

Universidade de Brasília

Gustavo Barcelos Barra

Farmacologia do Receptor do Hormônio Tirodiano, Nova mutação no sítio de “splicing” do gene do hormônio luteinizante e Determinação da atividade da Luciferase: um novo método para medida in vitro de interação proteína-proteína.

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Francisco de Assis Rocha Neves

Brasília
2008

SUMÁRIO

PREFÁCIO	05
GLOSSÁRIO E ABREVIATURAS	08
1. Farmacologia do Receptor do <i>Hormônio Tiroídiano</i>	13
RESUMO	14
1.1 INTRODUÇÃO	16
1.2 OBJETIVO	30
1.3 MATERIAIS E MÉTODOS	31
1.3.1 - Vetores Plasmídiais (<i>Plasmídeos</i>).....	31
1.3.2 - Expressão e purificação de proteínas recombinantes em <i>Escherichia coli</i>	32
1.3.3 - Ensaio de interação proteína-proteína em solução (GST).....	33
1.3.4 - Eletroforese de proteínas em gel de poli(acrilamida com sulfato duodecilo sódico) (SDS).....	35
1.3.5 - Síntese <i>in vitro</i> de Proteínas.....	35
1.3.6 - Cultura de células, transfecção e ensaio da atividade da enzima luciferase.....	36
1.3.7 - Cálculo da taxa de ativação e análise estatística.....	37
1.3.8 - Mutações Sítio-Dirigida.....	39
1.3.9 - Ensaio proteção contra tripsina.....	39
1.3.10 - Ensaio de ligação ao T3.....	40
1.4 RESULTADOS	41
1.4.1-TR com diferentes mutações no resíduo I280 apresentam atividade transcricional específicas.....	41
1.4.2 - Mutantes I280 apresentam diferentes afinidades pelos coreguladores.....	42
1.4.3 - Mutantes I280 apresentam diferentes afinidades pelo T3.....	45
1.4.4 -Heterodimerização dos mutantes I280R e I280K está preservada.....	47
1.4.5 - Superfície de ligação ao coreguladores é importante para repressão em gene negativamente regulados pelo T3.....	49
1.5 – DISCUSSÃO	55
1.6 – CONCLUSÕES	67
REFERÊNCIAS	68
2. NOVA MUTAÇÃO NO SÍTIO DE “SPLICING” DO GENE DO HORMÔNIO LUTEINIZANTE	75
RESUMO	76
2.1 INTRODUÇÃO	78
2.1.1 - Motivação para o estudo.....	78
2.1.2 - O Hormônio Luteinizante.....	80
2.1.3 - Mutações na subunidade beta do gene LH (LHB).....	85
2.1.4 - Polimorfismos no gene LHB.....	87
2.2 OBJETIVO	88
2.3 MATERIAIS E MÉTODOS	89
2.3.1 - Extração de DNA genômico de leucócitos do sangue periférico.....	89
2.3.2 - Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	89
2.3.3 - Sequenciamento automático.....	90
2.3.4 - Digestão enzimática.....	91
2.3.5 - Extração de RNA de sangue total.....	92
2.3.6 - Síntese do cDNA ou transcrição reversa.....	93

2.3.7 - Amplificação do cDNA (semi-nested RT-PCR).....	94
2.3.7.1 - Pré-amplificação.....	94
2.3.7.2 - Semi nested RT-PCR.....	94
2.4 RESULTADOS	98
2.4.1 - Análise do gene LHB nos três pacientes com deficiência seletiva de LH.....	98
2.4.2 - Rastreamento da mutação IVS2+1G>C nos familiares.....	99
2.4.3 - Rastreamento da mutação IVS2+1G>C no grupo controle de 100 indivíduos.....	100
2.4.4 - Análise do efeito da mutação IVS2+1G>C sobre o processamento do RNA (splicing) de leucócitos.....	101
2.4.5 - Análise comparativa das seqüências do LHB selvagem (wt) e mutante (mut).....	103
2.5 DISCUSSÃO	106
2.6 CONCLUSÃO	109
REFERÊNCIAS	110
3. Determinação da atividade da Luciferase: um novo método para medida in vitro de interação proteína-proteína	113
RESUMO	114
3.1 INTRODUÇÃO	116
3.2 OBJETIVO	122
3.3 MATERIAIS E MÉTODOS	123
3.3.1 – Plasmídeos.....	123
3.3.2 - Produção da proteína “presa”.....	123
3.3.3 - Produção da proteína “isca”.....	123
3.3.4 - Ensaio de GST “pull-down” (utilizando tubos de microcentrifuga).....	124
3.3.5 - Ensaio de GST “pull-down” (utilizando-se microplacas de 96 poços).....	124
3.3.6 - Construção de um vetor para expressão de proteínas “presas” fusionadas a luciferase.....	125
3.3.7 - Apresentação dos dados e Análise estatística.....	126
3.4 RESULTADOS	127
3.4.1 - Detecção de interações proteína-proteína em ensaio de GST “pull-down” utilizando a enzima luciferase como reporter.....	127
3.4.2 - GST light pull-down em microplacas de 96 poços.....	133
3.4.3 - Construção do vetor “Pet-28aLUC-MCS” para expressão de proteínas “presas” fusionadas a luciferase.....	134
3.5 DISCUSSÃO	139
3.6 CONCLUSÕES	140
REFERÊNCIAS	144
ANEXOS I, II, (artigos publicados referentes aos estudos)	148 e156

PREFÁCIO

Esta tese de doutorado é composta por três estudos independentes e não correlacionados. Por este motivo, as normas para apresentação de documentos científicos foi aplicada de forma individual, ou seja, cada estudo possui sua própria introdução, objetivo, materiais e métodos, resultados, discussão, conclusão e referências. Precedendo os estudos existe um sumário, um glossário e lista de abreviaturas unificados, ou seja, referentes aos três estudos.

O primeiro estudo, onde estudamos a farmacologia do receptor do hormônio tireoidiano, trata-se da continuação da minha dissertação de mestrado realizada junto ao programa de pós-graduação em ciências da saúde. Nele investigamos a importância da isoleucina 280 do TR β 1 na interação com o correpressor SMRT e com os coativadores SRC1 e GRIP. Para isso a isoleucina 280 foi substituída por uma arginina (I280R), metionina (I280M), ou lisina (I280K). Para complementar nossas conclusões utilizamos um mutante descrito na síndrome de resistência ao hormônio tireoidiano, F451X, que não possui a hélice 12 e que se interage avidamente aos correpressores. Nossos resultados demonstraram que o resíduo I280 é crítico para a interação entre TR β 1 com correpressores (SMRT) e coativadores (GRIP1 e SRC-1). A presença de um aminoácido hidrofóbico é fundamental para que ocorra o fechamento da hélice 12 sobre as hélices 3 e 5-6, permitindo a interação com os coativadores. Por outro lado, para se interagir com correpressores, a substituição da isoleucina por outro aminoácido hidrofóbico (metionina) não foi suficiente para manter a interação do TR β 1 com o correpressor SMRT, sugerindo propriedades específicas da isoleucina.

