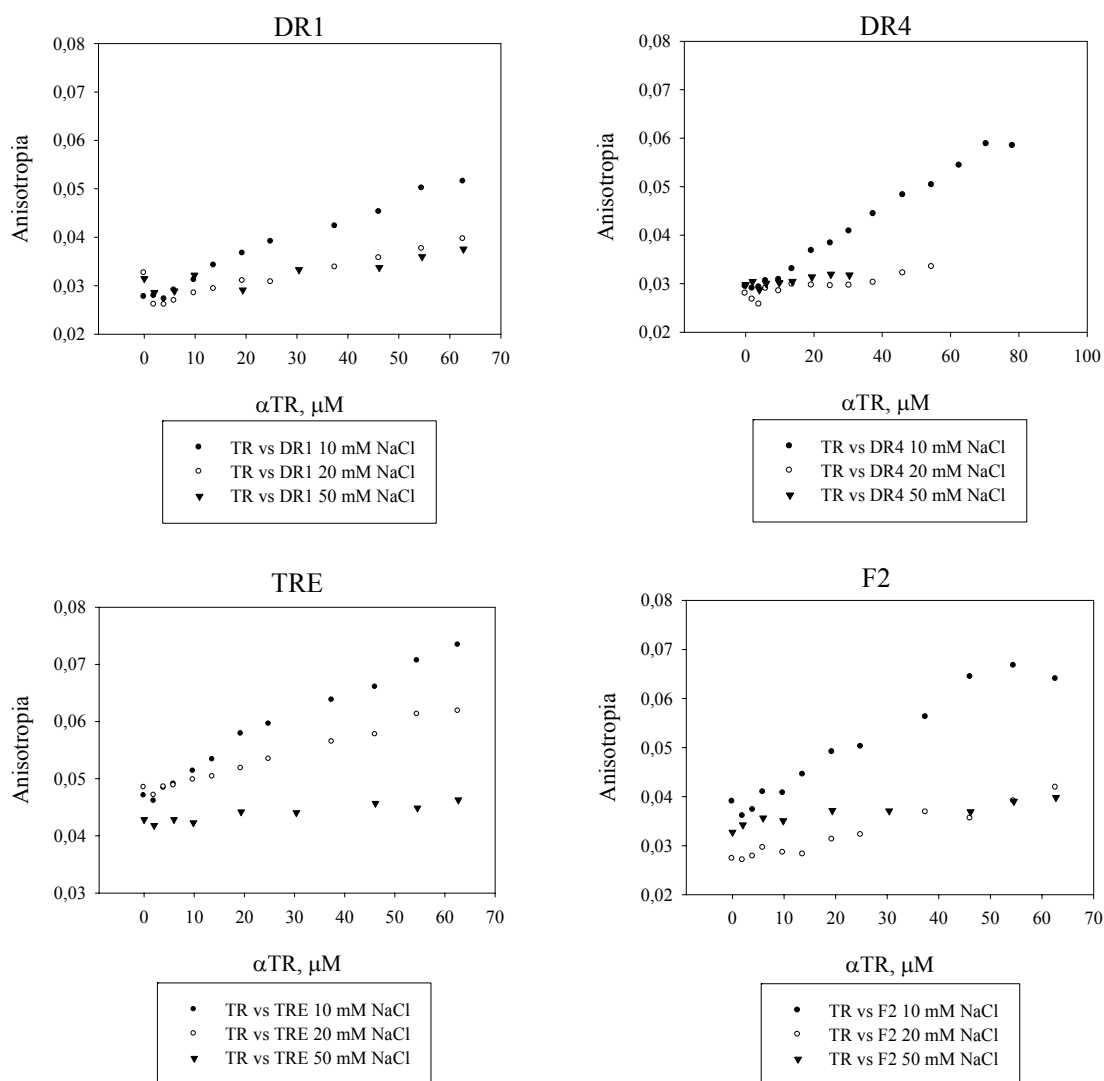
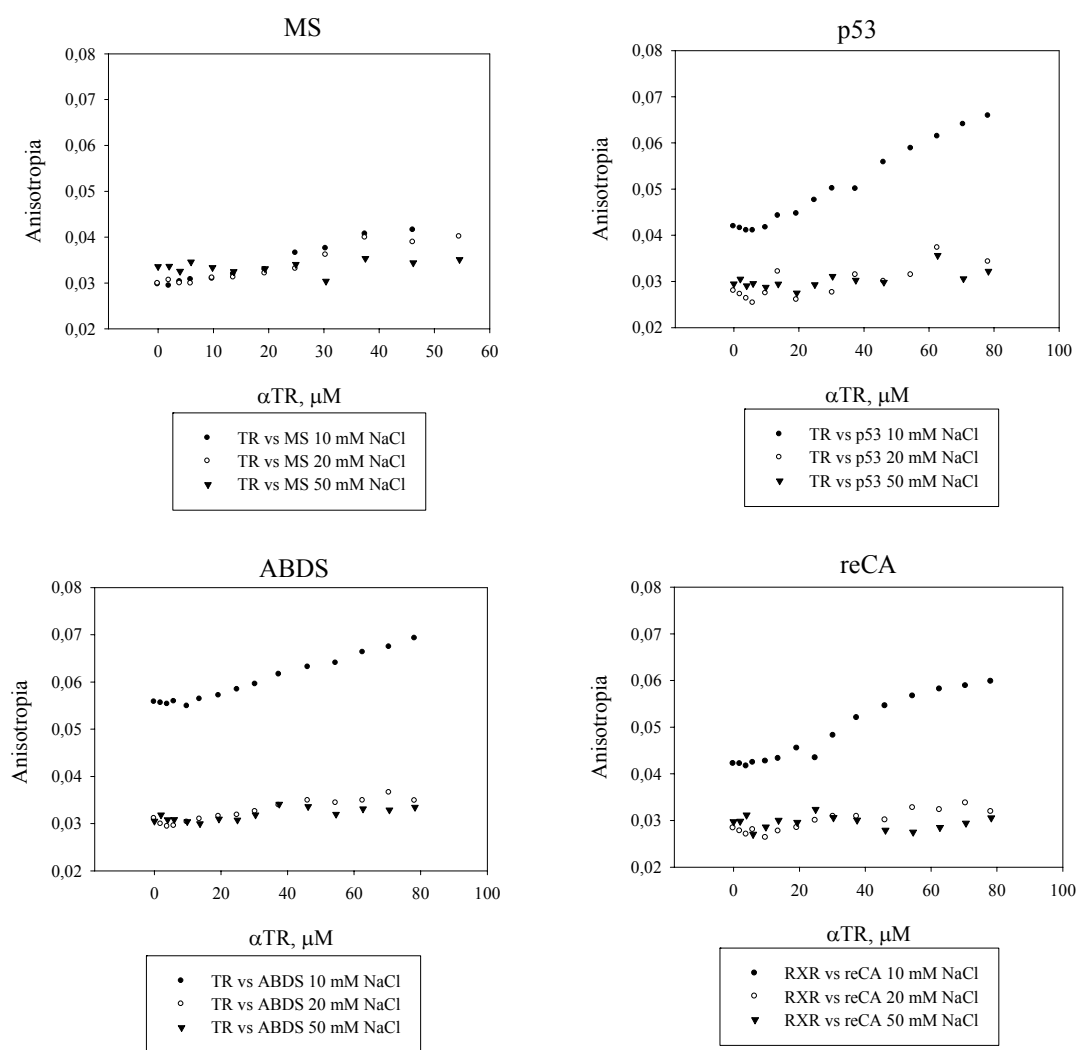


