

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**EXPRESSÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL INICIAL
DO RECEPTOR ÓRFÃO NUCLEAR NOR -1 DE RATO**

Dissertação apresentada ao Curso de
Pós-Graduação em Biotecnologia da
Universidade Federal de Santa Catarina
Como requisito parcial para a obtenção
do Grau de Mestre em Biotecnologia
Orientador: Dr. Hernán Terenzi
Departamento de Bioquímica

GUILHERME RAZZERA MACIEL

Novembro, 2004

Abstract

NOR-1 is an orphan member of the nuclear receptor superfamily, which includes a group of transcription factors involved in the response to steroids, fatty acids, retinoic acids, and other lipophilic molecules. The NOR-1 subfamily has been implicated in cell proliferation, differentiation, apoptosis, chondrosarcomas, inflammation, and atherogenesis. The NOR-1 receptor is an orphan ligand receptor which acts over gene transactivation. No ligands, if such in fact exist, are known for this receptor. Recently, the three dimensional structure of the homolog receptor Nurr1 has been solved using protein crystallography techniques. Surprisingly, the structure does not present either a typical cavity for ligand binding or a classical cofactor binding site in the ligand binding domain (LBD). To allow for structural studies of other member of NR4 subfamily, we have overexpressed in *E. coli* cells the rat orphan nuclear receptor NOR-1 AF-1 and LBD domains, purified and characterized recombinant LBD. We obtained NOR-1 LBD at a high degree of purity and with an overall yield of 3 mg/litre of culture media. CD spectroscopy analysis shows high α -helical secondary structure content (52%), compatible to the Nurr1 LBD 3D structure Thermal denaturation monitored by UV absorption and CD spectroscopy suggests proper folding of NOR-1 LBD.

Keywords: nuclear receptor; NOR-1 receptor; NR4 family; expression in *E. coli*; AF-1 and LBD domain.

Resumo

O receptor órfão nuclear NOR-1 é um membro uma superfamília composta por um grupo de fatores de transcrição envolvidos na resposta a esteróides, ácidos graxos, ácidos retinóicos, e outras moléculas lipofílicas. A subfamília de NOR-1 está implicada na proliferação celular, diferenciação, apoptose, condrosarcomas, processos inflamatórios e de aterogênese. O receptor NOR-1 é um órfão de ligante atuando sobre a transativação gênica. Até hoje, nenhum ligante é conhecido para este receptor. A estrutura tridimensional do domínio LBD homólogo, Nurr1, foi resolvida através de técnicas de cristalografia. Surpreendentemente, a estrutura não apresentou a cavidade típica de interação com ligantes, nem um sítio de ligação clássico para co-fatores. Com a finalidade de estudar estruturalmente um outro membro da subfamília NR4, dois de seus domínios AF-1 e LBD foram os focos deste trabalho, realizando-se experimentos de expressão, purificação, e análises preliminares de estrutura por UV e Dicroísmo Circular (CD). O domínio LBD de NOR-1 foi purificado com alto grau de pureza, rendendo 3 mg/litro de meio de cultivo e sua estrutura foi avaliada por UV e CD apresentando um conteúdo de α -hélices de 52 % compatível a estrutura 3D do seu homólogo Nurr1. A desnaturação térmica, monitorada por UV e CD, sugere um correto enovelamento para proteína LBD recombinante.

Palavras-chave: Receptor nuclear; receptor NOR-1; subfamília NR4; expressão em *E. coli*; domínio AF-1 e LBD , CD.

1. Introdução

Os receptores nucleares (RNs) foram primeiramente identificados há 40 anos como receptores intracelulares para alguns esteróides. Passados 20 anos, tornou-se claro que esses receptores esteróides faziam parte de uma superfamília de fatores de transcrição dos metazoários, os quais surgem na evolução, antes da divergência entre vertebrados e invertebrados. Esta superfamília inclui diferentes proteínas responsáveis por estabelecer a ligação direta entre o controle transcricional e as respostas fisiológicas dos organismos, atuando na regulação do desenvolvimento, da sinalização hormonal e do metabolismo (MANGELSDORF *et al.*, 1995; NAGY e SCHWABE, 2004).

O controle metabólico envolve a regulação de diversos processos como: o metabolismo da glicose, através do receptor PPAR γ (*proliferator-activating receptor gamma*); de ácidos graxos, de triglicerídios e de lipoproteínas, via receptores PPAR α , β e γ ; o controle do transporte de colesterol e sua absorção pelos receptores do X fígado (*liver X receptors*) e *liver receptor homolog -1* (LRH - 1); assim como, o metabolismo da ácido biliar pelo FXR (*Farnesol X receptor*); as defesas contra xeno e endobióticos, através dos receptores de xenobóticos e PXR/SXR (*pregnane X receptor/steroid*), entre outros. Há no genoma humano, 48 destes receptores, responsáveis por diversas ações metabólicas (MANGELSDORF *et al.*, 1995; CHAWLA *et al.*, 2001; GORDON *et al.*, 2003).

A atividade de muitos destes receptores é controlada pela ligação de pequenas moléculas lipofílicas (ligantes) que podem ser: hormônios, metabólitos como ácidos graxos, ácidos biliares, oxisteróis, xeno ou endobióticos (figura 1).

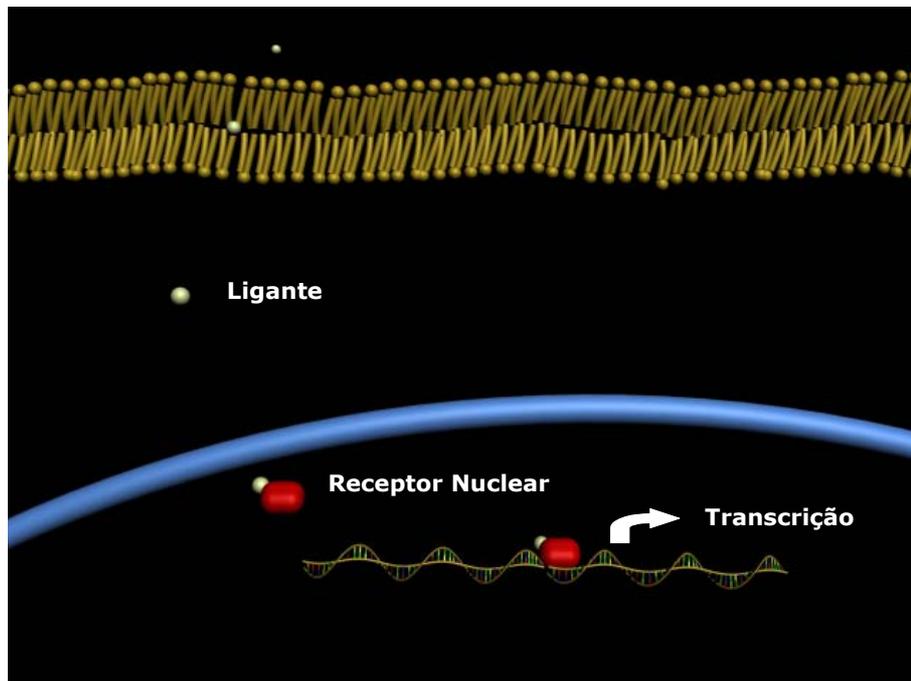


Figura 1. Figura mostrando o mecanismo de ativação dos RNs e sua interação com o DNA.

Muitos destes receptores foram caracterizados antes da identificação de seus ligantes e, por esta razão, eles foram chamados de receptores órfãos, ou

seja, órfãos de ligante. À medida que seus ligantes naturais ou sintéticos foram sendo conhecidos, muitos desses órfãos foram sendo adotados e incluídos em outras subfamílias (CHAWLA *et al.*, 2001).

Pelo fato da importante função dos receptores nucleares como reguladores principais da transcrição gênica e do controle metabólico em geral, sempre houve a intensa busca por novos ligantes para estes receptores com finalidades de estabelecerem-se novas estratégias preventivas e terapêuticas no combate a doenças bastante comuns (GORDON, *et al.* 2003). Em geral, os receptores funcionam como protetores contra distúrbios do metabolismo ou contra tóxicos, atuando na manutenção da homeostase. Frequentemente os ligantes para estes receptores tornam-se excessivos, pois são normalmente, originados da dieta, intermediários metabólicos, drogas, etc. Pelo próprio estilo de vida atual, através do sedentarismo, alta ingestão calórica, exposição a drogas e xenobióticos, as pessoas entram em contato crônico com altas concentrações de ligantes para estes receptores. Desta maneira, sabe-se a alteração da sinalização metabólica por esses disruptores, contribui para a patogenicidade de muitas doenças comuns como diabetes tipo 2, resistência a insulina, obesidade, aterosclerose, hiperlipidemia, síndrome X ou também chamada de pluri-metabólica, ou ainda, processos inflamatórios, Leucemia, entre outras (GORDON *et al.* 2003; LIN, *et al.* 1999; LAUE *et al.*, 1988; KERSTEN *et al.* 2000). A importância dos RNs na fisiologia humana é evidenciada pela extensa quantidade de terapias que tem sido criadas para o tratamento de doenças associadas com a disfunção da sinalização hormonal, por exemplo (WANSA *et al.* 2003). É evidente que a elucidação dos

mecanismos de regulação dos receptores nucleares tem amplas aplicações, seja para o desenvolvimento de drogas, utilizando os receptores como alvos, ou para o próprio entendimento de fenômenos de regulação biológica (NAGY e SCHWABE, 2004). Os receptores LXR tem sido investigados como alvo para o tratamento de doenças cardiovasculares, no entanto, Collins (2004) sugere que seus ligantes (moduladores) poderiam ser usados como agentes terapêuticos para diabetes, inflamação e doenças neurodegenerativas.

Estruturalmente, os RNs possuem uma composição em três domínios bastante conservados evolutivamente. A região N-terminal AF-1 é um domínio independente de ligante envolvido em processos de transativação gênica e recrutamento de coativadores. A essa região tem se atribuída também a função de fosforilação destes co-ativadores (WANSA *et al.*, 2003; GRESCHIK e MORAS, 2003). O domínio altamente conservado DBD – domínio de ligação ao DNA – é composto por dois motivos *zinc fingers* capazes de reconhecer seqüências específicas do DNA. Particularmente este domínio já foi bastante estudado através de investigações bioquímicas e estruturais e seu mecanismo de ligação é bem conhecido (TERENZI *et al.*, 1996,1998; NAGY e SCHWABE, 2004). Finalmente, o domínio de ligação (onde os ligantes se ligam) e dimerização, chamando de LBD (*ligand-binding domain*) (figura 2). Este domínio contém uma região dependente de ativação em sua porção C-terminal chamada de transativação AF-2 (ARANDA e PASCUAL, 2001). Sua estrutura é composta em geral de 12 α -hélices (H1 a H12) com uma inserção pequena de folhas β entre as hélices H5 e H6 (GRESCHICK e MORAS, 2003).

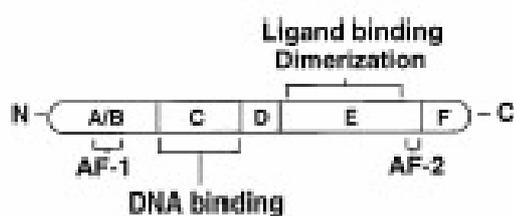


Figura 2. Representação esquemática dos receptores nucleares, mostrando os domínios AF-1 (região A/B), DBD (região C) e LBD (região D, E e F).

O domínio LBD, estruturado em α -hélices, apresenta em uma de suas extremidades a ausência de hélices gerando um espaço para abrigar o ligante. Este, por sua vez, fica envolvido por hélices e uma estrutura em folha – β . Esta cavidade pode variar em tamanho abrigando diferentes ligantes. Alguns receptores de cavidade menor como os hormonais TR (receptor de hormônio tireoidiano) e ER (receptor de estrógeno) são específicos para estes ligantes. Já os PPAR γ e PXR, com cavidade maior, acomodam vários ligantes em diferentes orientações. Sugere-se que a interação com o ligante estabilize a molécula tornando-a mais compacta e rígida (NAGY e SCHWABE, 2004).

A subfamília NR4A está envolvida com a proliferação e diferenciação celular, apoptose, condrosarcomas, processos inflamatórios e aterogênese (MURPHY *et al.*, 2001, ARKENBOUT *et al.*, 2002; MONAJEMI *et al.*, 2001; ZHANG, 2002; MALTAIS *et al.*, 2002). Os receptores desta subfamília compartilham extensa homologia em sua região de ligação ao DNA (DBD) e na região LBD, porém divergem significativamente na porção N-terminal (IWAWAKI *et al.*, 2000). Muitas estruturas tridimensionais já foram elucidadas para o domínio LBD. No entanto, a primeira estrutura múltipla de domínios (DBD-LBD) foi recentemente revelada por Cristalografia de raios - X a baixa resolução (FISCHER *et al.*, 2002).