No segundo estudo, demonstramos uma nova mutação no sítio de splicing do gene do hormônio luteinizante (LH). Este trabalho foi publicado na "The New England Journal of Medicine" e divido a primeira autoria com a endocrinologista Adriana Lofrano-Porto. Neste estudo, além de descrevermos uma nova mutação, substituição de uma guanina (G) por uma citosina (C), em homozigose, na posição +1 do íntron 2 (IVS2+1G>C); ela foi documentada em dois homens e também pela primeira vez, em uma mulher. Estudando

leucócitos dos pacientes observamos que a mutação modificou o splicing do gene do LH, gerando um RNA mensageiro aberrante. A proteína sintetizada não possui regiões importantes para sua dimerização correta com a subunidade alfa do LH e assim não pode ser secretada, dando origem então à condição patológica de deficiência seletiva de LH nos pacientes. Neste caso, minha tese dará enfoque a parcela do estudo que executei, ou seja, os experimentos moleculares.

Por fim, no terceiro estudo, utilizamos a determinação da atividade da luciferase como um novo método para medida *in vitro* de interação proteína-proteína. Esse ensaio é uma variação do método de glutationa-S-transferase (GST) “pull-down”, que é um dos principais métodos para análise *in vitro* de interações proteína-proteína. Este ensaio consiste em incubar uma proteína “isca” (fusionada ao GST e imobilizada em partículas pesadas) com uma proteína “presa” (radiomarcada). Se ocorrer interação entre as duas proteínas, ao centrifugarmos a amostra, a proteína “isca” será precipitada e trará junto a proteína “presa”. Em seguida, para avaliar a interação, realiza-se a análise do precipitado em SDS-PAGE que irá mostrar, por autoradiografia, a presença ou a ausência da proteína “presa”. Esse ensaio é de custo elevado, demorado e demanda uso de radioativo. Nosso novo método, GST “light pull-down” substitui a proteína radioativa por uma proteína fusionado à luciferase, enzima que quando age sobre seu substrato, a luciferina, e emite luz. Nesse sentido, a medida da quantidade de luciferase precipitada, corresponderá a interação entre duas proteínas. Esse novo método possui as seguintes vantagens: diminui o tempo necessário para avaliação da interação proteínas de 16-52 horas para 50-70 minutos; dispensa o uso de proteínas radioativas; reduz o custo financeiro e por esses motivos poderá ser utilizado na pesquisa de ligantes de receptores nucleares, sintéticos ou derivados de extratos de plantas.

GLOSSÁRIO E ABREVIATURAS

[125I]T3- T3 marcado com iodo 125

-157+17SOD-LUC- Plasmídeo reporter com região -157 a +17 do promotor da SOD1

³⁵S-Met – Metionina marcada com enxofre 35

-547 +84TRH-LUC- Plasmídeo reporter com região -547 a +84 do promotor do TRH

6XHis- Cauda de histidina.

9-cis RA – Ácido 9-cis retinóico

A - angstroms

ACTR;pCIP;AIB1;RAC3;TRAM-1;SRC-3;NCoA3 - Sinônimos do co-ativador de receptores nucleares 3, incluindo os receptores de esteróides.

AP-1- Complexo de fatores de transcrição composto pela heterodimerização das proteínas c-jun e c-fos.

apoPPAR- PPAR na ausência do ligante

AR- Receptor de androgênios.

BL21-Cepa de *E.coli* para expressão de proteínas.

BL21SI- Cepa de bactéria BL21 induzida por NaCl.

CAR- Receptor constitutivo de androstanos.

CBP- CREB binding Protein.

c-fos - fator de transcrição do complexo AP-1.

c-jun -fator de transcrição do complexo AP-1.

DBD- Domínio de ligação ao DNA.

DH5 α - Cepa de *E.coli* para propagação de plasmídeos.

DR4- Repetições diretas da seqüência AGGTCA espaçadas por 4 nucleotídeos é um TRE.

DTT- dithiothreitol

EMSA- Ensaio de alteração da mobilidade eletroforética “gel shift”

ER- Receptor de estrogênio.

F2- Seqüência correspondente a um palíndromo invertido da seqüência AGGTCA.

F451X- Mutação do TR em que os dez últimos aminoácidos a partir da fenilalanina 451 foram deletados.

FXR- Receptor de farnesóides X

GAL4- Fator de transcrição de levedura ativado por galactose

GC-1- (Agonista TR β seletivo) Ácido 3,5-dimetil-4-(4'-hidroxi-3'-isopropilbenzil)-fenoxi acetico

GC-24- (Agonista TR β seletivo) Ácido 3,5-dimetil-4-(4'-hidroxi-3'-benzil)-benzilfenoxiacetico

GR- Receptor de glicocorticóides.

GST “light pull-down”- Ensaio para avaliar interação entre duas proteínas que utiliza presa fusionada a luciferase para medida da interação.

GST- Glutathione-S-Transferase

GST-GRIP1- Proteína de fusão entre GST e GRIP1

GST-SMRT- Proteína de fusão entre GST e SMRT

GST-SRC1- Proteína de fusão entre GST e SRC1

GST-TR β 1 - Proteína de fusão entre GST e LBD do TR β 1.

GST-TR β 1LBD- Proteína de fusão entre GST e LBD do TR β 1.

H1 a H12 - Representa as 12 alfa hélices

HAT- Histona acetilase

HDACs- Histona desacetilases.

holoPPAR- PPAR na ausência do ligante

HT- Hormônio tireoideano

hTR β 1- Receptor do hormônio tireoideano humano isoforma beta 1.

I280K- TR mutante onde isoleucina 280 foi trocada por uma lisina.

I280M- TR mutante onde isoleucina 280 foi trocada por uma metionina.

I280R- TR mutante onde isoleucina 280 foi trocada por uma arginina.

INPUT 33%- Quantidade conhecida de Proteína marcada utilizada em cada reação de GST

IPTG-Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

LBD- Domínio de ligação ao ligante

LUC- Gene que codifica a luciferase.

LXR- Receptor hepático X

MCS – Sítio múltiplo de clonagem

Mg²⁺ - Magnésio

MR- Receptor de mineralocorticóides.

NcoR- Corressor de receptores nucleares.

NID- Domínio de interação com receptores nucleares presente nos coativadores.

OD₆₀₀- Densidade ótica a 600 nanômetros

Operador LAC- Sítio de ligação do repressor LAC codificado por bactérias

p160- Família de proteínas da família p160, coativadores de receptores nucleares.

pCMV- Plasmídeo que contém o promotor do Citomegalovírus para expressão de proteínas em células de mamíferos.

pCMX- Plasmídeo que contém o promotor do Citomegalovírus e do T7 para expressão de proteínas em células de mamíferos e *in vitro*..

pCMX-hTR β 1- pCMX que codifica o receptor do hormônio beta 1 humano

Pet28a- Plasmídeo para expressão de proteínas em bactérias versão 28a.

Pet-28aLUC-MCS- construção constituída pela clonagem do gene da luciferase e de um MCS no plasmídeo Pet28a.

pGEX- Plasmídeo para expressão de proteínas fusionadas ao GST em bactérias.

pGEX-GRIP1 (563-767)- Plasmídeo pGEX que contém o região de 563-767 do GRIP1 fusionado ao GST

pGEX-SMRT (987-1491)- Plasmídeo pGEX que contém o região de 987-1491 do SMRT fusionado ao GST

pGEX-SRC1 (381-882)- Plasmídeo pGEX que contém o região de 381-882 do SRC1.

pGL3 – Plasmídeo repórter contendo o gene da luciferase versão 3.

PMSF- Fenilmetanosulfonilfluorido

PPAR- Receptor de proliferadores peroxissomais.