Figura 17 – α TR interação com DNA's específicos e não específicos em diferentes concentrações de NaCl (10 mM, 20 mM e 50 mM).



Continuação figura 17 – α TR interação com DNA's específicos e não específicos em diferentes concentrações de NaCl (10 mM, 20 mM e 50 mM).

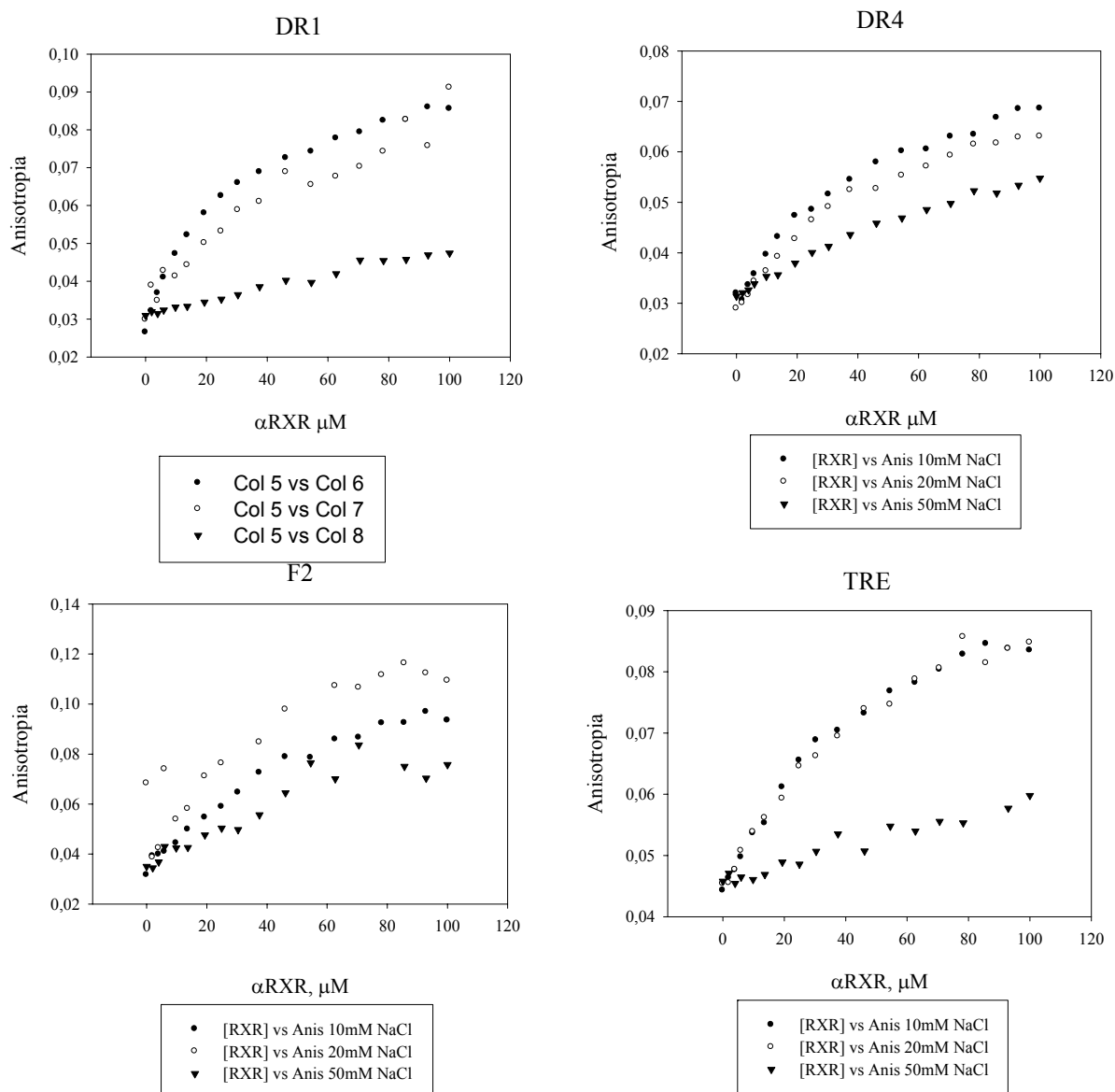
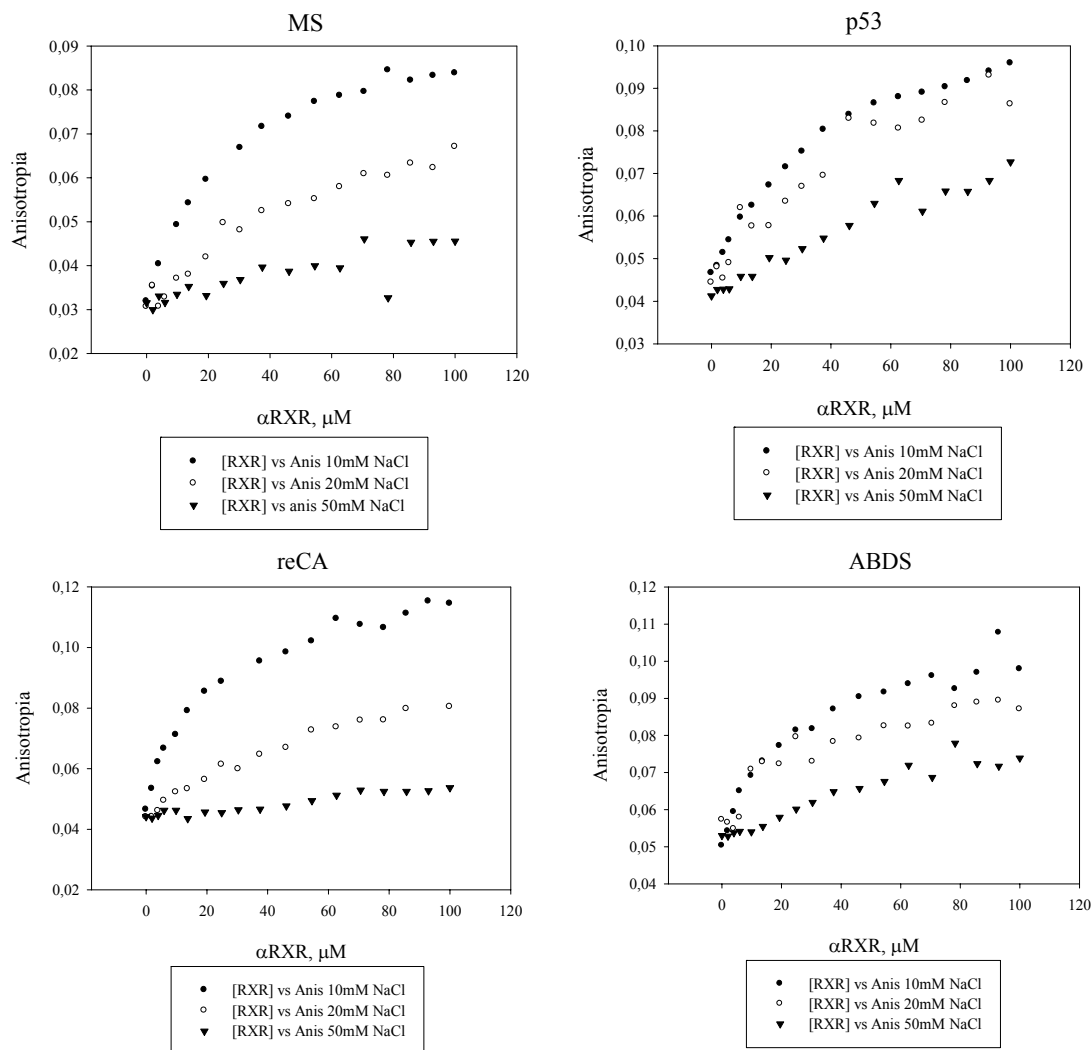