O receptor órfão nuclear NOR-1 (*Neuron-derived orphan receptor – 1*) ou NR4A3 e seus homólogos Nurr1 e Nur77, tem mostrado papel importante na regulação da expressão de vários genes do eixo adrenal-pituitário-hipotalâmico. Pela homologia de seqüências e análise das propriedades de trans-ativação, NOR-1 e Nur77 apresentam uma estrutura global e organização funcional similares (FERNANDEZ *et al.*, 2000). Sabe-se que a liberação de hormônios corticotrópicos nas células pituitárias e adrenais induzem a expressão de NOR-1 e Nur77, exemplificando seus papéis na esteriodogênese. Em concordância com o papel de NOR-1 em processos inflamatórios e na carcinogênese, NOR-1 é ativado por uma droga anti-câncer e anti-inflamatória 6-mercaptopurine. Foi demonstrado que NOR-1 é um mediador da transcrição e recrutador de co-fatores, operando de maneira dependendo de seu domínio AF-1. Além disso, o domínio AF-1 é requerido para a transativação de outros genes alvo por NOR-1 (WANSA *et al.*,

2003). Sabe-se também do seu papel na regulação da cascata de proteínas quinases dependentes de calmolulina - Ca^{2+} (INUZUKAA *et al.*, 2002) e sua indução por hormônios da paratireóide em osteoblastos (PIRIH *et al.*, 2003).

Muitos agonistas dos RNs já foram identificados, tais como os ácidos graxos, os oxisteróis e ácidos biliares, dando suporte a idéia de que a maioria dos RNs são regulados por ligantes. Por outro lado, estudos estruturais de receptores órfãos indicam que vários receptores nucleares, como o fator nuclear do hepatócito 4 α (HNF4 α) e HNF4 γ , são capazes de se ligarem a ligantes, mas não são regulados por eles (WISELY *et al.*, 2002; DHE-PAGANON *et al.*, 2002).

A dúvida sobre a estrutura destes receptores órfãos começou a ser esclarecida recentemente, no momento em que estrutura cristalina do domínio Nurr1 LBD foi resolvida. A estrutura foi resolvida a 2,2 Å de resolução e duas características distintas diferenciam-no dos demais Receptores Nucleares. Este domínio LBD possui um enovelamento canônico sem a cavidade esperada para a ligação das moléculas ligantes. Isto, resultado de um estreitamento de cadeias laterais dos resíduos hidrofóbicos que normalmente são ocupados por ligantes. Além disso, a este LBD lhe falta um sítio clássico para co-reguladores (WANG *et al.*, 2003) (figura 3). Recentemente através de técnicas de NMR (Codina A. *et al.* 2004) mostrou-se uma nova superfície de interação com co-reguladores para o domínio LBD de Nurr1, envolvendo as hélices 11 e 12.

Acredita-se que os receptores que aparentemente não possuem uma cavidade de ligação não sejam regulados por ligantes convencionais sendo

constitutivamente ativos, ou regulados por um outro mecanismo (NAGY e SCHWABE, 2004). Outros membros da subfamília NR4 ainda não foram caracterizados estruturalmente (GRESCHICK e MORAS, 2003).

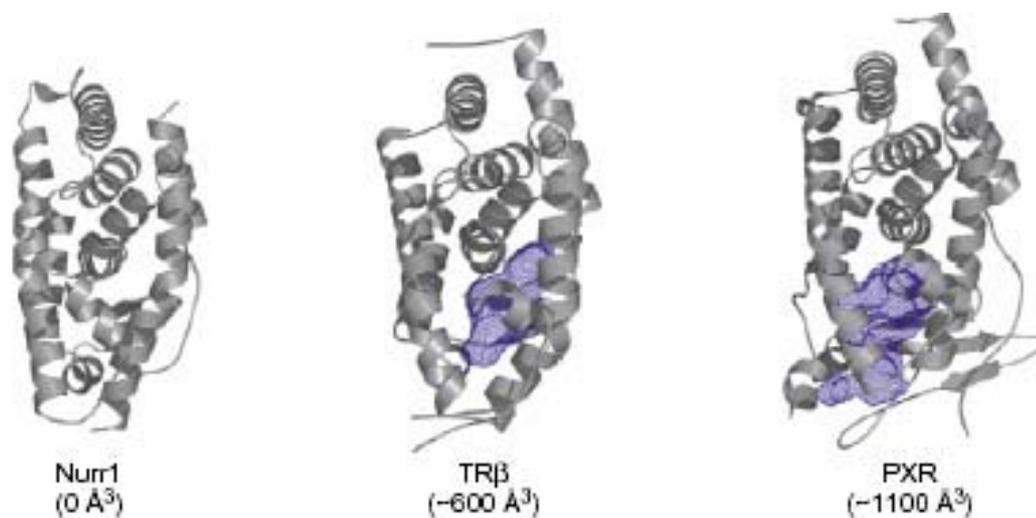


Figura 3. Estrutura do receptor Nurr1 em A. Em B, a cavidade fechada característica do domínio.

Para investigar as características estruturais de outro membro da subfamília NR4, apresentamos os resultados de purificação e caracterização estrutural preliminar do receptor órfão NOR-1, com objetivos de servir como base para

estudos estruturais posteriores. Os domínios AF-1 e LBD de NOR-1 foram os alvos do estudo.

2. Objetivos

2.1 Gerais

Caracterização estrutural do receptor órfão nuclear NOR-1 de *Rattus norvegicus*.

2.2 Específicos

- Expressar os domínios AF-1 e LBD do receptor NOR-1;
- Purificar as proteínas expressas;
- Caracterizar estruturalmente as proteínas que forem purificadas por UV e CD.

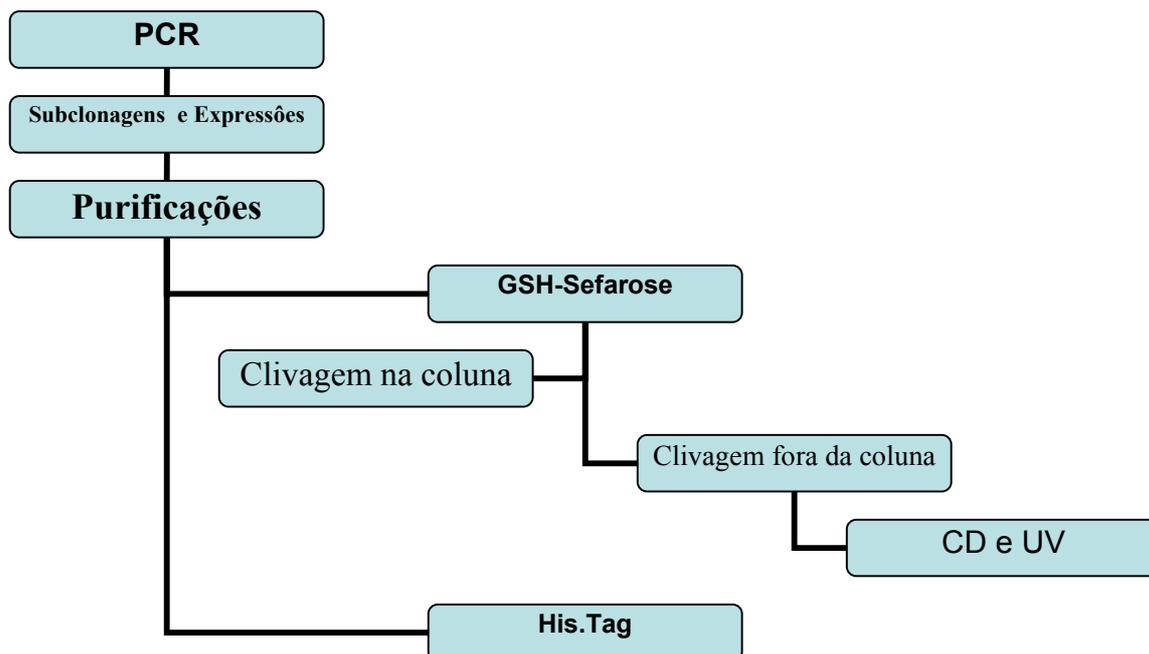


Figura 4. Representação esquemática dos principais passos metodológicos.

3. Matérias e métodos

3.1 Construção dos vetores de expressão pET-AF-1 e pET -LBD

3.1.1 Amplificação por PCR

Os fragmentos correspondentes a 879 bp (AF-1 – amino ácidos 1 ao 293) e 744bp (LBD – amino ácidos 380 ao 628) foram amplificados por PCR, utilizando vetores pGEX-AF1 e pGEX-LBD (plasmídios contendo os domínios de interesse) como DNA molde. O programa de amplificação e os iniciadores estão relacionados abaixo:

Programa de amplificação por PCR:

Passo 1: 95°C - 5 min;

Passo 2: 95°C - 1 min;

Passo 3: 55°C - 30 seg;

Passo 4: 72°C - 1 min;

Passo 5: Ciclos 2, 3 e 4 repetidos por 40 vezes.

Passo 6: 72°C - 10 min.

Iniciadores utilizados:

5` - 3` AF-1: ggt ttt cat atg ccc tgc gta caa

P C V Q

3` - 5` AF-1: gta aaa gga tcc tta cgt gcc ctc gcc gga

Stop T G E G S

5` - 3` LBD: gga ttt cat atg cca aag agc cca cta

P K S P L

3` - 5` LBD: gta aac gga tcc tca gaa agg cag ggt atc

Stop F P L T D

Para a reação de PCR, utilizou-se de 2-4 µg de DNA plasmidial, 1,5 mM MgCl₂, 1 unidade de Taq DNA Polimerase (PCR Buffer 10X: 200mM Tris-HCl pH 8,4, 500mM KCl), 0,2mM de cada dNTP, e 1 µM de cada iniciador, sendo o volume final da reação de 25µl. A reação foi realizada no termociclador Modelo

PTC 150 Mini Cycler, MJ Research. O controle de reação foi o DNA do plasmídeo pDBD 86-174 que contém o domínio de ligação ao DNA do receptor nuclear Rev-erb β (TERENZI *et al.*, 1998).

3.2 Análise em gel de agarose

Após a amplificação, a visualização se deu por gel de agarose 1% (ref), corado com brometo de etídio e exposto a luz ultravioleta. As imagens foram registradas por um sistema de foto-documentação UVP INC.

3.3 Purificação de DNA plasmídial e de fragmentos de DNA

Os fragmentos de DNA amplificados por PCR foram cortados do gel e purificados através do Kit (Concert™ Matrix gel extraction system).

3.4 Digestão com enzimas de restrição e Ligação ao vetor pET14b

Com a confirmação da purificação, tanto os fragmentos purificados como o vetor pET14b foram digeridos com as enzimas BamHI e NdeI (reação: 1 unidade de cada enzima, Tampão 1X, BSA 0,1% e 1 μ g de DNA) *overnight* a 37°C. Feita uma nova purificação, as reações de ligação (4 μ l DNA ligase, Tampão da ligase 1X) em proporções DNA do inserto / DNA plasmídial de 1:1, 2:1 e 3:1, ocorreram *overnight* a 8°C. As soluções das reações de ligação foram transformadas em bactérias *E.coli* XL1blue.

3.5 Extração de DNA plasmídial

Após o crescimento das colônias em placas LB/Ampicilina/IPTG/X-Gal, foram selecionadas colônias brancas e azuis. Com um ponteira foi retirada uma colônia e colocada em um tubo contendo 3 ml de LB e 3 μ l de Ampicilina (50mg/ml). As colônias cresceram *overnight*. Este procedimento foi realizado para

coleta de várias colônias da mesma placa, para aumentar as chances de obtenção do clone desejado. O procedimento foi seguido de acordo com Ausubel *et al.* (1995) e o DNA plasmidial obtido da extração foi analisado em gel de agarose 1%.

Para o sequenciamento o Kit (Amersham) foi utilizado, seguindo as instruções do fabricante, para obter maior massa de DNA.

3.6 Transformação em bactérias competentes

Os plasmídios de interesse (1-2 μ l resultantes das extrações) foram adicionados às bactérias competentes XL1blue, DH5 α , BL21 codon plus e BL21 DE3 (50 μ l), preparadas de acordo com Ausubel *et al.* (1995) a 4°C por 20 min. Em seguida, as amostras foram colocadas em banho a 42 °C por 1 min e novamente colocadas no gelo. Aos tubos foram adicionados 1 ml de meio LB e foram incubados a 37°C por 1h. Após este período, os tubos foram centrifugados por 3 min a 2000 g.