PR- Receptor de progesterona.

PTC-200- Tipo de termociclador da MJ reseach.

PXR-Receptor de pregnanos X

RAR-Receptor de ácido retinóico.

RXR, RXR α - Receptor do ácido retinóide X isoforma alfa

S1 a S4- Representa as 4 fitas betas do receptor do hormônio tireoideano.

SDS-PAGE- Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante com SDS.

Sephadex G-25- Resina de filtração em gel com partículas de tamanho entre 20-50 micras.

SF-1- Fator esteróide-1

SMRT- Mediador do silenciamento do receptor do ácido retinóico e do receptor do hormônio tireoideano.

SOD-1- Superóxido dismutase -1

SRA- RNA ativador de receptores esteróides

SRC-1; NCoA1- Sinônimos do co-ativador de receptores nucleares 1 incluindo os receptores de esteróides.

SRC1a- Coativador de receptores esteróide isoforma 1a

SRC-1a-LUC - Proteína quimérica formada pela fusão do SRC1a com a luciferas

SRC-3- ACTR

SRC3-LUC - Proteína quimérica formada pela fusão do SRC1a com a

T7- Bacteriófago T7

TATA Box- Sequencia de DNA do promotor de eucariotos, conservada entre as espécies e importante para

atuação da RNA polimerase a transcrição de um gene.

TFIIB-Fator de Transcrição IIB.

TFIID-Fator de Transcrição IID.

TFIIE-Fator de Transcrição IIE

TFIIF-Fator de Transcrição IIF.

TFIIH p62- Fator de transcrição basal II H.

TIF2;GRIP1;SRC-2;NCoA2-

Sinônimos do co-ativador de receptores nucleares 2 incluindo receptores esteróides.

TK- Timidina quinase.

TNT T7- Kit com lisado de reticulócitos para transcrição e tradução *in vitro* de proteínas marcadas ou não.

TPA- 12-O-tetradecanoilforbol 13-acetato, Ester de forbol promotor de tumor

TR- Receptor do hormônio tireoideano.

TRE- Elemento responsivo ao hormônio tireoideano

TREpal- Seqüência correspondente a um palíndromo da seqüência AGGTCA.

TREs-Tk-LUC – Plasmídeo contendo gene repórter luciferase com um promotor mínimo da timidina kinase

do hepex simples vírus e controlado por um TRE (DR4, F2 ou TREpal).

TRH- Hormônio liberador de TSH.

TRIAC- Ácido 3,5,3'- triiodotiroacético

TR α 1 ou 2- Receptor do hormônio tireoideano, isoforma alfa1 ou 2.

TR β 1,2 ou 3- Receptor do hormônio tireoideano, isoforma beta 1, 2 ou 3.

U937- Células prómonocíticas humanas

VDR - Receptor da vitamina D

Δ Coll T3- Promotor da collagenase 1 que contem sítio Ap-1, região mínima para atuação do T3 sobre a expressão gênica.

Δ collT3- LUC- Plasmídeo repórter contendo promotor Δ Coll T3 controlando a luciferase.

IVS2+1G>C - Mutaçao G>C no primeiro nucleotídeo do intron 2.

PCR-RFLP - PCR seguido de análise de polimorfismo do fragmento de restrição

LH - Hormônio Luteinizante

mRNA - RNA mensageiro

LHB – Gene que codifica a cadeia beta do hormônio luteinizante

HH-Hipogonadismo hipogonadotrófico

FSH - Hormônio foliculoestimulante

TSH - Hormônio tireoestimulante

hCG - Gonadotrofina coriônica humana

CHO – Células de ovário de Hamister chinês

V5- Proteína do simian vírus 5

HEK 293T – Células de rim embrionário humano

LHa – Cadeia alfa do hormônio luteinizante

EXO-SAP - Mistura da exonuclease I e fosfatase alcalina de camarão

RFLP - Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição

Nco I - Enzima de restrição Nco I

NCBI – Centro Nacional para Informação Biotecnológica dos Estados Unidos.

DEPC – Dietil pirocarbonato

M-MLV – Virus de leucemia moloney de rato

RT-PCR – PCR precedida de uma transcrição reversa

nested RT-PCR - Uma segunda RT-PCR em uma amostra utilizando primers internos aos primeiros

semi nested RT-PCR - Uma segunda RT-PCR em uma amostra utilizando um primer interno e repete-se o outro da primeira reação.

Estudo 1

Farmacologia do Receptor do Hormônio Tiroídiano: Investigação do papel da isoleucina 280 na interação do receptor do hormônio tireoideano $\beta 1$ (TR $\beta 1$) aos corretores – considerações estruturais e moleculares.

Resumo

Os hormônios tireoideanos (HTs) são necessários para a diferenciação, crescimento e metabolismo de diversos tecidos de mamíferos. Seus efeitos são mediados pelos receptores do hormônio tireoideano (TRs), que pertencem à superfamília dos receptores nucleares. Os TRs são fatores de transcrição que se ligam ao DNA nos promotores dos genes alvos, em regiões denominadas de elementos responsivos ao TR (TRE). Para modular a atividade transcricional (repressão ou ativação) TR se interage com correpressores e co-ativadores, na ausência e na presença de T3, respectivamente.

Para melhor se entender a relação entre estrutura e função do TR, investigamos o papel da isoleucina 280 na interação deste com o correpressor SMRT e com os coativadores SRC1 e GRIP. Para isso utilizamos TRs mutantes onde a isoleucina 280 foi substituída por uma arginina (I280R), metionina (I280M), ou lisina (I280K). A atividade transcricional destes mutantes foi avaliada nos elementos responsivos positivos (DR4, F2, e TREpal) por ensaio de gene repórter luciferase e a interação com os correpressores pelo ensaio de interação proteína-proteína em solução (GST "pull down"). Além disso, utilizamos o mutante F451X, descrito na síndrome de resistência ao HT, pois esse receptor se interage avidamente aos correpressores. Nossos resultados demonstraram que os mutantes I280K e I280R foram transcricionalmente inativos em DR4, F2 e TREpal. Por outro lado, quando comparado ao TR β 1 selvagem, a mutação I280M não modificou a atividade transcricional em DR4, F2 e TREpal. Adicionalmente, a diferença observada nas capacidades transcricionais de I280M, I280R, e I280K em DR4, F2 e TREpal correlacionou-se com a capacidade de se interagir com os coativadores, pois, apenas o mutante I280M foi capaz de se ligar ao GRIP e ao SRC1 de forma semelhante ao TR selvagem. Além disso, I280M, I280K e I280R apresentaram uma diminuição na capacidade de se interagir o correpressor SMRT e a introdução da mutação I280R no F451X aboliu a alta capacidade de ligação deste mutante ao correpressores.

Para completa compreensão das diferenças entre I280M, I280R, e I280K testamos a capacidade de ligação ao T3 pelo ensaio de ligação ao T3-I¹²⁵. Observamos que a mutação I280M reduz discretamente a afinidade do T3 ao TR β 1, enquanto que as mutações I280R e I280K abole a ligação do T3 ao TR β 1. Assim, I280R e I280K além de impedir a ligação os correpressores impedem também à ligação ao hormônio, o que não ocorre com o I280M.

Por outro lado, I280M, I280R e I280K se heterodimerizaram com RXR de forma semelhante ao TR selvagem.