Figura 18 - α RXR interação com DNA's específicos e não específicos em diferentes concentrações de NaCl (10 mM, 20 mM e 50 mM).



Continuação figura 18 - α RXR interação com DNA's específicos e não específicos em diferentes concentrações de NaCl (10 mM, 20 mM e 50 mM).

Para se confirmar o efeito das concentrações crescentes de NaCl no reconhecimento nucleico por parte dos peptídeos em relação aos tipos de DNA analisados, foram realizados ensaios de dissociação da interação peptídeos / DNA através de aumentos sequenciais da concentração de NaCl. Estes ensaios confirmaram que o aumento da concentração deste sal não só torna mais difícil a formação de complexos como mostrado anteriormente nas figuras 17 e 18, mas também acarreta o desligamento de complexos já formados, como podemos observar nas figuras 19 e 20.

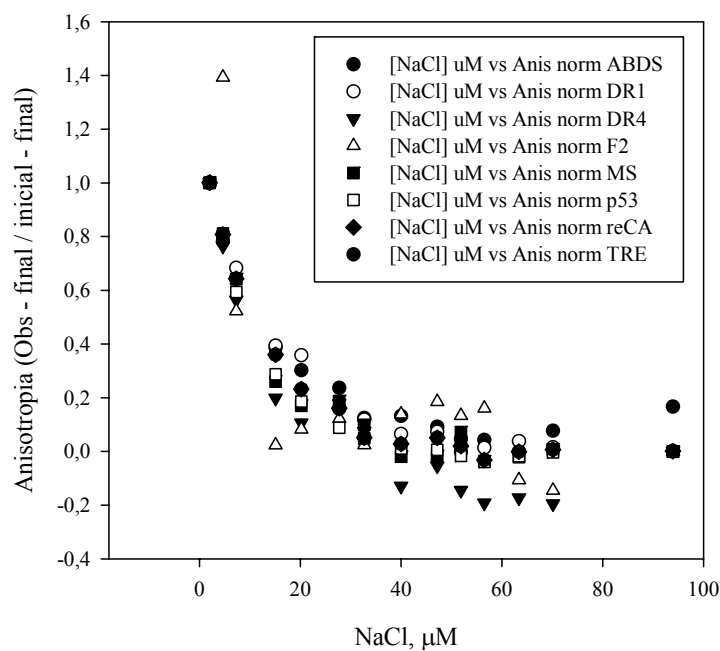


Figura 19 – Dissociação da interação α TR / DNA com o aumento da concentração de NaCl.

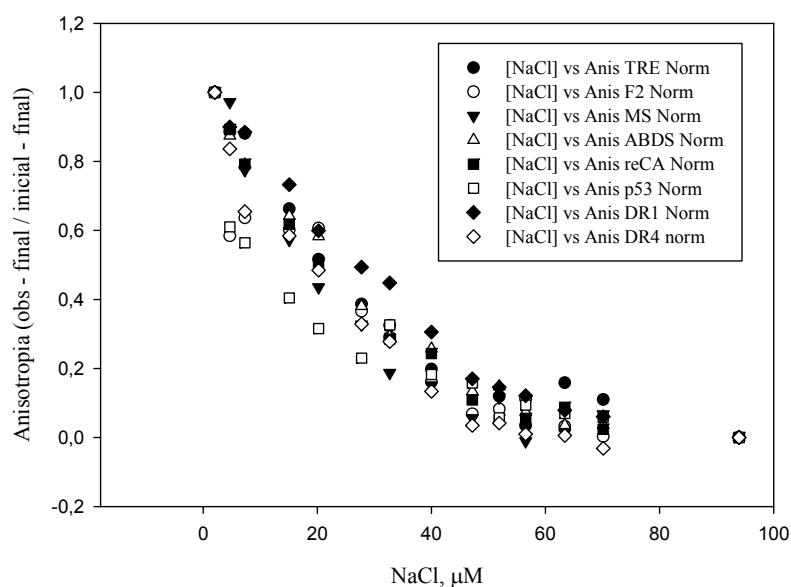


Figura 20 - Dissociação da interação α RXR / DNA com o aumento da concentração de NaCl.