Foram removidos 750 μ l do sobrenadante para serem desprezados, sendo o restante utilizado para ressuspender as células. A suspensão de células foi então espalhada sobre uma placa de meio LB sólido (1% peptona, 0,5% Extrato de levedura, 0,5% NaCl, 1,5% de Agar, pH 7,5), contendo Ampicilina 50 μ g/ml, IPTG (isopropil $-\beta$ -D-tiogalactosídeo) 1,5 mM, X-Gal (5-bromo-4 cloro-3-indolil- β -D-galactosídeo) 80 μ g/ml e a placa colocada em estufa a 37°C por 16-20h (AUSUBEL *et al.* 1995).

3.7 Expressão das proteínas recombinantes em *Escherichia coli*

Os domínios AF-1 e LBD foram expressos utilizando-se dois sistemas. No primeiro, os domínios foram inseridos em pGEX-2T 128/129 (BLANAR *et al.*, 1992) posterior ao gene que codifica a proteína GST (glutathione $-S$ - transferase).

Portanto, a expressão dos domínios se dá fusionada a esta proteína, entre eles ainda encontra-se um pequeno peptídeo de identificação (*gsdykddddkarrasvef*) do próprio vetor. O segundo sistema utiliza o vetor pET14b que expressa uma cauda N-terminal de 6 histidinas à proteína recombinante. As seqüências das proteínas incluindo os peptídios fusionados (em itálico) são:

O domínio LBD expresso em pGEX-2T (30,138.5 Daltons) correspondente aos amino ácidos 380 a 628:

*sdykddddkarrasvef*PKSPLQQE~~PSQSPSPSP~~ICMMNALV~~RALTDATPRDL~~DYSRYCPTDQATAGTDAEHVQQFY~~NLLTASIDVSR~~SWAEKIPGFTDLPKEDQ~~TLLIESAFLEL~~FVLRLSIRSNTAEDKFVFCNGLV~~LHRLQCLRG~~FGEWLDSIKDFSLNLQSLNLDIQALACLSALSMITERHGLKEPKRVEELCNKITSS~~LKD~~HQRKGOALEPSEP~~KVLRALVEL~~RKICTQGLQRIFYLKLEDLVSPSPVIDKLF~~LDTL~~PF

O domínio AF-1 expresso em pGEX-2T (32780.6 Daltons) correspondente aos amino ácidos 1 a 293:

*GSDYKDDDDKARRASVEFMPCVQAQYSPSPPGSTYATQTYGSEY*TTEIMNPDYAKLTMDLGSTGIMATAT~~TSLPSFSTFM~~EGYPSSCELKPSCLYQMPPSGPRPLIKMEEGREHGYHHHHHHHHHHHHHHHQQQQPSIPPPSGPEDEVLPSTSMYFKQSPSTPTTPGFPPQAGALWDELPSAPGCIAPGPLLDPQMKA~~VPPMAAAARFPIFFK~~PSPHPAPSPAGGHHLGYDPTAAAALSLPLGAAAAAGSQAAALEGHPYGLPLAKRTATLTFPPLGLTASPTASSLLGESPSLPSPPNRSSSGEGTE~~FFIV~~Dstop

O domínio LBD expresso em pET14b (30245.70 Daltons):

*MGSSHHHHHHSSGLVPRGSH*PKSPLQQE~~PSQSPSPSP~~ICMMNALV~~RALTDATPRDL~~DYSRYCPTDQATAGTDAEHVQQFY~~NLLTASIDVSR~~SWAEKIPGFTDLPKEDQ~~TLLIESAFLEL~~FVLRLSIRSNTAEDKFVFCNGLV~~LHRLQCLRG~~FGEWLDSIKDFSLNLQSLNLDIQALACLSALSMITERHGLKEPKRVEELCNKITSS~~LKD~~HQRKGOALEPSEP~~KVLRALVEL~~RKICTQGLQRIFYLKLEDLVSPSPVIDKLF~~LDTL~~PFstop

O domínio AF-1 expresso em pET14b (32887.79 Daltons):

*GSSHHHHHHSSGLVPRGSH*MPCVQAQYSPSPPGSTYATQTYGSEYTTEIMNPDYAKLTMDLGSTGIMATAT~~TSLPSFSTFM~~EGYPSSCELKPSCLYQMPPSGPRPLIKMEEGREHGYHHHHHHHHHHHHHHHQQQQPSIPPPSGPEDEVLPSTSMYFKQSPSTPTTPGFPPQAGALWDELPSAPGCIAPGPLLDPQMKA~~VPPMAAAARFPIFFK~~PSPHPAPSPAGGHHLGYDPTAAAALSLPLGAAAAAGSQAAALEGHPYGLPLAKRTATLTFPPLGLTASPTASSLLGESPSLPSPPNRSSSGEGTstop

Para os vetores pGEX, as bactérias utilizadas foram do tipo DH5 α . Para pET14b utilizou-se linhagens BL21 codon plus e BL21 DE3. Após a transformação, as DH5 α foram expressas em 0,8 ou 1,7 D.O a 600nm, dependendo do experimento, e as BL21 expressas em 0,8 D.O a 600 nm. O meio

de cultivo utilizado foi o LB (*luria bertani*) com 0,1 mg/ml do antibiótico ampicilina. O tempo de indução variou de 4 à 16h (*overnight*) testando-se temperaturas entre 25 e 37°C. O agente indutor foi o IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranosida) em concentrações de 0,2 ou 1,0 μM. Todos os experimentos foram realizados sob agitação a 150 rpm.

3.8 Purificação de Proteínas

As células bacterianas foram centrifugadas a 6000g e o precipitado a partir de 1000 ml de cultura foi suspenso em 20 ml de tampão. Para pGEX utilizou-se o tampão fosfato pH 7,4 (PBS) com DTT – ditioneitol (5mM para LBD e 1mM para AF-1) e inibidores de protease (completeTM, Mini, Boehringer Mannheim). Para pET 40 ml de tampão fosfato com 10 mM de imidazol. As mesmas concentrações de DTT e os mesmos inibidores de protease usados para pGEX, foram adicionados. As células foram rompidas através de sonicador (4 ciclos/20s) a 4°C. Triton X-100 foi adicionado a uma concentração final de 1%, e a suspensão foi centrifugada por 20 min a 15000g. Os sobrenadantes de pGEX foram encubados por 90 min a °C com 2ml de resina glutationa –sefarose (GSH-Sepharose 4B - Amersham). A resina foi lavada com 30 volumes de PBS. Neste passo de purificação foram utilizadas duas metodologias:

Clivagem da proteína fusão na coluna:

A coluna de purificação foi lavada com 10 volumes de tampão de clivagem da trombina (50 mM de Tris-HCl, pH 8, 150 mM de NaCl, 2.5 mM de CaCl₂ e 5 mM de DTT para LBD e 1mM DTT para AF-1). A enzima foi adicionada à resina a 1 unidade de trombina /100 μg de proteína fusão.

Clivagem da proteína fusão fora da coluna:

A proteína fusão foi eluída com 10 ml de glutathione reduzida (GSH) a 10 mM. As frações de eluição foram concentradas por ultrafiltração utilizando Membranas Amicom (Millipore) e o tampão foi trocado para clivagem com trombina no mesmo tubo concentrador. Deste modo a GSH foi eliminada. A proteína fusão foi digerida com trombina (1 unidade de trombina/100 µg de proteína fusão) no mesmo tampão de clivagem citado anteriormente. A proteína clivada foi encubada por 2 h a 4°C com 2mL de glutathione-sefarose.

Em ambos os casos as frações de eluição, correspondentes a cada passo de purificação, foram coletadas e analisadas por SDS – PAGE.

Para a purificação das proteínas expressas com o vetor pET14b, o sobrenadante foi aplicado diretamente a resina já carregada com sulfato de níquel - HiTrap chelating (Amersham) de 1mL. As resinas foram pré-tratadas com 10 ml de água, e 10 ml do mesmo tampão fosfato da suspensão inicial. Após a passagem do extrato protéico a resina foi lavada com 10 ml PBS (10mM Imidazol) e posteriormente com 6 ml de um tampão de lavagem (PBS 7,4 com 20mM de Imidazol). As eluições foram feitas com gradientes de Imidazol de 50mM a 200mM e os passos de purificação foram analisados por SDS-PAGE.

3.9 SDS –PAGE

Os géis SDS PAGE (LAEMMLI, 1951) foram utilizados. Géis de separação contínuos com concentrações de 10 % ou 12 % de acrilamida foram feitos com géis de empilhamento a 4 % de acrilamida, segundo Celis *et al.* (1998).

As amostras foram solubilizadas em um tampão de amostra contendo Tris.Cl pH 6.8, glicerol 20%, SDS 4%, DTT 50 mM, Azul de bromofenol 0,001%, aquecidas por 4 min a 95 °C e aplicadas a sistemas BioRad ou Amersham com auxílio de microseringa.

3.10 Coloração de géis SDS – PAGE

A coloração foi feita através do corante azul de coomassie CBR – 250, onde o gel foi inicialmente equilibrado em solução metanólica (Metanol 45 %, Ac.Acético 10 %, CBR-250 1 % e H₂O 45 %) por 1h e descorado em solução contendo 50 % metanol e 10% Ac. Acético (Celis *et al.* 1998).

Na coloração por de Nitrato de prata, foi feito um tratamento inicial com solução de fixação (50 % metanol 50%; Ac. Acético12%; formaldeído 37% - 0,5 mL) *overnight* seguido de uma lavagem com etanol 30%. Os géis foram tratados com uma solução de tiosulfato de sódio (0,2 g/L) e impregnados com solução de Nitrato de prata (2g/L) e formaldeído 37% (0,75 mL/L) por 30 minutos. Lavou-se com água destilada e a revelação foi feita com uma solução à base de Carbonato de cálcio (Na₂CO₃ – 60g/L; HCOH 37% - 0,5 mL/L; Na₂S₂O₃.5H₂O – 4mg/L) por aproximadamente 10 minutos. A reação foi interrompida com uma solução de Metanol 50% e Ac. Acético 12% por 10 minutos, seguido de uma lavagem com Metanol 50% (BIUM *et al.*,1987).

3.11 Secagem dos géis

Os géis foram colocados entre folhas de celofane umedecidas com Glicerol 3 %. Estes foram esticados sobre uma placa de vidro e colocados em uma estufa a 50 °C.

3.12 Dosagem de Proteínas

O método de Bradford foi utilizado (AUSUBEL *et al.*, 1995). A curva-padrão foi feita com a proteína BSA (Bovine Serum albumin), com concentrações de 2.5, 5, 7.5, e 10 µg. Através da plotagem dos dados obtidos por espectrofotometria, medidos a 545nm, a concentração de proteínas foi determinada. Todas as amostras foram feitas em duplicatas.

3.13 Seqüenciamento N-Terminal

As proteínas purificadas foram separadas por SDS-PAGE e transferidas para membranas de PVDF. As bandas de interesse foram cortadas e submetidas a seqüenciamento N-terminal através do método de degradação de Edman em seqüenciador Applied Biosystems Procise Sequencer.

3.14 Espectrometria de Massa

As amostras (10 μ M) foram analisadas por SELDI (Surface – enhanced Laser Desorption/ Ionization) através de um espectrômetro de massa CIPHERGEN (análises feitas por Pablo Fernandez - Instituto Pasteur, FR).

3.15 Desnaturação térmica monitorada por UV

As análises foram realizadas a 55 °C usando um espectrofotômetro Ultrospec 3100 pro (Amersham) a 280 nm e monitorando o sinal entre 0 e 2,5 horas. Os experimentos foram medidos em triplicata (GINSBURG *et al.*, 1965).

3.16 Dicroísmo Circular (CD)

Os espectros de CD foram medidos em um intervalo de comprimentos de onda variando de 200 a 250 nm a 4°C obtendo-se a média de 5 espectros com velocidade de varredura de 100 nm/min e resolução de 0,1 nm a cada passo. A temperatura foi aumentada em 1°C a cada minuto. O aparelho utilizado foi um espectropolarímetro Jasco J-715 equipado com uma unidade peltier. O conteúdo de α -hélices de LBD purificado foi monitorada através do pico 222nm durante uma desnaturação térmica de 4 ou 20 °C (dependendo do experimento) até 80 °C. Todas as medidas foram convertidas para MRE (mean residue ellipticity) e

realizadas em cubeta de 0,1 mm de espessura. A concentração de amostra utilizada foi de 10 μ M em tampão PBS. O espectro de calibração (com somente PBS) foi subtraído de todos os espectros medidos. O programa CDSSTR foi utilizado para determinar o conteúdo de estruturas secundárias a partir dos espectros.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Subclonagens em vetores de expressão

Os domínios AF-1 e LBD, do receptor nuclear órfão NOR-1, foram subclonados em vetores de expressão tendo como base suas funções, conservadas evolutivamente. Os fragmentos de DNA amplificados por PCR, correspondentes ao domínio AF-1 (do aminoácido 1 ao 293) e ao domínio LBD (do aminoácido 380 ao 628) foram inseridos no vetor pET14b. Os novos vetores de expressão foram chamados pET-LBD e pET-AF-1. Os vetores foram seqüenciados e para um deles (pET-AF-1) não foi confirmada a seqüência esperada.