Diante dessas observações, para melhor compreensão do mecanismo molecular envolvido na repressão mediada por T3, avaliamos a atividade transcricional dos mutantes I280R, I280M, I280K, F451X e I280R/F451X sobre alguns promotores regulados negativamente como: Colagenase-1, Hormônio liberador de tirotropina (TRH) e Superóxido dismutase 1 (SOD-1). A soma dos nossos achados demonstra que, de forma geral, nesses promotores, na ausência de T3, TR estimula a transcrição e que essa ativação é de alguma forma dependente da interação com os correpressores. Por outro lado, a repressão da transcrição mediada por T3, depende da manutenção da superfície de interação com os coativadores.

Em conclusão, as diferenças nos resultados observados em nossos mutantes parece ser secundária às diferenças existentes entre as cadeias laterais dos aminoácidos isoleucina, arginina, lisina e metionina (Isoleucina e metionina possuem cadeia lateral hidrofóbica, arginina e lisina possuem cadeias laterais polares e carregadas positivamente). O resíduo I280 está localizado na superfície de ligação ao correpressor, não faz contato direto com o co-ativador, em outros receptores nucleares seu correspondente é sempre de resíduos hidrofóbicos (isoleucina, Leucina, Valina, Metionina) e aparentemente tem a função de interagir com aminoácidos da face interna da H12. Dessa forma, as cadeias laterais carregadas positivamente pelos aminoácidos lisina e arginina poderiam impedir a sustentação da H12 em sua posição correta o que, conseqüentemente, impedir a formação da superfície de ligação aos co-ativadores e também diminuir a afinidade pelo ligante. Além disso, nos promotores regulados negativamente, na ausência de T3, a ativação da transcrição por TR depende da manutenção da superfície de interação com correpressores, enquanto que a repressão da transcrição mediada por T3 exige a preservação da interface de interação do TR com os coativadores.

Abstract

The Thyroid hormones (THs) are necessary for differentiation, growth and metabolism of various mammals tissues. Its effects are mediated by thyroid hormone receptors (TRs) that belong to the nuclear receptors superfamily. The TRs are transcription factors that bind to DNA in the promoters of target genes, in regions called the TR-responsive elements (TRE). To modulate transcriptional activity (repression or activation) TR interacts with corepressores and co-activators, in the absence and presence of T3, respectively.

To better to understand the relationship between structure and function of TR, we investigated the role of isoleucine 280 in the TR interaction with the corepressor SMRT and the coactivators SRC1 and GRIP. TRs mutants where the isoleucine 280 has been replaced by an arginine (I280R), methionine (I280M) or lysine (I280K) were created. The transcriptional activity of these mutants were assessed in positive responsive elements (DR4, F2, and TRE_{pal}) by luciferase reporter gene assay, and the interaction with the coreguladores were assessed by GST pull down assays. Furthermore, we use the mutant F451X, described in the syndrome of resistance to TH, because this receptor interacts eagerly to corepressores. Our results showed that the mutants I280K and I280R were transcriptionally inactive in DR4, F2 and TRE_{pal}. Furthermore, when compared TR β 1 wild type, the mutation I280M not changed the transcriptional activity in DR4, F2 and TRE_{pal}. Additionally, the difference observed in the transcriptional capacity of I280M, I280R and I280K in DR4, F2 and TRE_{pal} correlated with the ability to interact with coactivators, therefore only the mutant I280M was able to connect to GRIP and the SRC1 in a manner similar to the TR wild type. Moreover, I280M, I280K and I280R showed a decrease in the ability to interact corepressor SMRT and the introduction of the mutation I280R in F451X abolished the high binding capacity of this mutant to corepressores.

To complete understanding of the differences between I280M, I280R and I280K we tested the ability to bind to T3. We observed that the mutation I280M slightly reduces the affinity to T3, while the mutations I280R and I280K abolishing the bind to T3. So I280R and I280K addition to prevent the TR binding to corepressores, also prevent the binding to the hormone, which is not the case with the I280M.

Moreover, I280M, I280R and I280K heterodimerization with RXR was similar to the TR wild type.

Given these observations, for the better understanding of the molecular mechanism involved in the repression mediated by T3, we assessed the transcriptional activity of the mutant I280R, I280M, I280K, F451X and I280R/F451X in some promoters negatively regulated by T3 as: Collagenase-1, thyrotropin releasing hormone (TRH) and Superoxide dismutase-1 (SOD-1). The sum of our findings show that, in general, these promoters, in the absence of T3, TR stimulates transcription activation and this is somehow dependent on the interaction with corepressores. Moreover, the transcription repression mediated by T3, depends on the maintenance of the coactivator interaction surface.

In conclusion, differences in the results seen in our mutants appears to be secondary to differences between the amino acids side chains isoleucine, arginine, lysine and methionine (Isoleucine and methionine have hydrophobic side chains, arginine and lysine have polar and positively charged side chains). The residue I280 is located on the corepressor binding surface, it makes direct contact with the corepressores, in other nuclear receptors its correspondent is always hydrophobic (isoleucine, Leucine, Valine, Methionine), and apparently has the task of interacting with amino acids from the inner surface of H12. Thus, positively charged side chain amino acids lysine and arginine might prevent support of H12 in its correct position, which, therefore, prevent the formation of coactivator binding surface and also decrease the affinity for the ligand. Moreover, the negatively regulated promoters, in the absence of T3, and the TR transcription activation depends on the maintenance of the corepressor interaction surface, while the T3 mediated transcription repression requires the maintenance of the coactivators interaction surface.

1.1 Introdução

A importância dos hormônios tireoideanos (HTs) no desenvolvimento, homeostase, proliferação e diferenciação celular é bem documentada. Sabe-se que nos mamíferos os HTs atuam em todos os órgãos e vias metabólicas. Seus principais efeitos incluem o desenvolvimento de vários tecidos, como o do sistema nervoso central, regulação da temperatura corporal, frequência cardíaca, consumo de oxigênio e também o metabolismo de carboidratos, proteínas e gorduras. Além disso, participam da síntese e da degradação de muitos outros fatores de crescimento e hormônios, o que resulta em outros efeitos secundários, com por exemplo, a indução de estresse oxidativo (Ribeiro, Apriletti *et al.*, 1995; Norman e Litwack, 1997; Santos, Afonso *et al.*, 2006).

Os níveis circulantes de HTs é mantido por um mecanismo de regulação preciso e específico operado pelo hipotálamo e pela hipófise no controle da taxa de secreção da tireóide. A Tirotropina (TSH) é um hormônio hipofisário que aumenta a atividade de secretória das células da tireóide. A secreção de TSH pela hipófise é controlada pelo tripetídeo hipotalâmico chamado de hormônio liberador de tirotropina (TRH). O aumento da concentração dos HTs nos fluidos corporais inibem a secreção tanto de TSH na hipófise quanto de TRH no hipotálamo. TSH também inibe a secreção de TRH (Guyton e Hall, 2006; O'shea, Bassett *et al.*, 2006).

A principal forma do HT secretada pela glândula tireóide é a 3,5,3',5'-tetraiodo-L-tironina (tiroxina ou T4) e uma menor quantidade é secretada como 3,5,3'-triiodotironina (T3), a forma ativa do hormônio. O total plasmático de T4 é cerca de 40 vezes maior que o de T3 (90nM versus 2nM) (Yen, 2001) e a principal fonte de produção de T3 ocorre através da conversão de T4 em T3 por meio da 5' desidodação de T4 nos tecidos periféricos promovida pelas desidodases (Norman e Litwack, 1997; Yen, 2001).