Comparando-se agora os peptídeos α TR e α RXR em relação as suas capacidades de interagir com DNA específico e não específico, através de dados de interação destes peptídeos com todos os tipos de DNA explorados em concentração de NaCl de 10 mM percebemos,

através da figura 21, que o peptídeo α RXR possui grau de interação com todos os tipos de DNA em questão, por atingir valores maiores de anisotropia do que os valores alcançados ao se medir com o peptídeo α TR.

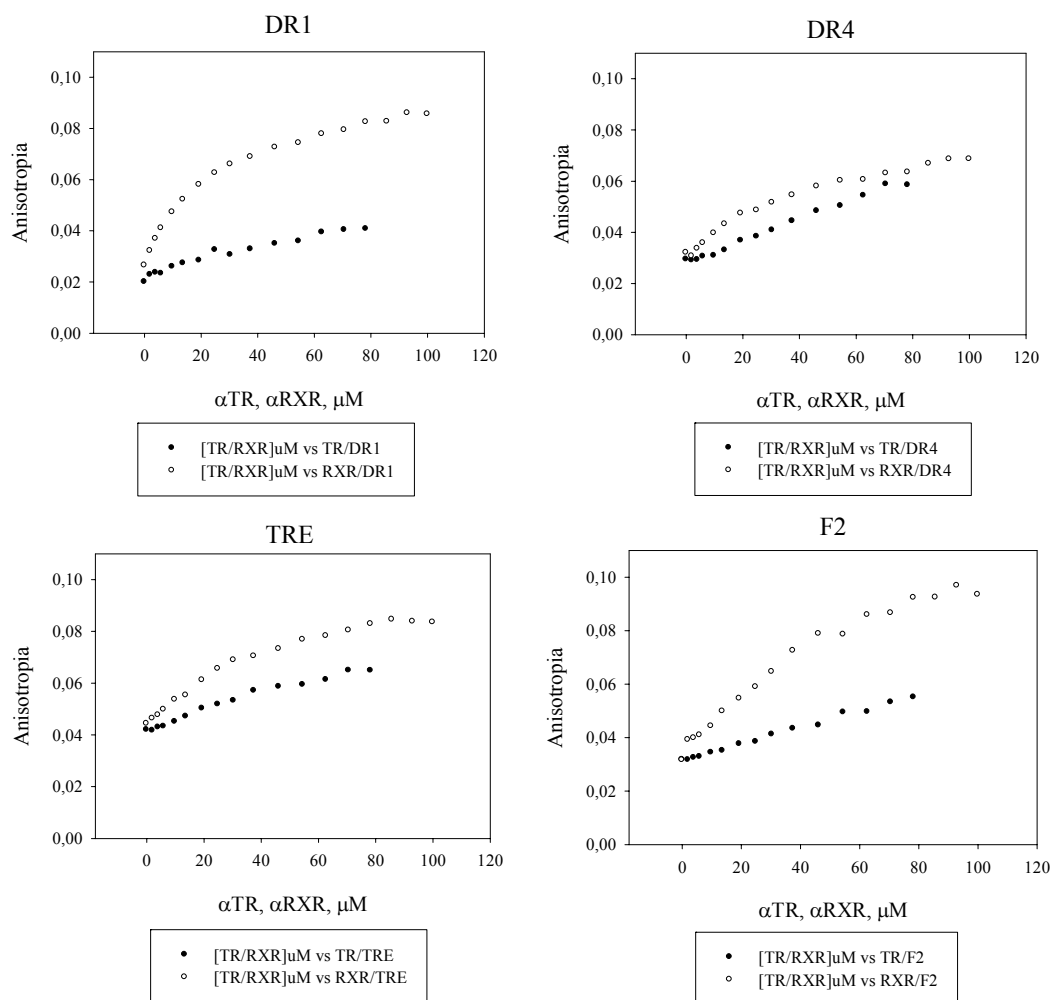
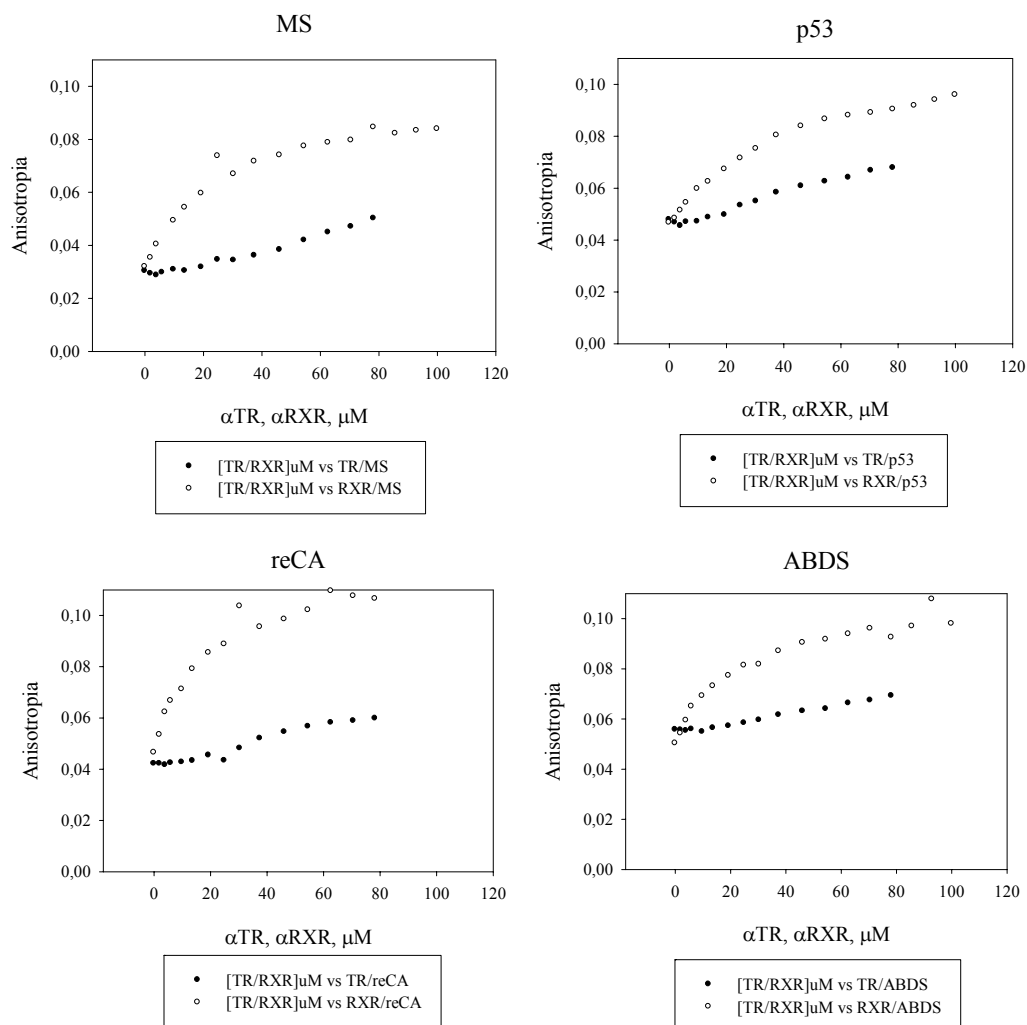