Na figura 1 observam-se os alinhamentos correspondentes a proteínas homólogas do NOR-1: Nurr1 e Ngfi- β . As regiões em destaque representam os domínios AF-1 e LBD. Pode-se observar também que a homologia do receptor na porção do domínio LBD é maior que na região N-terminal AF-1, quando comparado com os outros receptores da mesma subfamília NR4 (figuras 2, 3 e 4).

CLUSTAL FORMAT, CPU=1.65 sec, SCORE=74, Nseq=3, Len=647

```
NOR-1      MPCVQAQYSPSPGSTYATQTYG---SEYTTTEIMNPDYAKLTMDLGSTGIMATATTSLE
Nurr1      MPCVQAQYGSPPQGASPASQSYHSSGEYSSDFLTPEFVKFSMDLTNTEI--TATTSLE
Ngfi-B     -----MDLASEPETAPTAPATLE
                                         *** .. **::**

NOR-1      SFSTFMEGYPSS-CELKPSCLYQMPPSGPRPLIKMEEGREHGYHHHHHHHHHHHHHQOQ
Nurr1      SFSTFMDNYSTG-YDVKPPCLYQMPLSGQQSSIKVEDIQMHNYQQHSH-----
Ngfi-B     SFSTFMDGGYTGEFD---TFLYQLPGTAQPCSSASSTSSSSSSATSPASASFKFEDFQVY
*****: . :. : . ***:* :. . .

NOR-1      QPSIPPPSGPEDEVLP-STSMYF--KQSPPSTPTTPGFPPQAGALWDELPS-APGCIAP
Nurr1      ---LPPQS---EEMPHSGSVYY--KPSPPPTPSTPGFQVQHSPMWDGSLHNFHQNYV
Ngfi-B     GCYPGTLSGPLDETLSSSGSDYYGSPCSAPSPPTPNFQPSQLSPWDGSGFHFSPSQTYE
      . * :* :. * . : . . . . :*.*.* . . **

NOR-1      GPLLDPQMKAVPPMAAARFPIF-FKPSPPHPAPSPAGGHHLYDPTAAAALSLPLGAA
Nurr1      A--T-THMIE-QRKTPVSRSLSLSFKQSPPGTPVSS----CQMRFD----GPLHVPNMPE
Ngfi-B     G--LRVWTEQLPKASGPPPPPTF-FSFSPTTGPSPSLA-----QSSLKLFPA
      . : . . * * .*** * .* : : .
```

```

NOR-1 AAAGSQAAALEGHPYGLPLA-KRTATLTFPPLGLTASPTASSLLGESPSLSPPPNRSSSS
Nurr1 PA-GSHHV-VDGQTFVAVPNPIRKPASMGFPGLQI---GHASQLL--DTQVPSPPSRGSPS
Ngfi-B PA--THQL-GEGESYSVPAAF-----PGLAPTS PNC DTS GILDAP-VTSTKARSGSS
.* :: :*...:* . * * :. : . :.* *...*

NOR-1 --GEGTCAVCGDNAACQHYGVRTCEGCKGFFKRTVQKNAKYVCLANKNCPVDKRRNRRCQ
Nurr1 --NEGLCAVCGDNAACQHYGVRTCEGCKGFFKRTVQKNAKYVCLANKNCPVDKRRNRRCQ
Ngfi-B GGSEGRCAVCGDNAACQHYGVRTCEGCKGFFKRTVQKSAKYICLANKDCPVDRRRNRRCQ
.* * *****:*****.*****.*****.*****.*****.*****

NOR-1 YCRFQKCLSVGMVKEVVRTDSLKGRRGRRLPSKPKSPLQQEPPSQSPSPSPICMNNALVRA
Nurr1 YCRFQKCLAVGMVKEVVRTDSLKGRRGRRLPSKPKS-----PQDPSPPSPVSLISALVRA
Ngfi-B FCRFQKCLAVGMVKEVVRTDSLKGRRGRRLPSKPKQ-----PPDAS----PTNLLTSLIRA
:*****:*****.*****.*****.*****.*****.*****

NOR-1 LTDATPR--DLDYSRYCPT-DQATAGTDAEHVQQFYNLLTASIDVSRSWAEKIPGFTDLP
Nurr1 HVDSNPAMTSLDYSRFQANPDYQMSGDDTQHIQQFYDLLTGSMEIIRGWAEKIPGFADLP
Ngfi-B HLDGPNATAKLDYSKFQELVLPFRFGKEDAGDVQQFYDLLSGSLDVIRKWAEEKIPGFIELS
.* * .*****: . * :. :*****.*****: * ***** :*.

NOR-1 KEDQTLLESFAFLELFVLRLSIRSNTAEDKFVFCNGLVLRHLQCLRGFGEWLDSIKDFSL
Nurr1 KADQDLLESFAFLELFVLRRLAYRSNPVEGKLIFCNGVLRHLQCVRGFGEWIDSIVEFSS
Ngfi-B PGDQDLLESFAFLELFILRLAYRSKPGEGKLIFCSGVLRHLQCARGFGDWIDNILAFSR
** **:******:***: **.. * .*:**.*:***** ***:**.* **

NOR-1 NLQSLNLDIQALACLALSMTERRHGLKEPKRVEELCNKITSSLKDHQR--KGOALEPSE
Nurr1 NLQNMNIDISAFSCIAALAMVTERHGLKEPKRVEELQNKIVNCLKDHVTFNNGGLNRPNY
Ngfi-B SLHSLGVDVPFAFLSALVLRITDRHGLQDPRRVEELQNRASCLKEHMAAVAGDPQPASC
.*:..*: * :*:** * :*:*****:***** * :*...*: * * ..

NOR-1 -PKVLRALVELRKICTQGLQRIFYLKLEDLVSPSPVIDKFLDITLPI
Nurr1 LSKLLGKLPRLTCTQGLQRIFYLKLEDLVPPPAILDKFLDITLPI
Ngfi-B LSRLGKLPRLTCTQGLQRIFCLEKLEDLVPPPPIVDKIFMDITLPI
.:* * ***:***** *****.*****.*****:*****.*

```

Figura 1. Resultado do alinhamento dos receptores nucleares da subfamília NR4 de *Rattus norvegicus* utilizando o programa ClustalW 1.82. A região correspondente à porção N-terminal AF-1 está representada em amarelo e o domínio LBD em azul.

```

T-COFFEE, Version_1.41(Fri Jun 28 14:24:48 MDT 2002)
Notredame, Higgins, Heringa, JMB(302)pp205-217,2000
CPU TIME:1 sec.
SCORE=74
*
BAD AVG GOOD
*
NOR-1 : 74
Nurr1 : 75
Ngfi-B : 73

NOR-1 MPCVQAQYSPSPPGSTYATQTYG---SEYTEIMNPDYAKLTMDLGSGTGMATATTSLPSFS
Nurr1 MPCVQAQYGSSPQGASPASQSYSHSSGEYSSDFLTPEFVKFSMDLTNTEI--TATTSLPSFS
Ngfi-B -----MDLASPETAPATAPATLPSFS

Cons [amarelo] [azul] *** . [azul] ***.:*****

```


domínio LBD de Nurr1 já foi descrita. Sua cavidade de ligação é bloqueada por resíduos hidrofóbicos conservados nos três membros da família NR4 (WANG *et al.*, 2003). A superfície de interação com co-ativadores observada em Nurr1 é diferente dos outros receptores nucleares e envolve os aminoácidos R418 e F439. Em NOR-1 o R418 é conservado, entretanto o F439 é substituído por isoleucina (WANG *et al.*, 2003), podendo exercer um papel funcional ou estrutural para esta região. Codina *et al.* (2004) descrevem para o receptor Nurr1 uma nova superfície de interação com co-reguladores. Os aminoácidos envolvidos (L570, F574, F592, L593, L596 e F598) são conservados em NOR-1 e provavelmente tenham a mesma função.

Os domínios AF-1 e LBD já encontravam-se subclonados em pGEX-2T, trabalho realizado no laboratório de Mario Zakin, Instituto Pasteur, França. A clonagem nos vetores pET14b se deu a partir dos vetores pGEX, pela necessidade de outra metodologia de purificação (adição de uma cauda de histidinas para purificação de afinidade por níquel), principalmente para o domínio AF-1. Os fragmentos de DNA amplificados de 879bp e 744bp correspondentes aos domínios AF-1 e LBD respectivamente, foram amplificados utilizando o programa descrito em materiais e métodos (figura 5). Após amplificação, os fragmentos foram cortados do gel de agarose e purificados (figura 6). Feita a ligação nos vetores pET, a verificação da clonagem se deu por PCR e por digestão com enzimas de restrição (figuras 7 e 8).

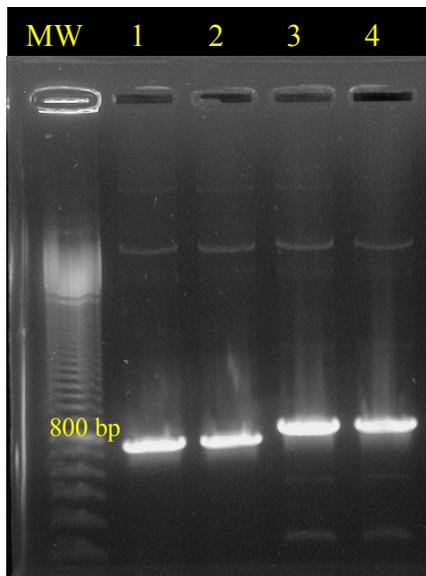


Figura 5. Amplificação por PCR dos domínios LBD (1 e 2) e AF-1 (3 e 4).

A diferença de tamanhos observada é um bom indicativo de que os fragmentos amplificados são os esperados.

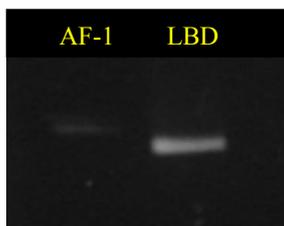


Figura 6. Fragmentos de DNA purificados de AF-1 e LBD.

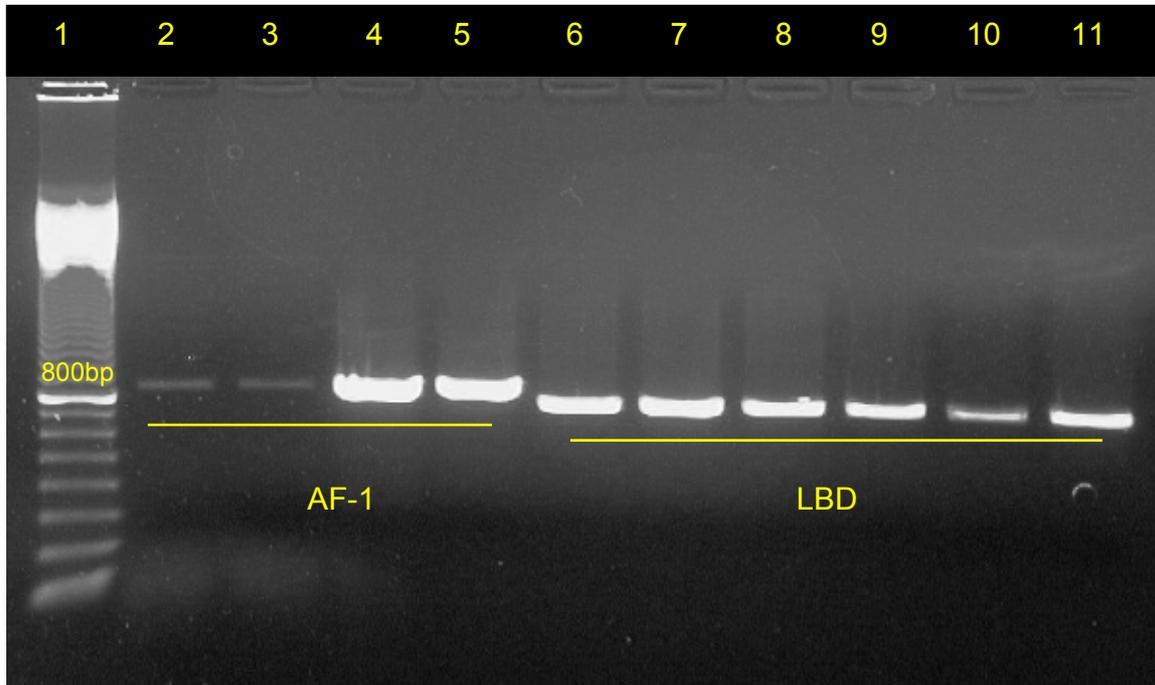


Figura 7. Amplificação por PCR dos vetores pET-AF1 (2 a 5) e pET-LBD (6 a 11).