Uma vez secretados, os HTs circulam comumente ligados às proteínas plasmáticas e somente 0,03% de T4 e 0,3% de T3 estão livres. A ligação desses hormônios às proteínas plasmáticas aumenta suas meias-vidas e assegura uma

distribuição regular do hormônio nos tecidos alvos. Já a entrada e a saída do hormônio nas células ocorre, em uma menor parcela, por difusão passiva e outra principal através de transportadores específicos que regulam a captação e o efluxo dos hormônios tireoideanos (Ribeiro, R. C. J., Apriletti, J. W. *et al.*, 1998; Hennemann, Docter *et al.*, 2001). No interior da célula, o T3 liga-se a receptores específicos localizados no núcleo, os receptores do hormônio tireoideano (TRs), pertencentes a família dos receptores nucleares. Os TRs medeiam a ação do hormônio ligando-se diretamente na região promotora dos genes alvos regulando, assim, sua transcrição (Ribeiro, R. C. J., Apriletti, J. W. *et al.*, 1998). São três os TRs encontrados nos mamíferos, TR α 1, codificado pelo gene THRA, e TR β 1 e TR β 2, codificados pelo gene THRB (Flamant, Gauthier *et al.*, 2007).

Os TRs, como os receptores nucleares em geral, possuem uma estrutura muito similar: um domínio amino-terminal, um domínio central de ligação ao DNA (DBD) e um domínio carboxi-terminal de ligação ao hormônio (LBD). O domínio amino-terminal é extremamente variável tanto no tamanho quanto na seqüência de aminoácidos e exibe uma função de ativação transcricional independente do ligante (Warnmark, Treuter *et al.*, 2003). Para o TR, sua importância ainda não é totalmente conhecida, pois alguns estudos mostraram que sua deleção tem pouco efeito sobre a resposta transcricional ao T3 (Ribeiro, R. C. J., Apriletti, J. W. *et al.*, 1998; Wu, Xu *et al.*, 2001). O DBD é o domínio mais conservado entre todos os receptores nucleares e tem como função principal a ligação ao DNA. O LBD é menos conservado que o DBD, refletindo a variedade de ligantes que atuam nesses receptores. E, além da ligação ao hormônio, o LBD é importante para a dimerização e para a interação com complexos protéicos corre reguladores (Wu, Xu *et al.*, 2001).

Os sinais transmitidos pelos HTs podem variar de maneira tecido e gene específica e, além disso, o TR pode ativar ou reprimir a expressão dos genes alvos. O modelo geral da regulação da transcrição gênica dos receptores nucleares se aplica aos TRs, entretanto, com algumas particularidades (Williams, 2000). TRs se ligam ao DNA em seqüências específicas chamadas elementos resposivos ao T3 (TREs) localizadas promotores dos genes alvos como

homodímero e, principalmente, como heterodímeros com o receptor retinóico X (RXRs). Os principais TREs “positivos”, onde o TR se liga e ativa a transcrição na presença de T3, são: DR4 (5'-AGGTCANNNNAGGTCA-3'), F2 (5'-TGACCTNNNNNAGGTCA-3'), e TREpal (5'-AGGTCATGACCT-3') (Desvergne, 1994). Ao contrário dos receptores de hormônios esteróides, a ligação do TR ao DNA não é hormônio dependente. Além disso, acredita-se que o RXR seja um parceiro silencioso na ativação da transcrição gênica. No entanto, estudos recentes indicam que, pelo menos em alguns casos, o ligante do RXR, o ácido retinóico 9-cis, pode ativar os heterodímeros TR-RXR (Li, Li *et al.*, 2002; Castillo, Sanchez-Martinez *et al.*, 2004; Li, Yamada *et al.*, 2004). Na ausência de ligantes os TRs recrutam diretamente os corepressores basais [NcoR (Nuclear Receptor Corepressor) ou SMRT (silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor)], que funcionam com plataformas para o recrutamento de outros complexos com atividade histona deacetilase (HDAC), que condensam a cromatina na região promotora. Nesta situação, a atividade do promotor alvo é muito menor do que na ausência do receptor, um fenômeno chamado de repressão basal ou silenciamento basal (Eckey, Moehren *et al.*, 2003). Com a ligação do T3 ocorrem mudanças conformacionais no LBD do receptor que rompe a interação do TR aos corepressores (Marimuthu, Feng *et al.*, 2002), e monta a superfície utilizada para ligação aos coativadores. Uma variedade de complexos coativadores são recrutados pelo TR ligado ao hormônio, dentre eles destacam-se: coativadores de receptores esteróides da família p160 [(SRC-1/NCoA1), (TIF2/GRIP1/SRC-2/NCoA2), (ACTR/pCIP/AIB1/RAC3/TRAM-1/SRC-3/NCoA3)], Proteína ligadora de CREB (CBP-CREB-binding protein/P300/pCAF), o complexo mediador TRAP (TR associated protein) e outros. Estes diferentes complexos possuem atividade histona acetilase (HAT), que descondensa a cromatina na região promotora, e também funcionam como um ponte entre o TR e a RNA polimerase II, responsável pela transcrição Gênica (Ribeiro, R. C. J., Apriletti, J. W. *et al.*, 1998; Feng, Jiang *et al.*, 2000; Flamant, Gauthier *et al.*, 2007) (**Figura 1.1**).

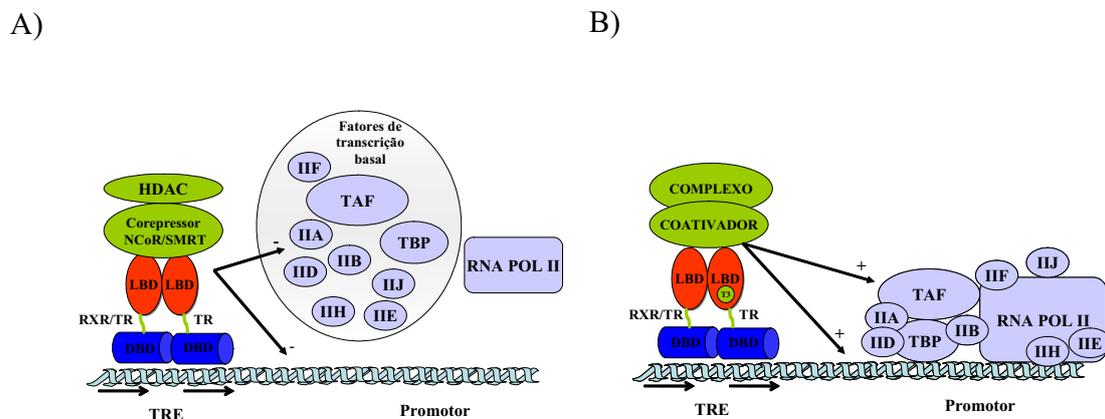


Figura 1.1, A) Modelo de repressão da transcrição pelo receptor do hormônio tireoideano na forma de homo (TR-TR) ou heterodímero (RXR-TR) na ausência do ligante (T3). O TR ligado às regiões regulatórias de genes alvo recruta um complexo corepressor, que desacetila as histonas na região promotora. A desacetilação das histonas compacta a cromatina e impede a organização dos fatores de transcrição basal, reprimindo assim a transcrição. **B)** Modelo de ativação da transcrição pelo receptor do hormônio tireoideano: A ligação do T3 ao TR modifica sua estrutura conformacional, desfazendo sua interação com o corepressor. O TR passa a interagir com o complexo de coativadores, acetilando histonas e relaxando a cromatina na região promotora. Estas modificações permitem a organização da maquinaria de transcrição basal e ativação a transcrição.