Figura 21 – Comparação entre TR e RXR interagindo com DNA's específicos e não específicos em concentração de 10 mM de NaCl.



Continuação figura 21 – Comparação entre TR e RXR interagindo com DNA's específicos e não específicos em concentração de 10 mM de NaCl.

Levando-se em consideração que os peptídeos possuem praticamente o mesmo tamanho, sendo ambos são constituídos de 14 aminoácidos, essa diferença entre a ligação quando se comparam os dois peptídeos pode ter explicação na diferença de três aminoácidos que estes dois peptídeos apresentam entre si.

α TR – N-term. Cisteína – Glutâmico – Glicina – Cisteína – Lisina – Glicina – Fenilalanina – Fenilalanina – Arginina – Arginina – Treonina – Isoleucina – Glutamina – Lisina – C term.

α RXR – N-term. Cisteína – Glutâmico – Glicina – Cisteína – Lisina – Glicina – Fenilalanina – Fenilalanina – **Lisina** – Arginina – Treonina – **Valina** – **Arginina** – Lisina – C term.

A primeira diferença aparece no aminoácido número 9, no peptídeo α TR, cuja posição é ocupada por arginina, enquanto no α RXR ela é ocupada por lisina. O valor do dipolo N-H na lisina é maior do que o encontrado na arginina, devido ao fato de elétrons disponíveis estarem em ressonância na arginina. Esta característica do grupamento N-H da arginina torna-a menos apta a fazer ligação hidrogênio. Na figura 22 observamos os dois aminoácidos para facilitar esta explicação.

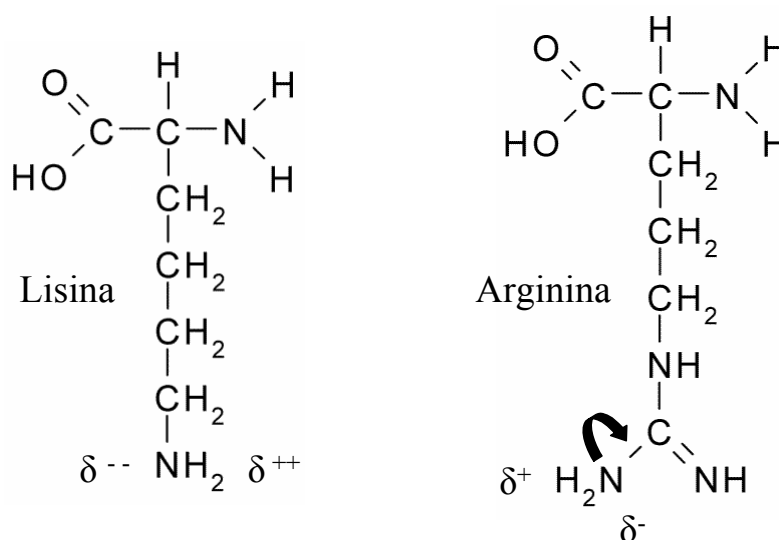


Figura 22 - Estruturas química da lisina e arginina.

A segunda diferença aparece no aminoácido da posição 12. No peptídeo α TR, esta posição é ocupada por uma isoleucina enquanto no α RXR ela é ocupada por uma valina. A cadeia lateral da isoleucina é mais volumosa que a cadeia lateral da valina por possuir um grupamento metila a mais, grupamento este que ocupa espacialmente praticamente o volume de um benzeno. Isto determina um impedimento estérico, que é desfavorável à aproximação

do peptídeo ao DNA, dificultando, assim, interações químicas entre ambos. Na figura 23 observamos estas duas estruturas.

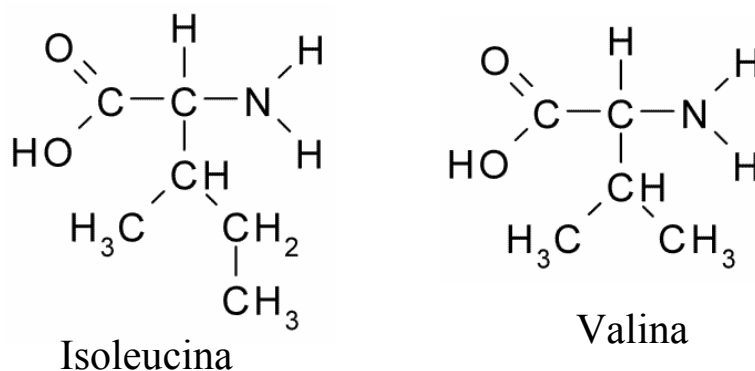


Figura 23 – Estruturas químicas da isoleucina e valina.