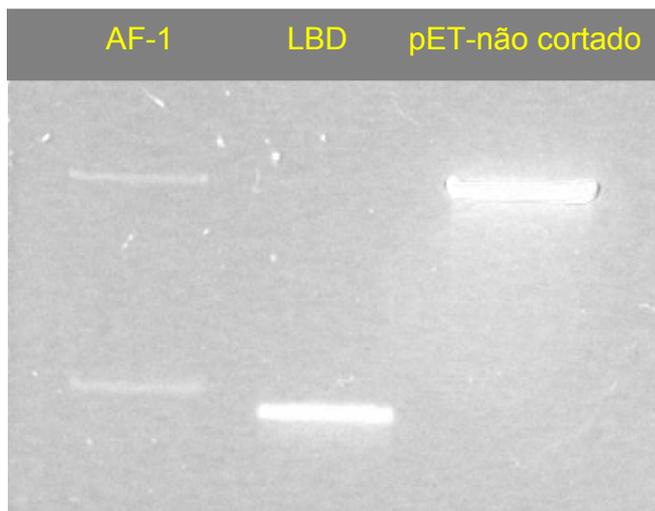


Figura 8. Teste de digestão dos vetores pET-AF-1 e pET-LBD com EcoRI e BamHI.

Nos diagramas esquemáticos da figura 9 estão representadas as construções dos vetores de expressão utilizados para expressão das proteínas.

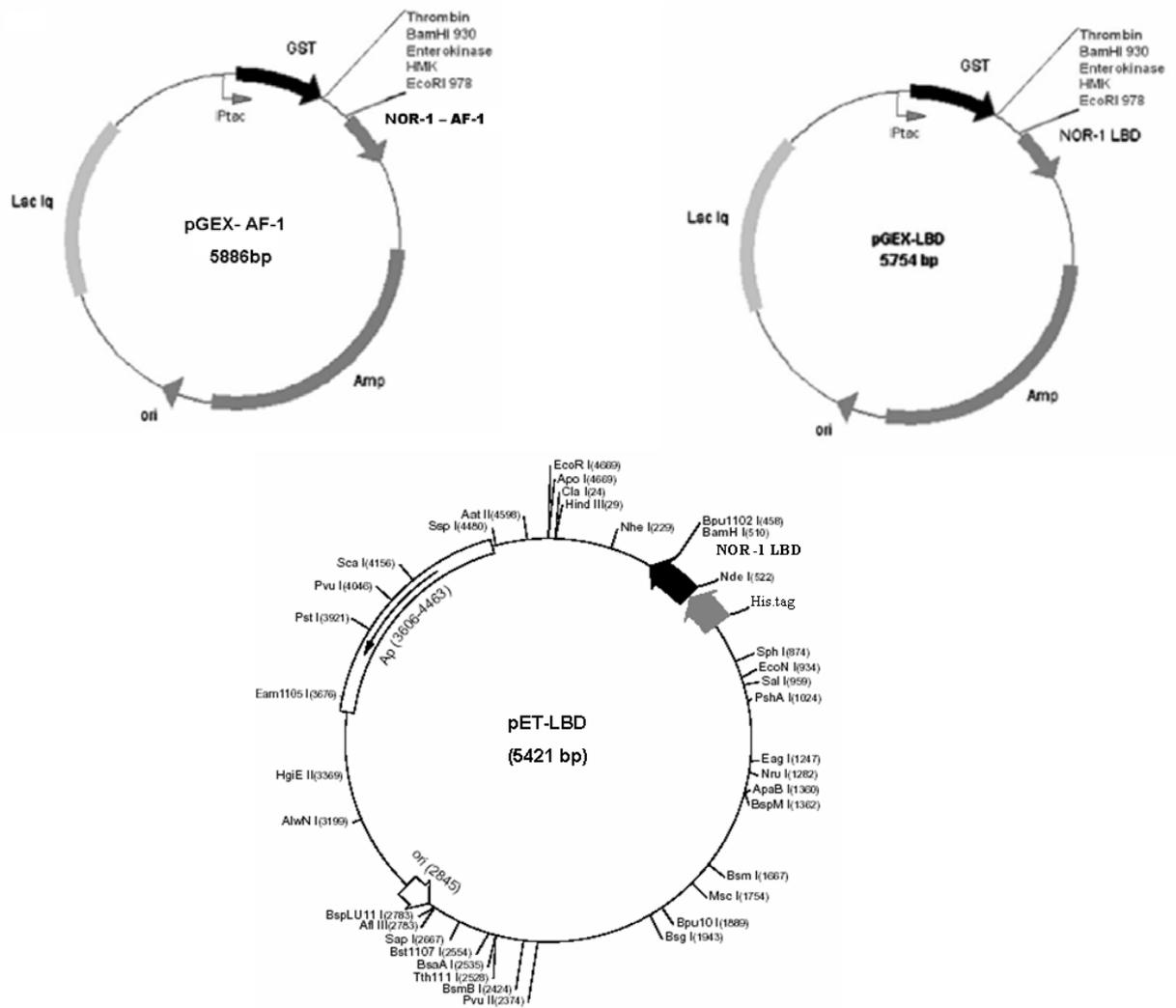


Figura 9. Vetores utilizados para expressão dos domínios AF-1 e LBD do receptor NOR -1.

4.2 Expressão das proteínas recombinantes

Diferentes condições para expressão de AF-1 e LBD foram testadas. Inicialmente o domínio AF-1, suclonado em pGEX, foi expresso e avaliado nos tempos 0, 2, 4, 6 e 8 horas, utilizando-se 1 mM de IPTG a 1 D.O em bactérias *E.coli* DH5 α . Foi facilmente perceptível o aumento da expressão em tempos mais longos como em 6 e 8 horas. Neste teste, somente o extrato total das bactérias foi analisado (figura 6).

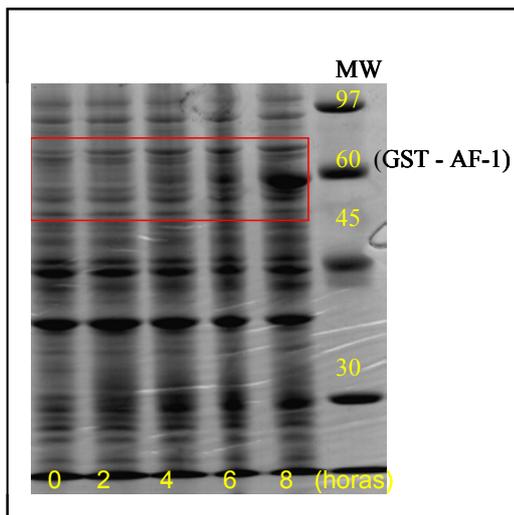


Figura 6. Análise do extrato total de bactérias DH5 α expressando por até 8h o domínio AF-1. A caixa em vermelho destaca linha de bandas aumentando sua intensidade.

Para o domínio LBD (subclonado em pGEX) testou-se em DH5 α a expressão *overnight* e no período de 8h. Novamente a expressão em tempos mais longos foi observada com maior intensidade em gel (Figura 7).

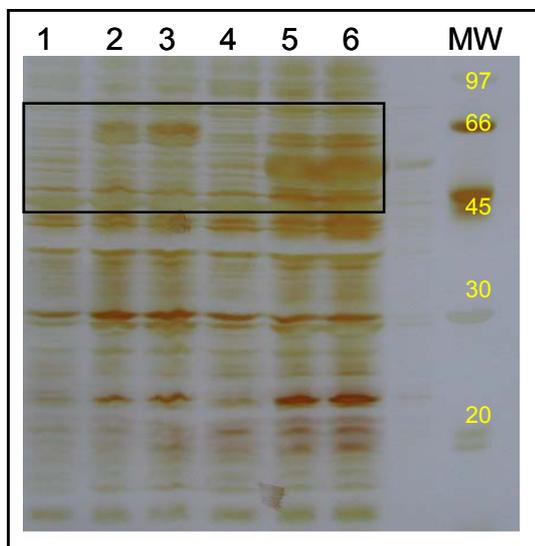


Figura 7. Avaliação da expressão de AF-1 e LBD pelo extrato total bacteriano em diferentes tempos de indução com 1 mM de IPTG a 37°C. Em 1, 2, 3 (AF-1 nos tempos 0, 8 e 16h); em 4, 5 e 6 (LBD nos tempos 0, 8 e 16h)

Em um dos experimentos as induções com IPTG em 16h foram feitas no período em que as bactérias atingiam a fase estacionária, em 1,7 D.O aproximadamente. Surpreendentemente, neste experimento, ambos domínios tiveram um significativo aumento de expressão. Sabe-se hoje que proteínas fusionadas com GST realmente apresentam melhor expressão nesta fase de crescimento (CHAE *et al.*, 2003) e está foi a maneira adotada como a condição ótima.

Testes de expressão em diferentes temperaturas, entre 25 e 37°C, também foram feitos. Obtiveram-se a 37°C, os melhores rendimentos. (dados não mostrados).

O vetor pET14b LBD e AF-1 foram expressos em uma concentração mais baixa de IPTG (0,2 mM) - como teste inicial - em culturas *overnight*, utilizando-se bactérias BL21 codon plus. Não houve diferenças na expressão entre os tempos zero de indução e *overnight*. Admitindo a hipótese de erro no seqüenciamento do vetor pET-AF-1, deu-se continuidade ao processo de expressão e purificação da proteína (figura 8).

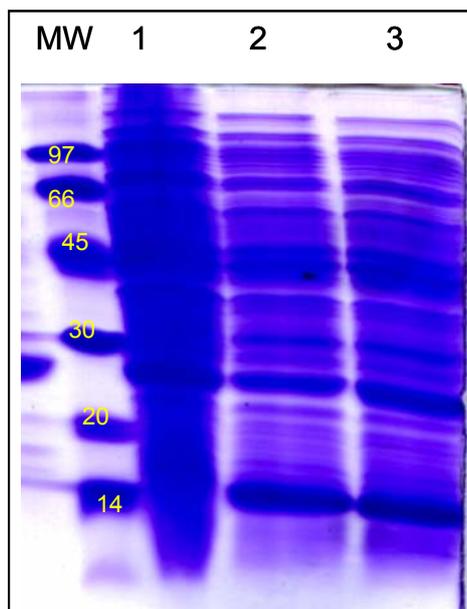


Figura 8. Expressão do domínio AF-1. Em 1- precipitado celular, 2 – tempo zero de indução e 3 – *overnight*. Com LBD o resultado foi bastante semelhante (dados não mostrados).

4.3 Processo de purificação das proteínas

O lisado bacteriano, resultado da expressão de pGEX-LBD, após centrifugação, foi incubado por 90 min a 4°C com GSH-Sepharose. A resina foi

então lavada até que nenhuma proteína pudesse ser identificada por Bradford, no eluente. Duas metodologias foram testadas. Na primeira, a proteína fusão ligada à resina foi eluída com 10 mM de solução de GSH com poucos contaminantes. Na segunda, a proteína ligada à coluna foi lavada com o tampão de clivagem da trombina (ver metodologia) e incubada com a mesma. Usando este último procedimento, em apenas um experimento foi possível obter a proteína de tamanho esperado. Este caso particular provavelmente ocorreu devido à desnaturação da molécula, facilitando a sua clivagem, já que foi feita em um longo período de 22h (figura 9).

O mesmo experimento foi feito simultaneamente para AF-1, no entanto a proteína esperada não foi obtida nas frações de eluição (figura 10).

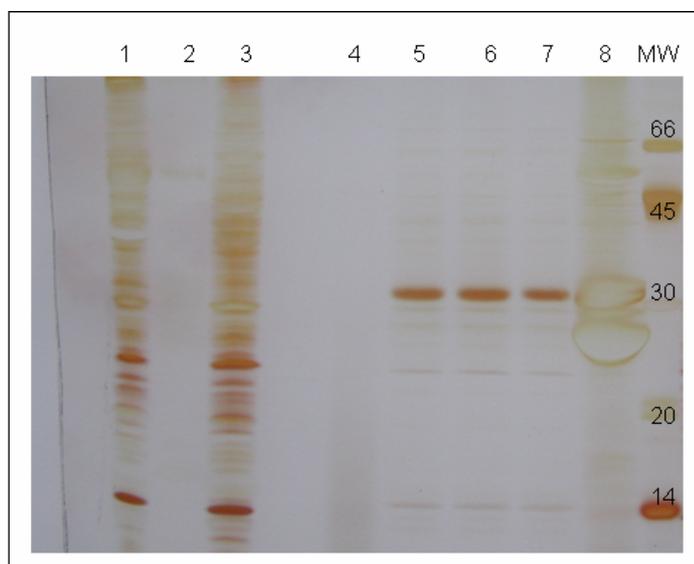


Figura 9. Purificação do domínio LBD através de clivagem na coluna. Em 1- sobrenadante inicial; 2 – Ligação da proteína fusão à coluna; 3 – Eluato; 4- lavagem; 5, 6 e 7- eluições do domínio LBD; 8 – proteínas restantes na coluna (destaque para LBD e GST em maior volume).