Este mecanismo apesar de bem aceito, as vezes considerado como um dogma, possui varias insuficiências. Primeiro, o modelo parece ser uma supersimplificação, porque não leva em conta mais da metade das interações proteína-proteína T3 dependente e T3 independente documentadas. Por exemplo, TR se interage com Ciclina D1 (Lin, Zhao *et al.*, 2002), subunidade TFIIH p62 (Liu, Ando *et al.*, 2005), RNAs não codificantes chamados “SRA” (RNA ativador de receptores esteróides) (Xu e Koenig, 2004), Coativador 1 do PPAR γ (Wu, Delerive *et al.*, 2002). Segundo, ele não explica como a ação do TR pode ser específica uma vez que os elementos responsáveis DR4 podem ser reconhecido por uma serie de outros receptores nucleares como, RXR, Receptor X do Fígado (LXR), Receptor X de Pregnanos (PXR), Receptor Constitutivo de Androstanos (CAR). Finalmente, o modelo não explica a repressão gênica mediada pelo T3, que é de

suma importância para a regulação negativa do TRH e TSH *in vivo* (Flamant, Gauthier *et al.*, 2007).

A regulação negativa exercida pelo HT sobre a produção de TRH e TSH garante a estabilidade dos níveis de HT séricos. Este tipo de regulação negativa exercida pelo HT pode ser bem mais prevalente e importante do que se imaginava e, como dito anteriormente, seu funcionamento não pode ser explicado pelo mecanismo de ação do TR atual. Análises de transcriptoma revelam que o TR ligado exerce, direta ou indiretamente, tanto regulação positiva quanto negativa na mesma célula e em muitos genes alvos (Yen, Feng *et al.*, 2003). Além disso, existem indicações de que o TR na ausência de T3 pode ativar e na presença reprimir a transcrição ao atuar sobre elementos responsivos chamados de “negativos” por um mecanismo molecular aparentemente diferente (Jho, Radoja *et al.*, 2001; Nygard, Wahlstrom *et al.*, 2003; Jho, Vouthounis *et al.*, 2005). Entretanto, a existência dos TRE negativos nos promotores não está claramente estabelecido, e a necessidade de ligação do TR ao DNA para regulação negativa ainda está em discussão (Flamant, Gauthier *et al.*, 2007). Vários estudos têm sugerido que a regulação negativa é realizada por meio de uma ligação direta TR-DNA (Takeda, Nagasawa *et al.*, 1997; Laflamme, Hamann *et al.*, 2002; Flamant, Gauthier *et al.*, 2007). Recentemente, foi demonstrado que a ligação direta do TR β_2 ao DNA é requerida para a regulação negativa dependente de T3 (Shibusawa, Hollenberg *et al.*, 2003). Esta hipótese foi demonstrada por meio de um mutante TR β_2 -GS125 em que dois aminoácidos (glutamato e glicina, localizados na região do dedo de zinco do DBD do TR β_2) foram mutados para glicina e serina, respectivamente. Com este mutante, a regulação negativa dos genes TRH, TSH β e TSH α , e também a regulação positiva em DR4, F2 e TRE β foram abolidas. O significado fisiológico da ligação TR-DNA foi confirmada pelo achado de que camundongos mutantes homocigotos para TR β_2 -GS125 (TR $\beta^{GS/GS}$) apresentaram uma regulação anormal no eixo hipotálamo-hipófise-tireóide e problemas de retina, idêntico às anormalidades previamente observadas no camundongo nocaute para o TR β (TR $\beta^{-/-}$) (Shibusawa, Hashimoto *et al.*, 2003).

Esses resultados indicam que a ligação TR-DNA pode ser necessária para a regulação transcricional negativa.

Para a regulação da atividade do promotor do TRH já foram identificados seis potenciais sítios de ligação do TR ao DNA envolvidos na regulação deste gene (sítios 1-6, localizados entre os nucleotídeos -250 e +55). Porém, a caracterização dos elementos que medeiam o efeito do TR e do T3 demonstrou que o sítio 4, de seqüência TGACCT, e localizado entre as bases -60 e -55, exerce uma maior importância na regulação negativa e por isso é considerado o principal TRE negativo no promotor do TRH (Hollenberg, Monden *et al.*, 1995; Satoh, Yamada *et al.*, 1996; Guissouma, Dupre *et al.*, 2002). Já foi demonstrado que a interação DNA-TR é mais forte neste sítio (Hollenberg, Monden *et al.*, 1995), que é bem conservado entre outras espécies (Hollenberg, Monden *et al.*, 1995; Satoh, Yamada *et al.*, 1996; Balkan, Taviani *et al.*, 1998; Satoh, Monden *et al.*, 1999).

A isoforma TR β exerce, preferencialmente, a regulação inibitória da transcrição gênica do TRH de humanos e de ratos, sendo assim considerada isoforma-específica (Satoh, Yamada *et al.*, 1996; Guissouma, Dupre *et al.*, 2002). TR β_1 e TR β_2 inibem a expressão do TRH de camundongos de forma semelhante (Guissouma, Ghorbel *et al.*, 1998), porém no TRH de humanos o TR β_2 é mais eficiente que TR β_1 na repressão dependente do ligante (Langlois, Zanger *et al.*, 1997).

No promotor do TRH o TR se liga ao coativador SRC-1 de maneira T3 dependente e SRC-1 anula a ativação na ausência do hormônio, mostrando que esse co-regulador prejudica a ativação e auxilia na repressão gênica (Guissouma, Dupre *et al.*, 2002). Em contrapartida, a super-expressão de N-CoR e SMRT abole a repressão dependente de T3 (Becker, Seugnet *et al.*, 2001) e aumenta a ativação independente do ligante. De fato, o NCoR interage com TR no sítio 4 na ausência de T3 e a adição do hormônio promove a sua dissociação. Uma hipótese para estes resultados é que os co-repressores antagonizam a repressão dependente de T3 pelo seqüestro de moléculas chave, como as HDACs (Satoh, Monden *et al.*, 1999), ou ainda, que o TR interage com os co-repressores de

maneira diferenciada nestes promotores, e ao invés de recrutar outros peptídeos repressores, recrutam proteínas que estimulam o complexo de iniciação transcricional (Berghagen, Ragnhildstveit *et al.*, 2002; Yang, Huang *et al.*, 2002).