A terceira diferença aparece no aminoácido número 13, no peptídeo α TR, cuja posição é ocupada por uma glutamina enquanto que no α RXR ela é ocupada por uma arginina. A cadeia lateral da arginina, apesar de ser mais volumosa e poder prejudicar estericamente a aproximação entre peptídeo e DNA, é mais longa, o que possibilita a interação com domínios mais distantes do DNA do que a glutamina. Além disso, a arginina apresenta quatro átomos de hidrogênio com capacidade de realizar ligações hidrogênio enquanto que a glutamina apresenta somente dois, como é mostrado por setas na figura 24.

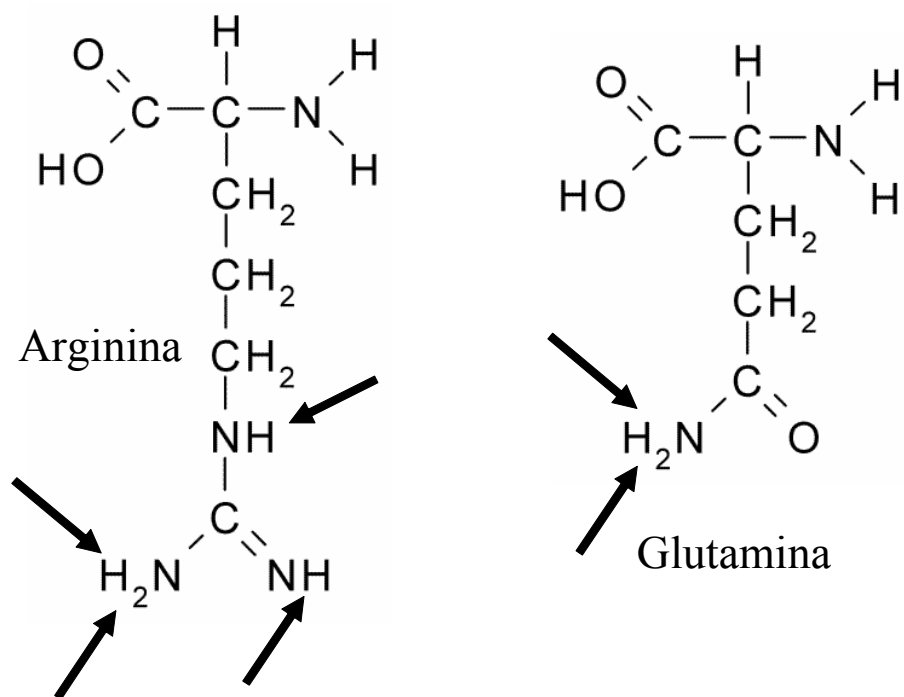


Figura 24 – Estruturas químicas da arginina e glutamina.

Assim os relatos acima auxiliam na explicação desta diferença de afinidade de ligação entre os dois peptídeos com os tipos de DNA analisados que, pode ser confirmada e explorada com outros estudos, como por exemplo aplicando estudos de ressonância magnética nuclear (RMN).

5 CONCLUSÕES

- Os peptídeos α TR e α RXR correspondentes à alfa-hélice de reconhecimento nucléico dos receptores nucleares do hormônio da tireóide e do ácido 9-cis retinóico, respectivamente, são capazes de interagir com DNA que possua ou não os seus elementos responsivos. Isto é, com a perda de sua estrutura global ou parte dela, a seletividade de ligação a sequências correspondentes a seus elementos responsivos foi drasticamente diminuída.
- Concentrações crescentes de sal, como o NaCl, promovem tanto dificuldade de se realizar ligações entre os peptídeos em questão com as moléculas de DNA analisadas, como promovem a dissociação destes mesmos complexos quando já formados e acrescentados de concentrações maiores de NaCl.
- O peptídeo α RXR apresentou maior afinidade de ligação aos DNA's explorados do que o peptídeo α TR. Para isso foi proposto um modelo baseado nas naturezas químicas dos aminoácidos que diferem entre as duas sequências peptídicas.
- Estudos estruturais e de química orgânica poderão ser importantes no estudo destas sequências e de outras sequências pertencentes a outros sistemas, no que engloba a melhora da afinidade por parte de um peptídeo, ou qualquer outra molécula, à sequências de bases de DNA de interesse.

6 PERPECTIVAS

- Estudos de dinâmica molecular podem ajudar no planejamento de peptídeos semelhantes aos utilizados afim de se obter seletividade aos alvos em questão.
- Dados cristalográficos seriam uma boa alternativa para se conhecer com exatidão os contatos entre os peptídeos e os DNA`s. Com os estas informações teremos mais uma ferramenta para adequar estruturalmente estes peptídeos a se ligarem especificamente aos DNA`s específicos.
- Ensaios de liberação destes peptídeos em células serão válidos para avaliar a capacidade de uma estrutura deste tamanho e desta natureza existir no meio intracelular e de direcionamento ao seu respectivo alvo.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Biologia Molecular da Célula**. Porto Alegre : Artes Médicas, 3ª ed. 1997.
- ARANDA, A.; PASCUAL, A. **Nuclear hormone receptors and gene expression**. Am. Physiol. Soc. 81, 2001. p. 1270-1295.
- BANIAHMAD, A.; LENG, X.; BURRIS, T. P.; TSAI, S. Y.; TSAI, S. J.; O'MALLEY, B. W. **The tau 4 activation domain of the thyroid hormone receptor is required for release of a putative corepressor(s) necessary for transcriptional silencing**. Mol. Cellular Biol. 15, 1995. p. 76–86.
- BARATA, J. F.; MOHANA-BORGES, R.; LIMA, L.M. **Specificity in DNA recognition by a peptide from papillomavirus E2 protein**. FEBS letters, **580**, 2006. p. 1919-1924.
- BARRA, G. B.; VELASCO, L. F. R.; PESSANHA, R. P.; CAMPOS, A. M.; MOURA, F. N.; DIAS, F. M. G.; POLIKARPOV, I.; RIBEIRO, R. C. J.; SIMEONI, L. A.; NEVES, F. A. R. **Mecanismo molecular da ação do hormônio tireoideano**. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia, v. 48, 2004. p. 25-39.
- BEACON™ FLUORESCENCE POLARIZATION SYSTEM. **Manual: Applications Guide**. Madison: Pan Vera Corporation, 1995.