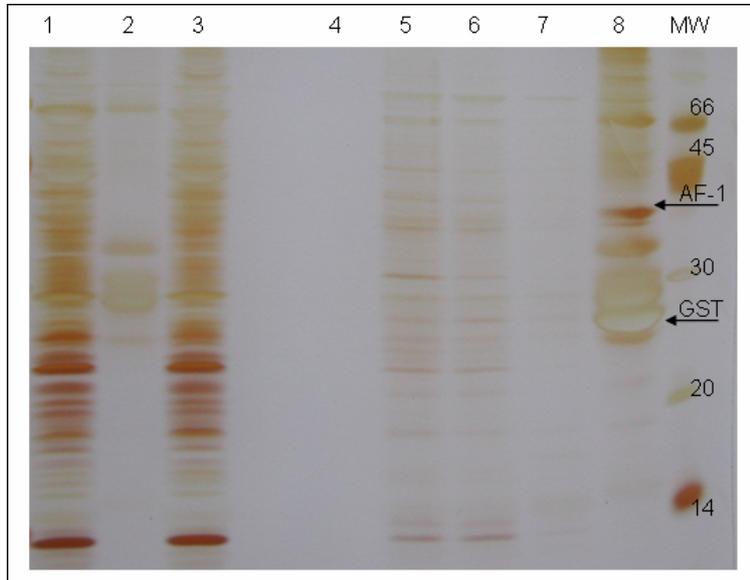


Figura 10. Purificação do domínio AF-1 a partir de clivagem na coluna GSH-sefarose. Em 1-sobrenadante inicial; 2- proteína fusão ligada à coluna; 3 – Eluato; 4- lavagem; 5, 6 e 7- eluições; 8 – proteínas que permaneceram ligadas à coluna.

Percebe-se que a clivagem com trombina ocorreu. É possível observar GST ligada à resina e uma nova banda que supostamente seria AF-1. O domínio, portanto, apresentou afinidade pela coluna nessas condições.

Tendo em vista que em somente um experimento foi possível obter LBD puro, a primeira metodologia foi adotada. Neste ensaio, a proteína retida por afinidade na resina de GSH-Sefarose, foi eluída com solução de GSH e tratada com trombina. Testes foram feitos para estabelecer o melhor tempo de clivagem, que foi de aproximadamente 20 h a 4°C (figura 8).

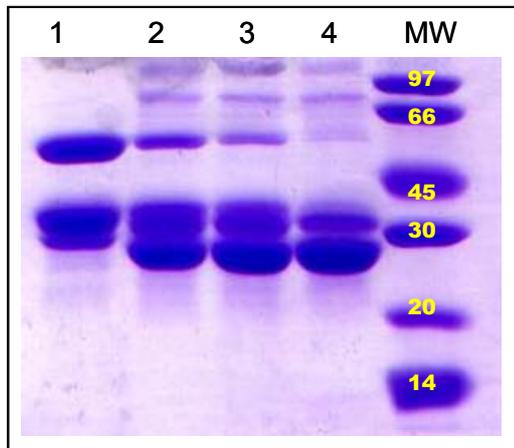


Figura 8. Teste de clivagem com trombina. 1 - tempo zero; 2- 4 horas ; 3 -12 horas e 4 - 20 horas de clivagem.

Após o tratamento com trombina, a proteína fusão, já clivada, foi incubada novamente, por 2h a 4°C com 2 ml de glutationa-sefarose. Observou-se a proteína LBD nas primeiras frações de eluição (figura 9). O rendimento de GST-LBD, LBD após a clivagem com trombina, e LBD após a incubação com GSH-sefarose pode ser visto na tabela 1. A proteína do último passo de purificação apresentou um rendimento de 3 mg/litro de cultura celular. Esta concentração foi estimada através do método de Bradford.

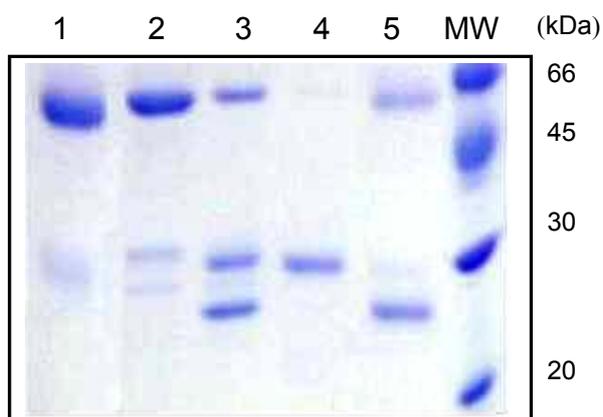


Figura 9. Purificação do domínio LBD a partir da expressão em pGEX-2T. 1 – proteína fusão ligada à resina; 2 – proteína fusão eluída com GSH; 3 – clivagem com trombina; 4 – LBD purificado; 5 – proteína fusão e GST ligadas na coluna GSH sefarose, resultado da segunda passagem pela coluna GSH-sefarose.

Tabela 1

Protocolo de purificação de NOR-1 LBD a partir de 1 litro de cultura		
Fração	Rendimento (mg) ^a	Recuperado (%)
I	19.2 ^b	100
II	11.5 ^b	59.8
III	3.25 ^c	16.9
IV	3 ^c	15.6

Nota. I, Proteína fusão GST-LBD antes da eluição com GSH; II, Proteína GST-LBD após a primeira eluição com GSH; III, Proteína LBD após tratamento com trombina; IV, Proteína LBD purificada após segunda eluição com GSH.

^a O rendimento foi calculado através da densitometria de géis digitalizados, e correspondem a ^b GST-LBD e ^c LBD.

Na tentativa de purificar o domínio AF-1 pelo mesmo método adotado para o LBD, o vetor pGEX-AF-1 foi expresso em bactérias DH5 α nas condições ótimas estabelecidas e ligado a coluna de GSH-sefarose. Entretanto, a eluição da proteína fusão com a solução de GSH foi bastante ineficiente e muitos contaminantes foram observados (figura 10).

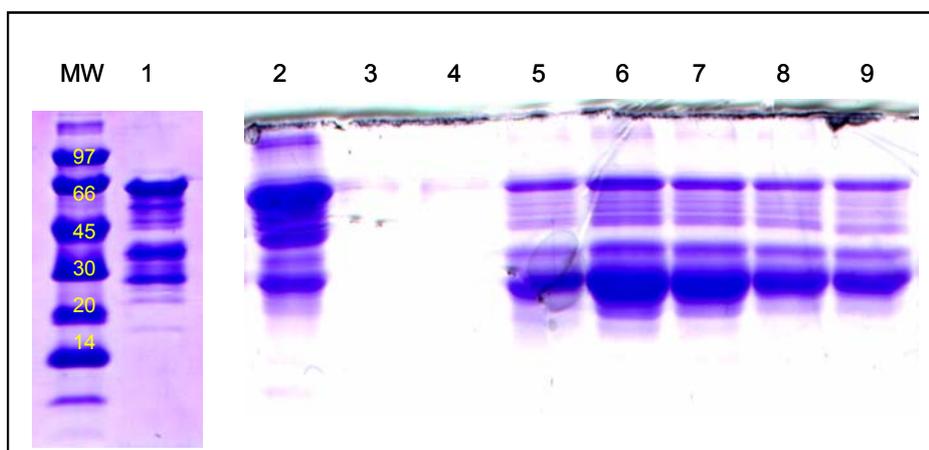


Figura 10. Eluição da proteína fusão GST-AF-1 com GSH. Em 1 e 2 – proteína fusão; 3 e 4 – lavagens; As eluições com GSH correspondem as colunas de 5 a 9.

A clivagem da proteína fusão GST-AF-1 pôde ser evidenciada em gel, no entanto a contaminação era muito grande. Através da predição estrutural para o domínio AF-1, observa-se que é uma proteína quase totalmente em estruturas randômicas, apesar da região N-terminal de órfãos conter regiões importantes envolvidas na transativação e fosforilação (NORDEZELL *et al.*, 2003; GRESTITICK e MORAS, 2003; WANSA *et al.*, 2003) (figura 11).

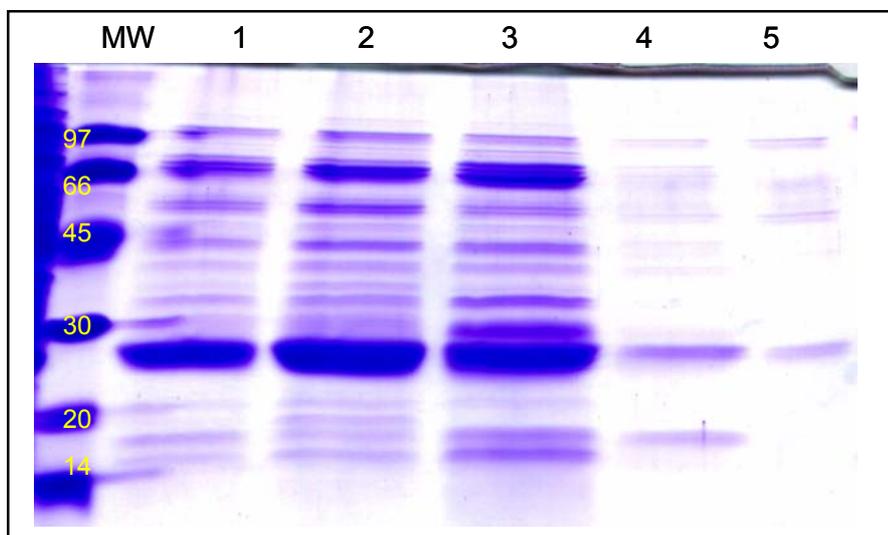


Figura 12. Purificação do domínio AF-1. 1 – proteína recombinante ligada à coluna de His.tag; 2 – primeira eluição com imidazol 50mM; 3 – 100mM de imidazol; 4 – 150mM de imidazol; 5 – 200mM de imidazol e 6- proteínas que permaneceram ligadas na coluna.

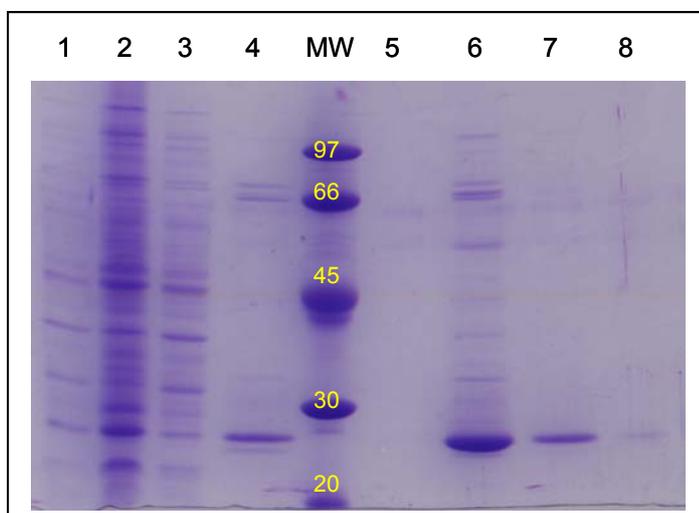


Figura 13. Purificação do domínio LBD a partir da expressão do vetor pET-LBD. Em 1- sobrenadante; 2 – precipitado celular; 3 – eluato; 4 – proteína recombinante ligada à resina; 5 – amostra da resina ao final do processo; 6 – LBD (primeira eluição com imidazol 100 mM); 7- LBD (segunda eluição com imidazol 150 mM); 8- LBD (terceira eluição com imidazol 200 mM).

4.4 Seqüenciamento N-Terminal e Espectrometria de Massa

Através da análise por espectrometria de massa (Análise por SELDI) e pelo seqüenciamento N-terminal pôde-se confirmar a purificação do domínio LBD do Receptor NOR-1. Vê-se que a seqüência encontrada para os primeiros 6 amino ácidos (Gly Ser Leu Tyr Lys Asp) corresponde à extremidade N-terminal da proteína expressa em destaque:

GSDYKDDDDKARRASVEFPKSPQQEPSQPSPSPPICMMNALVRALTDATPRDLDYR
YCPTDQATAGTDAEHVQQFYNLLTASIDVSRSWAEKIPGFTDLPKEDQTLIESAFLELFVL
RLSIRSNTAEDKFVFCNGLVHLRLQCLRGFGEWLDSIKDFSLNLQSLNLDIQALACLSALSM
ITERHGLKEPKRVEELCNKITSSLKDHQRKGQALEPSEPKVLRALVELRKICTQGLQRIFYL
KLEDLVSPPSVIDKLFLDTLPF

Entretanto, somente pelo resultado do SELDI tornou-se possível a confirmação exata da proteína de interesse (figura 14).