Recentemente, nosso grupo descreveu que o promotor da superóxido dismutase-1 (SOD-1) é significativamente estimulado pelos TRs (TR β 1 e TR α 1) e o T3 inverte esta ativação de forma dose dependente. A região no promotor da SOD-1 entre os nucleotídeos -157 e +17 foi essencial para atuação do TR e o DBD do receptor intacto foi também absolutamente necessário para esta regulação. Ademais, foi observada ligação fraca do TR a três regiões do promotor. O TR se ligou como monômero na sequência entre os nucleotídeo -87 e -46, e esta ligação foi aumentada pela adição de T3. Se ligou também como homodímero e monômero nas sequências de +23 a +69 e +64 a +104, e a adição de T3 favoreceu a formação de monômeros. A sequência de -87 a -46 do promotor da SOD-1 é próxima a região TATA box do gene e contém a sequência TTTGGG a qual esta presente em outros promotores regulados negativamente. A troca desta sequência por ATGCAT aboliu a ligação do TR. Além disso, o mutante GS125, que não atua sobre o promotor da SOD-1, foi incapaz de se ligar a sequência TTTGGG. Assim, estas evidências sugerem que o TR regula o promotor da SOD-1 por se ligar ao TRE negativo localizado entre -87 e -46. Estes resultados corroboram com estudos anteriores que mostraram a presença de TREs muito próximos da região TATA box em genes regulados negativamente. Além disso, TR mutantes que não se interagem com correpressores não ativam bem o promotor da SOD-1 e TR mutantes que não se interagem com os coativadores não apresentaram a regulação negativa T3 dependente. Estes resultados indicam que o papel das superfícies de ligação aos correpressores e coativadores estão invertidas no promotor da SOD-1, como observado para outros genes regulados negativamente (Santos, Afonso *et al.*, 2006).

Porém, existem evidências de que os genes alvos podem adotar mecanismos distintos para a repressão mediada pelo T3 e que uma interação TR-DNA não seja absolutamente necessária. A repressão da transcrição que não envolve a associação do TR ao DNA é o mecanismo de regulação gênica feita

pelo T3 sobre a proteína ativadora-1 (AP-1). AP-1 é um fator de transcrição dimérico composto de produtos da família dos proto-oncogenes *jun* e *fos* (Angel e Karin, 1991), sendo c-Jun o principal componente do complexo AP-1 (Bohmann, Bos *et al.*, 1987; Angel e Karin, 1991). Essas proteínas podem se homodimerizar (c-Jun/c-Jun) ou heterodimerizar (c-Jun/c-Fos) e são capazes de se ligar a um sítio específico do DNA, o sítio AP-1, que é composto da seqüência consenso: 5'-TGAG/CTCA-3' (Lee, Mitchell *et al.*, 1987; Angel e Karin, 1991). O complexo protéico AP-1 em resposta a fatores de crescimento, citocinas, promotores de tumor (TPA) e diversos oncogenes (*src* e *ras*), é capaz de induzir a expressão de vários genes envolvidos na proliferação e na diferenciação celular, e assim, desenvolve um papel crítico na regulação do crescimento normal e neoplásico (Herschman, 1991). Um exemplo clássico desses genes é da colagenase-1 humana, cuja expressão é largamente determinada pelo complexo AP-1 (Gutman e Wasylyk, 1990; Angel e Karin, 1991; Doyle, Pierce *et al.*, 1997). Ademais, os receptores nucleares: TR (Zhang, Wills *et al.*, 1991), ER (Kushner, Agard *et al.*, 2000; Cheung, Acevedo *et al.*, 2005), RAR (Nicholson, Mader *et al.*, 1990) e GR (Jonat, Rahmsdorf *et al.*, 1990; Yang-Yen, Chambard *et al.*, 1990), podem se interagir com o complexo AP-1 e regular negativamente a expressão desses genes (Perez, Palomino *et al.*, 1994). Esta interferência sobre a atividade AP-1 não é mediada pela ligação direta dos receptores ao DNA, mas sim por uma interação proteína-proteína dos receptores com *c-jun* ou *c-fos* (Zhang, Wills *et al.*, 1991). Assim, em genes regulados pelo complexo AP-1, o TR não ligado ao T3 ativa e o TR ligado ao T3 reprime a transcrição gênica, como ocorre em outros genes regulados negativamente por este hormônio. O DBD do TR também é requerido para a repressão, pois também participa da interação proteína-proteína. Um TR mutante sem o DBD é incapaz de reprimir, na presença de T3, o promotor do *c-fos* (além de inibir a atividade do AP-1, o TR também é capaz de bloquear efetivamente a expressão de c-Fos e, dessa forma, a formação do complexo AP-1 potencializando seu efeito inibitório) (Perez, Palomino *et al.*, 1994). Por outro lado, a região N-terminal não é requerida para interação com Jun (o TR se interage com Jun e não com Fos (Lopez, Schaufele *et al.*, 1993).

O mecanismo de ação pelo qual o TR interfere na atividade do AP-1 ainda não está muito claro. Uma das hipóteses é que TR e AP-1 competem por um co-fator comum para ambas proteínas. Essa hipótese foi demonstrada pela super-expressão do coativador CBP (CREB-binding protein), que restaura a atividade do AP-1 reprimida pelo TR ligado (Kamei, Xu *et al.*, 1996). Além da competição por coativadores, um outro mecanismo pelo qual o TR, e outros receptores nucleares, interferem com AP-1 é via impedimento da fosforilação de c-Jun pela inibição das JNKs (Jun amino-terminal kinase). A fosforilação das serinas 63 e 73 potencializa a ação de c-jun sobre AP-1 permitindo que ocorra a ligação entre c-jun e o coativador CBP. Os receptores nucleares na presença de seus ligantes inibem ativação das JNKs, logo inibem a ligação da CBP a Jun, o que reprime a transcrição dos genes regulados por AP-1 (Caelles, Gonzalez-Sancho *et al.*, 1997).

Finalmente, para a regulação da atividade do promotor do TSH α (no promotor do TSH α o TR não se liga diretamente ao DNA) o TR, em solução e na ausência T3, recruta os correpressores que por sua vez seqüestram as histonas de-acetilases (HDAC). O sequestro destas de-acetilases não permite a condensação da cromatina favorecendo a ativação da transcrição. Com a ligação do T3 ao TR, ocorre a dissociação do complexo correpressor/HDAC e associação com coativadores. Os coativadores por sua vez seqüestram as histonas acetilases (HATs) e outros fatores de transcrição o que favorece a repressão da transcrição (Tagami, Park *et al.*, 1999).

Conhecer a estrutura tridimensional de uma proteína é importante para se entender suas funções. Até o momento, a estrutura cristalográfica dos receptores nucleares foi determinada para o domínio do LBD e para o DBD separadamente. A estrutura completa de um receptor nuclear ainda não foi definida em virtude das dificuldades técnicas de se cristalizar todos os domínios simultaneamente. A estrutura cristalográfica de muitos LBDs de receptores nucleares, incluindo a do TR α 1 de ratos e TR β 1 humano é muito similar. O LBD do TR é composto por 12 α -hélices (H) e 4 folhas β (S) organizadas em 3 camadas (**Figura 1.2**) (Wagner, Apriletti *et al.*, 1995; Wurtz, Bourguet *et al.*, 1996). A camada central contém o

hormônio alojado em seu interior e 4 α -hélices antiparalelas H5-6, H9 e H10. As α -hélices H1, H2, H3, H4, e S1 formam uma das faces do LBD, e as α -hélices H7, H8, H9, H11 e H12 formam a face oposta (Wagner, Apriletti *et al.*, 1995).