- BENOIT, G.; MALEWICZ, M.; PERLMANN, T. **Digging deep into the pockets of orphan nuclear receptors: insights from structural studies.** Trends in Cell Biology 14, 2004. p. 269-376.
- CHAWLA, A.; REPA, J. J.; EVANS, R. M.; MANGELSDORF, D. J. **Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files.** Science, 294, 2001. 1866-70.
- CHEN, J. D.; EVANS, R. M. **A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors.** Nature, 377, 1995. p. 454-457.
- DAME, R. T. **The role of nucleoid-associated proteins in the organization and compaction of bacterial chromatin.** Mol. Microbiol., 56, 2005. 858-70.
- DAVIS, K. D.; BERRODIN, T. J.; STELMACH, J. E.; WINKLER, J. D.; LAZAR, M. A. **Endogenous retinoid X receptors can function as hormone receptors in pituitary cells.** Mol. Cell Biol. 14, 1994. p. 7105-10.
- ENGLISH, E. P.; CHUMAMOV, R. S.; GELLMAN, S. H.; COMPTON, T. **Rational development of β -peptide inhibitors of human cytomegalovirus entry.** Journal of Biological Chemistry, 281, 2006. p. 2661-2667.
- EVANS, R. M. **The steroid and thyroid hormone receptor superfamily.** Science, 240, 1988. p. 889-895.

- FISCHER, H.; DIAS, S. M. G.; SANTOS, M. A. M.; ALVES, A. C.; ZANCHIN, N.; CRAIEVICH, A. F.; APRILETTI, J. W.; BAXTER, J. D.; WEBB, P.; NEVES, F. A. R.; RIBEIRO, R. C. J.; POLIKARPOV, I. **Low resolution structures of the retinoid X receptor DNA-binding and ligand-binding domains revealed by synchrotron X-ray solution scattering.** The Journal of Biological Chemistry, v. 278 (18), 2003. p. 16030-16038.
- FORMAN, B. M.; UMESONO, K.; CHEN, J.; EVANS, R. M. **Unique response pathways are established by allosteric interactions among nuclear hormone receptors.** Cell, 81, 1995. p. 541-50.
- GLASS, C. K. **Diferential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimmers, and heterodimers.** Endocr. Rev., 15, 1994. p. 391-407.
- GLASS, C.K.; ROSENFELD, M.G. **The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors.** Genes Dev., 14, 2000. p. 121-41.
- GREGORY, S. **The DNA sequence and biological annotation of human chromosome 1.** Nature, 441, 2006. p. 315-321.
- GRONEMEYER, H.; GUSTAFSSON, J.; LAUDET, V. **Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily.** Nature Reviews Drug Discovery, 3, 2004. p. 950-964.
- HALFORD, S. E.; MARKO, J. F. **How do site-specific DNA-binding proteins find their targets?** Nucleic Acids Research, 32, 2004. p. 3040-3052.

- HARD, T.; LUNDBACK, T. **Thermodynamics of sequence-specific protein – DNA interactions.** *Biophysical Chemistry*, 62, 1996. p. 121-139.
- HAVRANEK, J. J.; DUARTE, C. M.; BAKER, D. **A simple physical model for the prediction and design of protein-DNA interactions.** *J. Mol Biol.*, 344, 2004. p. 59-70.
- HODGKIN, J. **Sex , cell Death, and the genome of C. elegans.** *Cell*, v. 98, 1999. p. 277-280.
- HORLEIN, A. J.; NAAR, A. M.; HEINZEL, T.; TORCHIA, J.; GLOSS, B.; KUROKAWA, R.; RYAN, A.; KAMEI, Y.; SODERSTROM, M.; GLASS, C. K.; ROSENFELD, M. G. **Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor.** *Nature*, 377, 1995. p. 397-404.
- JAYARAM, B.; JAIN, T. **The role of water in protein-DNA recognition.** *Annu. Rev. Biomol. Struct.*, 33, 2004. p. 343-361.
- KIM, J. Y.; KIM, T. H.; KIM, S. S. **Anti-inflammatory effect of a human prothrombin fragment-2-derived peptide, NSA9, in EOC2 microglia.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 368, 2008. p. 779-785.
- KLIEWER, S. A.; UMESONO, K.; MANGELSDORF, D. J.; EVANS, R.M. **Retinoid X receptor interacts with nuclear receptors in retinoic acid, thyroid hormone and vitamin D3 signalling.** *Nature*, 355, 1992. p. 446-449.

- KUMAR, P.; WU, H.; MCBRIDE, J. L.; JUNG, K.; KIM, M. H.; DAVIDSON, B. L.; LEE, S. K.; SHANKAR, P.; MANJUNATH, N. **Transvascular delivery of small interfering RNA to the central nervous system.** *Nature*, 448/5, 2007. p. 39-45.
- LAKOWICS, J. R. **Principals of fluorescence spectroscopy.** New York: Kluwer academic/ Plenum publishers, 1999.
- LAUDET, V.; GRONEMEYER, H. **The Nuclear receptor Factsbook.** San Diego, San Francisco, New York, London, Sydney and Tokyo: Academic press, 2002.
- LIMA, L. M.; SILVA, J. L. **Positive contribution of hydration on DNA binding by E2c protein from papillomavirus.** *J. Biol. Chem.*, 279, 2004. p. 47968-47974.
- LOCKLESS, S. W.; RANGANATHAN, R. **Evolutionarily conserved pathways of energetic connectivity in protein families.** *Science*, 286, 1999. p. 295–299.
- LUNDBLAD, J. R.; LAURENCE, M.; GOODMAN, R. H. **Fluorescence polarization analysis of protein-DNA and protein-protein interactions.** *Mol. Endocrinol.* 10, 2006. p. 607-612.
- LUSCOMBE, N. M.; LASKOWSKI, R. A.; THORTON, J. M. **Amino-acid-base interactions: a three-dimensional analysis of protein-DNA interactions at an atomic level.** *Nucleic Acid Res.*, 29, 2001. p. 2860-2874.
- MAGLICH, J. M.; SLUDER, A.; GUAN, X., SHI, Y.; MCKEE, D. D.; CARRICK, K.; WILSON, T. M.; MOORE, J. T. **Comparison of complete nuclear receptor sets from the human, *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila* genomes.** *Genome Biology*, v. 2 (8), 2001. p. 29.1-29.7.