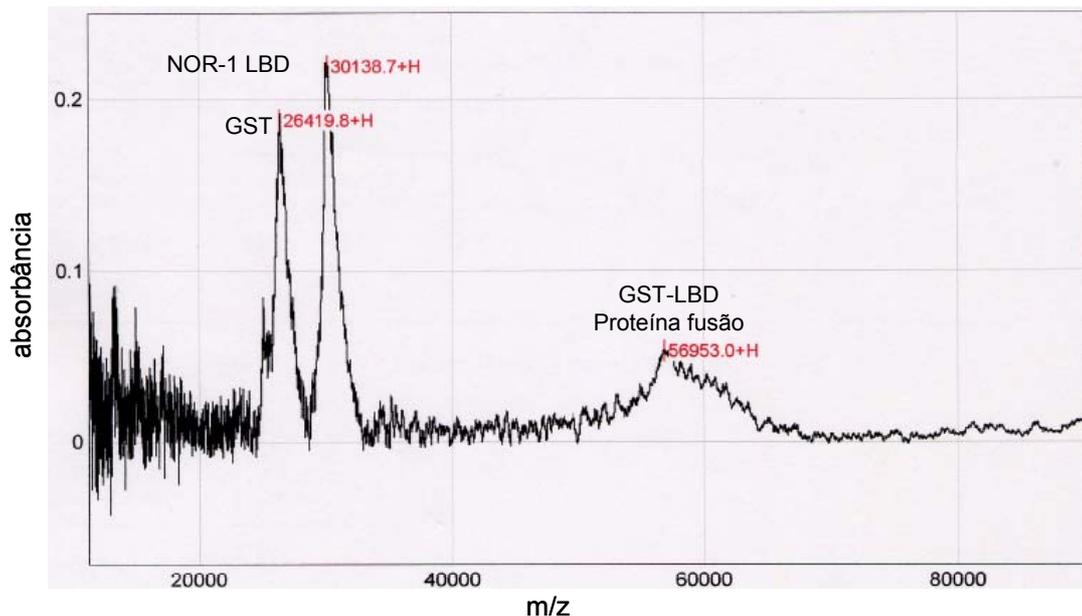


Figura 14. Espectrometria de massa identificando as três proteínas após a clivagem com trombina: NOR-1 LBD, GST e GST-LBD (proteína fusão).

A partir do programa *Protparam* adquiriu-se informação sobre a massa, calculada através da seqüência de amino ácidos de LBD: 30.138,5 kDa. Este resultado está bastante próximo do encontrado por SELDI (30.138,7 kDa), não restando dúvidas sobre a natureza da proteína.

As proteínas purificadas a partir do vetor pET-AF-1 e pET-LBD também foram seqüenciadas. No entanto as seqüências encontradas foram MKVAKD e não conferem com o esperado para a expressão do vetor pET14b (MGSSHHHHH). Em análise por BLAST encontramos uma proteína, onde sua região N-terminal possui os mesmos aminoácidos e que apresenta a característica de ser rica em histidinas com grande afinidade por Níquel e Zinco (*FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase slyD* – acesso PDB - **P30856**) também chamada de Rotamase.

Conclui-se que as proteínas purificadas não são AF-1 e LBD e sim proteínas da própria bactéria que possuem grande afinidade pela coluna. Com isso, verificamos os possíveis erros e a conclusão chegada foi que a bactéria utilizada deveria não ser do tipo DE3 (o qual produz a T7 polimerase requerida para expressão dos vetores pET). Neste momento, passamos a trabalhar com as linhagens que sabíamos ser BL21 DE3, para expressar o vetor pET-LBD. O resultado pode ser visualizado na figura 15.

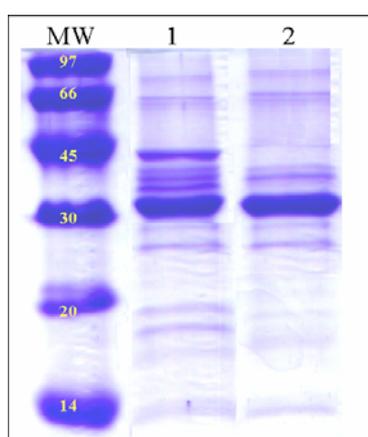


Figura 15. Purificação do domínio LBD expresso em BL21(DE3). Em 1 - proteína LBD ligada na coluna de afinidade; 2- Resultado da purificação eluindo com 150 mM de Imidazol.

Sendo assim, a bactéria DE3 expressou uma proteína – desta vez no tamanho bem mais próximo do marcador de 30 kDa – confirmando o erro das linhagens BL21. Alguns contaminantes são observados. Para aprimorar a técnica, um gradiente de Imidazol seria indicado tornando a amostra mais pura. Ou ainda, novos testes de expressão com diferentes temperaturas, tempos de indução e concentração de IPTG são recomendados.

Através de um novo sequenciamento do vetor pET-AF-1 ficou claro que a seqüência não confere com o esperado.

4.5 Análise por Dicroísmo Circular

Para verificar o estado conformacional de LBD (expresso em pGEX), pois deseja-se - após a purificação - o estado mais próximo do nativo, foram analisados os espectros de Dicroísmo Circular. Em um primeiro experimento, obteve-se um padrão predominante de α -hélices com picos máximos negativos em 222 nm e 208 nm. O percentual calculado pelo software CDSSTR (COMPTON *et al.*, 1986) de hélices foi de 30 %, 15% de folhas-beta e 55% de estruturas randômicas (figura 16).

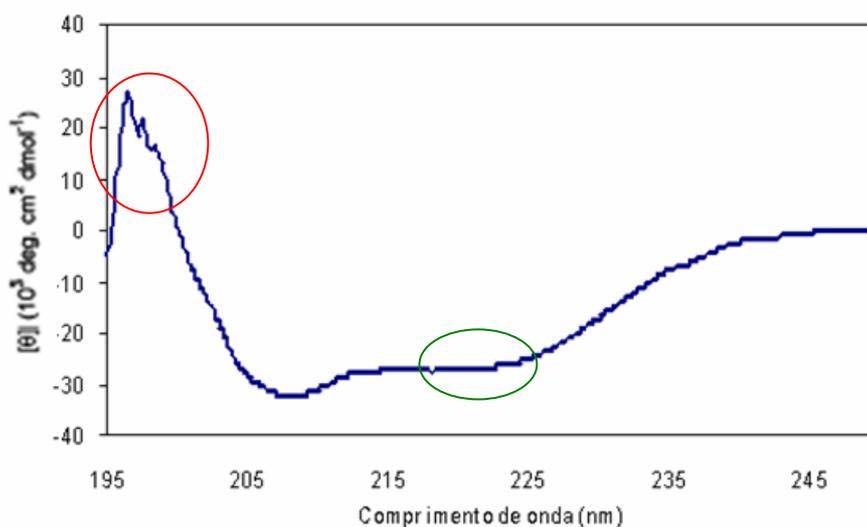


Figura 16. Primeiro experimento de CD com domínio LBD mostrando o perfil típico de α -hélices. Os círculos indicam um menor conteúdo de estrutura secundária (em vermelho, na região próxima a 200 nm e em verde, mostrando a ausência do mínimo de 222 nm bem definido).

Comparando-se estes resultados com o estimado por programas de predição de estrutura secundária (figura17), sugeriu-se um estado de desnaturação parcial da molécula.

```
====> Results from PSIPred

Helices 164 = 66%
Beta-sheet 4 = 2%
Coil 80 = 32%

====> Results from Prof

Helices 151 = 61%
Beta-sheet 3 = 1%
Coil 94 = 38%

====> Results from SCRATCH(SSPRO)

Helices 145 = 58%
Beta-sheet 11 = 4%
Coil 92 = 38%
```

Figura 17. Predições de estrutura secundária a partir de diferentes programas.

Vale ressaltar que a proteína purificada para este experimento encontrava-se a 4°C há 7 (sete) dias antes das medidas de CD, por motivos de transporte até o laboratório de cristalografia em São Carlos, SP. Em um novo experimento, com a proteína recém purificada, o percentual de α -hélices calculado aumentou para 52%, folhas-beta 20% e estruturas randômicas 28%, corroborando com os dados estimados pelos *softwares* de predição e com a estrutura cristalina de outro membro da subfamília NR4 (Nurr1, PDB 1OVL), onde o conteúdo de α -hélices está próximo de 52% (figura 18).

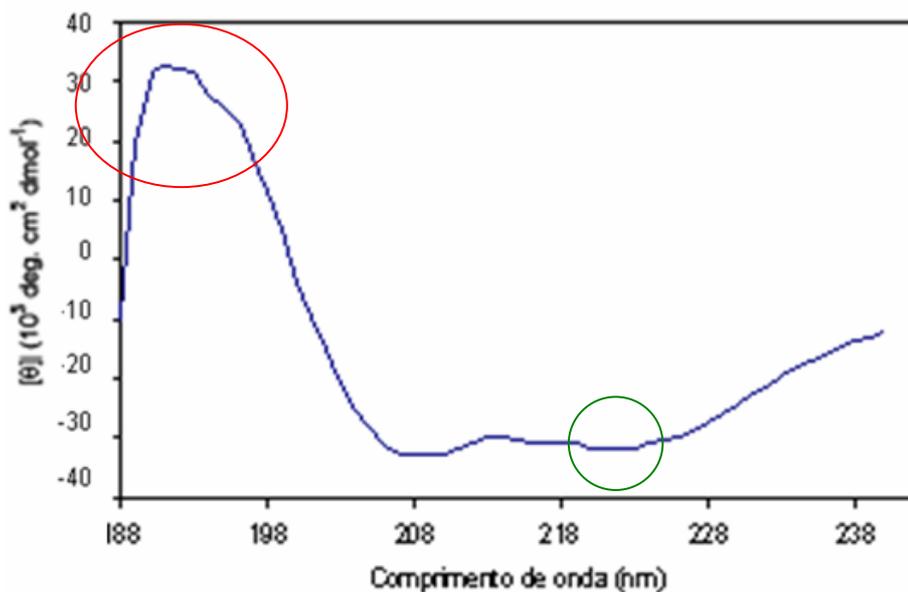


Figura 18. Segundo experimento de CD com o domínio LBD recém purificado. O círculo vermelho indica um melhor enovelamento da proteína e o círculo verde mostra o mínimo em 222 nm mais evidente.

4.6 Avaliação conformacional por desnaturação térmica

Para avaliar o enovelamento da proteína, o domínio NOR-1 LBD purificado foi submetido à desnaturação térmica e analisado por espectrofotometria (radiação Ultra-violeta a 280 nm) e Dicroísmo circular. Com o experimento de UV a desnaturação se deu a 55°C por 2,5h e a absorbância foi medida. Houve aumento na absorção da luz UV e foi detectado um padrão sigmóide em gráfico UV *versus* tempo (figura 19).

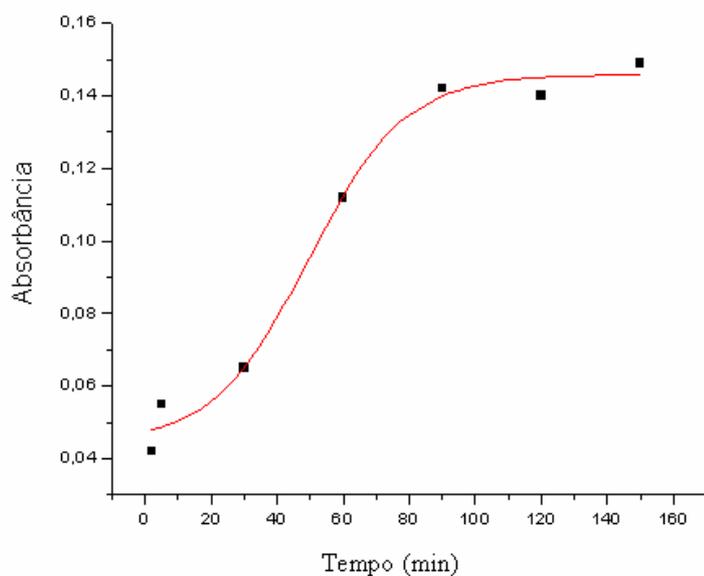


Figura 19. Análise da desnaturalização térmica por UV. Absorbância a 280 nm versus incubação a 55°C.

O aumento da absorbância sugere que a proteína está expondo mais os resíduos de triptofano ao solvente (GINSBURG e CARROLL, 1965). Colina *et al.* (2004) descreve que os triptofanos do domínio LBD de Nurr1 estão parcialmente expostos ao solvente. Sabendo que os triptofanos entre NOR-1 e Nurr1 são conservados, espera-se que esteja ocorrendo a exposição de W420 e W482 após a desnaturalização. Os triptofanos podem ser observados pelo modelo apresentado na figura 20.