- MAIER, A. M.; ESAU, C. C.; SIWKOWISKI, A. M.; WANCEWICZ, K. A.; KINBERGER, G. A.; KADABA, N. S.; WATANABE, T.; MANOHARAN, M.; BENNETT, C. F.; GRIFFEY, R. H.; SWAYZE, E. E. **Evaluation of basic amphipathic peptides for cellular delivery of antisense peptide nucleic acids.** J. Med. Chem., 49, 2005. p. 2534-2542.
- MANDELKERN, M.; ELIAS, J.; EDEN, D.; CROTHERS, D. **The dimensions of DNA in solution.** J. Mol. Biol., 152, 1981. p. 153-161.
- MCKENNA, N. J.; LANZ, R. B.; O'MALLEY, B. W. **Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology.** Endocr Rev., 20, 1999. p. 321-344.
- MORAS, D.; GRONEMEYER, H. **The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function.** Current Opinion in Cell Biology, 10, 1998. p. 384-391.
- PABO, C.; SAUER, R. **Protein-DNA recognition.** Annu Rev Biochem, 53, 1984. p. 293-321.
- PERLMANN, T.; JANSSON, L. **A novel pathway for vitamin-A signaling mediated by RXR heterodimerization with NGFI-B and Nurr1.** Genes Dev., 9, 1995. p. 769-782.
- POLIKARPOV, I.; PERLES, L. A.; DE OLIVEIRA, R. T.; OLIVA, G.; CASTELLANO, E. E. GARRATT, R.; CRAIEVICH, A. **Set-up and experimental parameters of the protein crystallography beamline at the Brazilian National Synchrotron Laboratory.** J. Synch. Rad., 5, 1998. p. 72-76.

- RASTINEJAD, F.; PERLMAN, T.; EVANS, R. M.; SIGLER, P. B. **Structural determination of nuclear receptor assembly on DNA direct repeats.** Nature. 375, 1995. p. 203-211.
- RECORD Jr. M. T.; LOHMAN, M. L.; DE HASETH, P. **Ion effects on ligand-nucleic acid interactions.** J. Mol. Biol., 107, 1976. p. 145-158.
- RIBEIRO, R. C.; KUSHNER, P. J.; APRILETTI, J. W.; WEST, B. L.; BAXTER, J. D. **Thyroid hormone alters *in vitro* DNA binding domain of monomers and dimers of thyroid hormone receptors.** Mol. Endocrinol., 6, 1992. p. 1142-1152.
- RIBEIRO, R. C.; KUSHNER, P. J.; BAXTER, J. D. **The nuclear hormone receptor gene superfamily.** Annu. Rev. Med., 46, 1995. p. 443-453.
- RIBEIRO, R. C.; APRILETTI, J. W.; WAGNER, R. L.; FENG, W.; KUSHNER, P. J.; NILSSON, S.; SCALAN, T. S.; WEST, B. L.; FLETTERICK, R. J.; BAXTER, J. D. **X-ray crystallographic and functional studies of thyroid hormone receptor.** J. Steroid Biochem. Mol. Biol., 65, 1998. p. 133-141.
- ROBERTS, M. J.; BENTLEY, M. D.; HARRIS, J. M. **Chemistry for peptide and protein PEGylation.** Advanced Drug Delivery Reviews, 54, 2002. p. 459-476.
- SANDMAN, K.; PEREIRA, S.; REEVE, J. **Diversity of prokaryotic chromosomal proteins and the origin of the nucleosome.** Cell Mol life Sci, 54, 1998. p. 1350-1364.
- SEEMAN, N. C.; ROSENBERG, J. M.; RICH, A. **Sequence-specific recognition of double helical nucleic acids by proteins.** Proc. Nat. Acad. Sci., 73, 1976. p. 804-808.

- SHULMAN, A. I.; LARSON, C.; MANGELSDORF, D. J.; RANGANATHAN, R. **Structural determinants of allosteric ligand activation in RXR heterodimers.** Cell, 116, 2004. p. 417–429.
- SILVA, C.; RIBEIRO, A.; FERREIRA, D.; VEIGA, F. **Administração oral de peptídeos e proteínas: Estratégias gerais para aumento da biodisponibilidade oral.** Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, 38, 2002. p. 125-139.
- SUEL, G. M.; LOCKLESS, S. W.; WALL, M. A.; RANGANATHAN, R. **Evolutionarily conserved networks of residues mediate allosteric communication in proteins.** Nat. Struct. Biol., 10, 2003. p. 59–69.
- TRZUPEK, J. D.; GOTTESFELD, J. M.; BOGER, D.L. **Alkylation of duplex DNA in nucleosome core particles by duocarmycin SA and yatakemycin.** Nature, 2, 2006. p. 79-82.
- TSAI, M. J.; O'MALLEY, B. W. **Molecular Mechanisms of Action of Steroid/Thyroid Receptor Superfamily Members.** Annual Review of Biochemistry, v. 63, 1994. p. 451-486.
- UMESONO, K.; MURAKAMI, K. K.; THOMPSON, C. C.; EVANS, R.M. **Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid and vitamin D3 receptors.** Cell, 65, 1991. p. 1255-1266.

- WALENSKY, L. D.; KUNG, A. L.; ESCHER, I.; MALIA, T. J.; BARBUTO, S.; WRIGHT, R. D.; WAGNER, G.; VERDINE, G. L. E KORSMEYER, S. J. **Activation of apoptosis *in vivo* by a hydrocarbon-stapled BH3 helix.** Science, 305, 2004. p. 1466-1470.
- WATSON, J.; CRICK, F. **Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid.** Nature, 171, 1953. p. 737-738.
- WING, R.; DREW, H.; TAKANO, T.; BORKA, C.; TANAKA, S.; ITAKURA, K.; DICKERSON, R. **Crystal structure analysis of a complete turn of B-DNA.** Nature, 287, 1980. p. 755-758.
- ZHANG, X. K.; HOFFMANN, B.; TRAN, P. B.; GRAUPNER, G.; PFAHL, M. **Retinoid X receptor is an auxiliary protein for thyroid hormone and retinoic acid receptors.** Nature, 335, 1992. p. 441-446.