Figura 20. Modelo esquemático do domínio LBD do receptor NOR-1 baseado na estrutura de Nurr1 (modelagem através do SwissPDB), mostrando os resíduos de triptofano (em vermelho). A coloração indica o grau de acessibilidade da molécula que diminui quanto mais próximo do azul.

Medidas de CD foram feitas monitorando o pico negativo a 220nm partindo-se de 20 até 80°C. Com a proteína de 7 (sete) dias após a purificação observou-se o efeito da temperatura na estrutura em α -hélice de LBD a partir de aproximadamente 40°C, atingindo um *plateau* em 55°C (figura 21). Com a proteína recém purificada as medidas foram feitas de 4 a 80 °C. A transição iniciou em 45°C e com *plateau* a 55°C (figura 22).

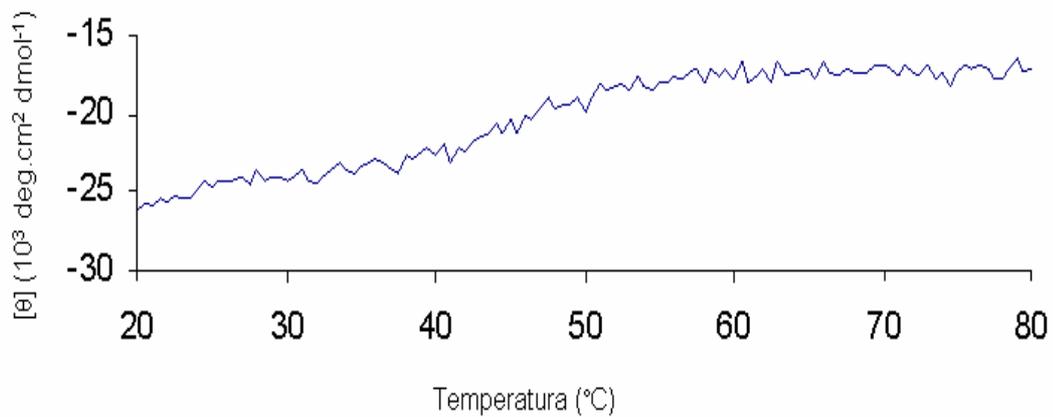


Figura 21. Análise da desnaturação térmica por CD de 20 a 80°C.

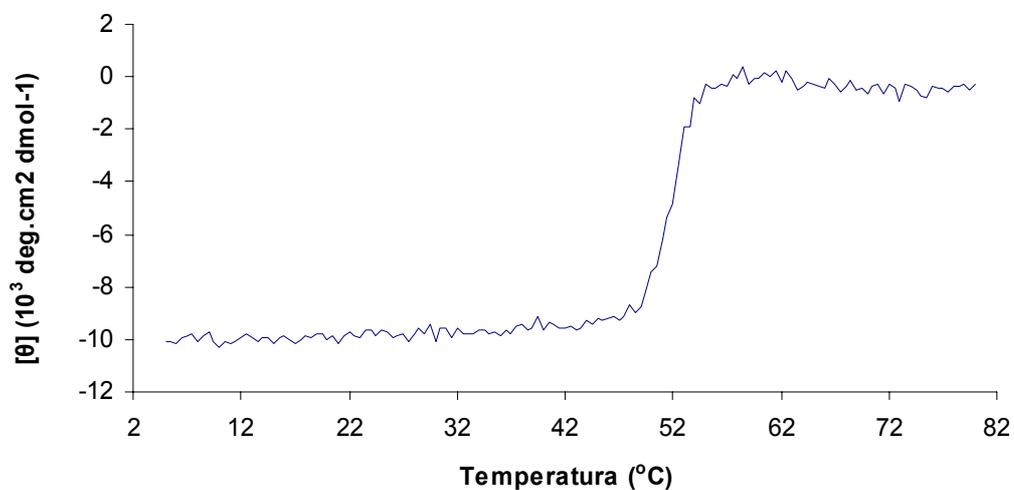


Figura 22. Novo experimento desnaturação térmica avaliado por CD com variação de 4 a 80°C.

Neste experimento o perfil sigmóide da transição térmica é bem mais evidente indicando o correto enovelamento da proteína.

5. Conclusões e Perspectivas

Através das técnicas de purificação por afinidade, pôde-se obter o domínio LBD do receptor órfão nuclear NOR-1 com alto grau de pureza a 3 mg/L de cultivo celular. A metodologia utilizando colunas GSH-sefarose é eficiente para posteriores análises estruturais. O domínio apresentou um correto enovelamento protéico, após os passos de purificação, com 52% de estrutura em α -hélices. A desnaturação térmica monitorada por UV é um bom indicativo para uma avaliação preliminar estrutural, confirmado pelos dados de Dicroísmo Circular. Estudos de dinâmica molecular (GRESCHIK e MORAS, 2003) com LBD seriam importantes para verificar a flexibilidade da atípica cavidade de ligação da subfamília NR4.

Consideramos a purificação do domínio AF-1 importante e novas tentativas devem ser feitas (através de afinidade por Níquel, por exemplo) seja do domínio isolado, peptídeos isolados ou fusionado com a região de ligação ao DNA (DBD). A verificação da atividade da porção AF-1 de NOR-1 poderia ser testada pela interação com o domínio LBD através da técnica *GST-Pulldown assay* utilizando as proteínas purificadas, ou ainda, com auxílio de co-reguladores (WANSA *et al.*, 2003).

Para o melhor entendimento da regulação transcricional de NOR-1, na ausência de uma cavidade de ligação clássica, outros estudos estruturais e análises bioquímicas serão necessárias. O uso de NOR-1 LBD purificado e corretamente enovelado como descrito neste trabalho será importante para estes experimentos futuros.

6. Referências Bibliográficas

ARANDA A. e PASCUAL A. Nuclear Hormone Receptors and Gene Expression, **Physiol. Rev.** **81**: 1269-1304, 2001.

ARKENBOUT E. K.; DE WAARD V.; VAN BRAGT M.; VAN ACHTERBERG T. A.; GRIMBERGEN J.M.; PICHON B.; PANNEKOEK H.; DE VRIES C.J. Protective function of transcription factor TR3 orphan receptor in atherogenesis: decreased lesion formation in carotid artery ligation model in TR3 transgenic mice, **Circulation** **106**: 1530–1535, 2002.

BLANAR M. A.; RUTTER W.J. Interaction cloning: identification of a helix-loop-helix zipper protein that interacts with c-Fos, **Science** **256**: 1014-1018, 1992.

BRADFORD M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** **72**: 48–54, 1976.

CHAE Y.K.; CHO K.S.; CHUN W.; LEE K. Protein Production By Stationary Phase Induction (Spi), **Protein. Pept. Lett.** **10**: 369-374, 2003.

CHAWLA A.; REPA J.J.; EVANS R.M.; MANGELSDORF D.J. Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files, **Science** **294**: 1866–1870, 2001.

COLINA A. et al. Identification of a novel co-regulator interaction surface on the ligand-binding domain of Nurr1 using NMR footprinting. **JBC** 2004.

COLLINS J.L. Therapeutic opportunities for liver X receptor modulators, **Curr. Opin. Drug Discov. Devel.** **7**: 692-702, 2004.

DHE-PAGANON S.; DUDA K.; IWAMOTO M.; CHI Y. I.; SHOELSON S.E. Crystal structure of the HNF4a ligand binding domain in complex with endogenous fatty acid ligand, **J. Biol. Chem.** **277**: 37973–37976, 2002.

FERNANDEZ P. M.; BRUNEL F.; JIMENEZ M.; SAEZ J. M.; CEREGHINI S.; ZAKIN M. M. Nuclear receptors Nor1 and NGFI-B/Nur77 play similar, albeit distinct, roles in the hypothalamus-pituitary-adrenal axis, **Endocrinology** **141**: 2392-2400, 2000.

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, **J. Biol. Chem.** **278**: 16030–16038, 2002.

GINSBURG A.; CARROLL W.R. Some Specific Ion Effects on the Conformation and Thermal Stability of Ribonuclease, **Biochemistry** **4**: 2159 – 2174, 1965.

GORDON A.; FRANCIS L.; FAYARD E.; PICARD F.; AUWERX J. Nuclear Receptors and the control of metabolism, **Annu. Rev. Physiol.** **65**: 261–311, 2003.

GRESCHIK H. e MORAS D. Structure-activity relationship of nuclear receptor-ligand interactions, **Curr. Top. Med. Chem.** 14: 1573-99, 2003.

INUZUKAA H.; TOKUMITSU H.; OHKURAB N.; KOBAYASHI R. Transcriptional regulation of nuclear orphan receptor, NOR-1, by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase cascade, **FEBS Letters** 522: 88-92, 2002.

IWAWAKI T.; KOHNO K.; KOBAYASHI K. Identification of a potential Nurr1 response element that activates the tyrosine hydroxylase gene promoter in cultured cells, **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 274: 590–595, 2000.

Kersten, S. et al. Roles of PPARs in health and disease. **Nature** 405: 421-424, 2000.

LAUE L. et al. Receptor-mediated effects of glucocorticoids on inflammation: enhancement of the inflammatory response with a glucocorticoid antagonist. **J. Steroid Biochem.** 29: 591-598, 1988.

LIN R.J. et al. Molecular genetics of acute promyelocytic leukemia. **Trends Genet.** 15: 179-184, 1999.

MALTAIS A.; FILION C.; LABELLE Y. The AF2 domain of the orphan nuclear receptor TEC is essential for the transcriptional activity of the oncogenic fusion protein EWS/TEC, **Cancer Lett.** 183: 87–94, 2002.

MANGELSDORF D.J.; THUMMEL C.; BEATO M.; HERRLICH P.; SCHUTZ G. The nuclear receptor superfamily: the second decade, **Cell** 83: 835–839, 1995.

MONAJEMI H.; ARKENBOUT E.K.; PANNEKOEK H. Gene expression in atherogenesis, **Thromb. Haemost.** **86**: 404–412, 2001.

MURPHY E. P.; McEVOY A.; CONNELLY O. M.; BRESNIHAN B.; FITZGERALD O. Involvement of the nuclear orphan receptor NURR1 in the regulation of corticotropin-releasing hormone expression and actions in human inflammatory arthritis, **Arthritis Rheum.** **44**: 782–793, 2001.

NAGY L. e SCHWABE J.W.R. Mechanism of the nuclear receptor molecular switch, **Trends Biochem Sci.** **29**: 317-324, 2004.

NORDZELL M.; AARNISALO P.; BENOIT G., CASTRO D.S.; PERLMANN T. Defining an N-terminal activation domain of the orphan nuclear receptor Nurr1, **Biochem Biophys Res Commun.** **2**: 205 -211, 2004.

ORY D.S. Nuclear receptor signaling in the control of cholesterol homeostasis: have the orphans found a home?, **Circ. Res.** **1** :660-70, 2004.

PIRIH F.Q.; NERVINA J.M.; PHAM L.; AGHALOO T.; TETRADIS S. Parathyroid hormone induces the nuclear orphan receptor NOR-1 in osteoblasts, **Biochem Biophys. Res. Commun.** **20**: 144 –150, 2003.

TERENZI H.; ALZARI P.M.; ZAKIN M. M. Structural Features Involved In the Formation of a Complex Between the Monomeric or the Dimeric Form of the Rev-erb β DNA-Binding Domain and its DNA Reactive Sites, **Biochemistry** **37** 11488 – 11495, 1998.

TERENZI H.; CASSIA R.O.; ZAKIN M.M. Expression, Purification, and Functional Analysis of the DNA Binding Domain of Nuclear Receptor Rev-erb β , **Protein. Expr. Purif.** 8: 313 – 318, 1996.

WANG Z.; BENOIT G.; LIU J.; PRASAD S.; AARNISALO P.; LIU X.; XU H.; WALKER N. P. C.; PERLMANN T. Structure and functional of Nurr1 identifies a class of ligand-independent nuclear receptors, **Nature 423**: 555-560, 2003.

WANSA K.D.S.A.; HARRIS J. M.; YAN G.; ORDENTLICH P.; G. E. O. Muscat, The AF-1 Domain of the Orphan Nuclear Receptor NOR-1 Mediates Trans-activation, Coactivator Recruitment, and Activation by the Purine Antimetabolite 6-Mercaptopurine, **J. Biol. Chem.** 278 : 24736-24790, 2003.

WISELY G.B.; MILLER A.B.; DAVIS R.G.; THOMQUEST JR A.D.; JOHNSON R.; SPITZER T.; SEFLER A.; SHEARER B.; MOORE J.T.; MILLER A.B.; WILLSON T.M.; WILLIAMS S.P. Hepatocyte nuclear factor 4 is a transcription factor that constitutively binds fatty acids, **Structure 10**: 1225–1234, 2002.

ZHANG X. K. Vitamin A and apoptosis in prostate cancer, **Endocr. Relat. Cancer 9**: 87–102, 2002.