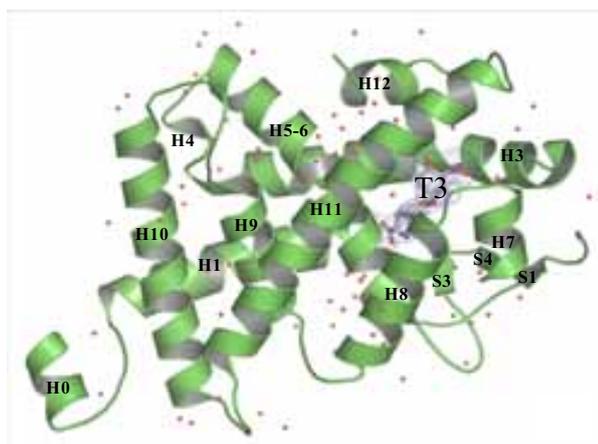


Figura 1.2. Estrutura cristalográfica do LBD de TR β 1 humano - Demonstração das α -hélices e das fitas β que compõem o LBD em presença do hormônio que se aloja no centro da proteína. Observações: H0 hélice representa a última hélice do DBD. H2 e S2 não visualizadas. A cristalização e determinação da estrutura do TR β 1 foi realizada pelo Grupo de Cristalografia de Proteínas e Biologia Estrutural do Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo. Adaptado de (Barra, Velasco *et al.*, 2004)

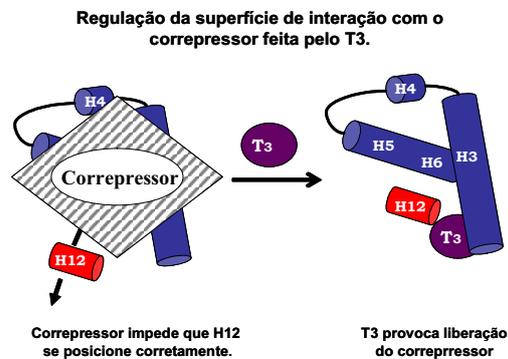
Nesta estrutura o ligante se aloja na cavidade localizada no interior do LBD. A parte superior desta cavidade é composta por segmentos da H5-6, a parte inferior por partes das H7, H8 e pelo “looping” entre estas duas hélices. Já as laterais são formadas por segmentos da H2, H3, H11, H12 e pelo looping entre S3 e S4 (Wagner, Apriletti *et al.*, 1995). O volume da cavidade é de 600 Å³, ou seja, um valor suficiente para alojar os 530 Å do hormônio.

Em relação ao TR, o LBD é funcionalmente complexo executando várias atividades, incluindo a ligação ao hormônio, dimerização do receptor e interação com correpressores e coativadores. O conhecimento da estrutura cristalográfica do TR foi fundamental para a compreensão do seu mecanismo molecular da ação. Desse modo, utilizando-se a estrutura cristalográfica foi possível realizar uma série de mutações pontuais nos aminoácidos da superfície do LBD do TR β 1 humano

que levaram à identificação da superfície de interação deste domínio com os coativadores. Como estas mutações foram posicionadas somente na superfície do LBD, e não em seu interior, a estrutura global do domínio não foi rompida e as alterações na função que por ventura apareceram foram devido à perda da função exercida pelo aminoácido mutado. Desta forma, Feng e cols, demonstraram a participação da hélice 12, e de resíduos da hélice 3 e 5-6 na interação com coativadores. Esta região de interação com coativadores consiste em uma pequena superfície composta pelos resíduos V284, K288, I302, K306, L454 e E457 localizados nas hélices 3, 5-6 e 12 (**Figura 1.3 e 1.4**), pois mutações pontuais nestas hélices impediram a ligação dos coativadores ao LBD do TR que, conseqüentemente, perdeu a capacidade de ativar a transcrição pelo T3 (Feng, Ribeiro *et al.*, 1998).

Por dificuldades técnicas envolvidas na cristalização, a estrutura do TR na ausência do hormônio ainda não foi determinada, assim, as alterações conformacionais induzidas pela ligação do hormônio ao TR não são ainda conhecidas com precisão. Por esse motivo, para se ampliar o conhecimento sobre as potenciais mudanças conformacionais do TR na ausência do ligante, a estrutura cristalográfica do TR ligado ao hormônio foi comparada com a do RXR humano na ausência do ácido 9-cis-retinóico (Bourguet, Ruff *et al.*, 1995). Esta comparação revelou que a maioria das hélices do TR e do RXR puderam ser sobrepostas e a principal alteração conformacional observada com a presença do hormônio está na hélice 12. Quando o receptor nuclear está sem o ligante a hélice 12 encontra-se aberta, e com a ligação do hormônio a hélice 12 encontra-se dobrada sobre o corpo do receptor. Conseqüentemente, nesse modelo, a superfície de interação com o coativador é formada quando a hélice 12 se fecha sobre o LBD (Ribeiro, R. C., Apriletti, J. W. *et al.*, 1998; Yen, 2001) (**Figura 1.3**).

A)



B)

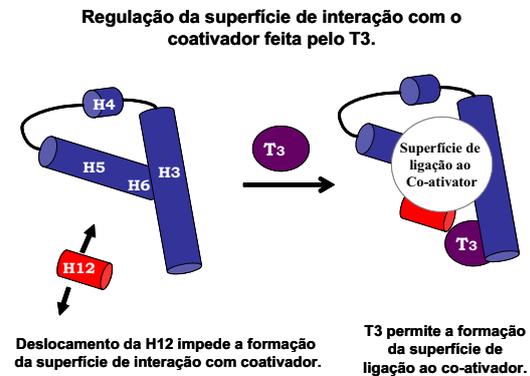


Figura 1.3, A) Desenho esquemático mostrando as alterações conformacionais provocadas pela ligação do T3 ao TR. Na forma de aporeceptor (na ausência do ligante) a hélice 12 se encontra deslocada do corpo de receptor e correpressores se interagem com o TR. Na forma de holoreceptor (na presença do ligante) a hélice 12 provoca o deslocamento do correpressor e se sobrepõe ao corpo do receptor. B) Desenho esquemático mostrando as alterações conformacionais provocadas pela ligação do T3 ao TR. Na forma de aporeceptor a hélice 12 se encontra deslocada do corpo do receptor e o correpressor é capaz de se interagir com o TR. Na forma de holoreceptor a hélice 12 se sobrepõe ao corpo do receptor e a superfície de interação com o coativador é formada.

Além disso, estrutura cristalográfica do LBD do TR foi fundamental também para identificação dos aminoácidos importantes para interação com correpressores (Marimuthu, Feng *et al.*, 2002) e para homo e heterodimerização (Ribeiro, Feng *et al.*, 2001). A superfície de ligação do TR aos correpressores é composta principalmente pelos resíduos T277, I280, T281, V283, V284, K288, I302, K306 e C309 localizados na H3 e na H5-6, estes resíduos posicionam atrás ou próximos da H12, segundo estrutura cristalografica do LBD (**Figura 1.3 e 1.4**) (Marimuthu, Feng *et al.*, 2002). Os resíduos V284, K288, I302 e K306 também fazem parte da região de ligação aos coativadores e, juntamente com L454 e E457, que pertencem a H12, completam esta superfície. Já os resíduos T277, I280, V283, e C309 estão sobrepostos pela H12 e ficam expostos quando esta é deletada ou teoricamente aberta (**Figura 1.3 e 1.4**). Assim, podemos observar que as superfícies de interação aos correpressores e coativadores possuem alguns

resíduos em comum (V284, K288, I302, K306) e outros resíduos específicos (T277, I280, T281, V283, C309 - correpressores) e (L454, E457 - coativadores), ou seja, é possível dizer que as superfícies se sobrepõem. Assim, esses dados fornecem outra evidência de que a H12 se movimenta com a ligação do hormônio, sendo esta uma das alterações estruturais chave para interação do TR com os correpressores.

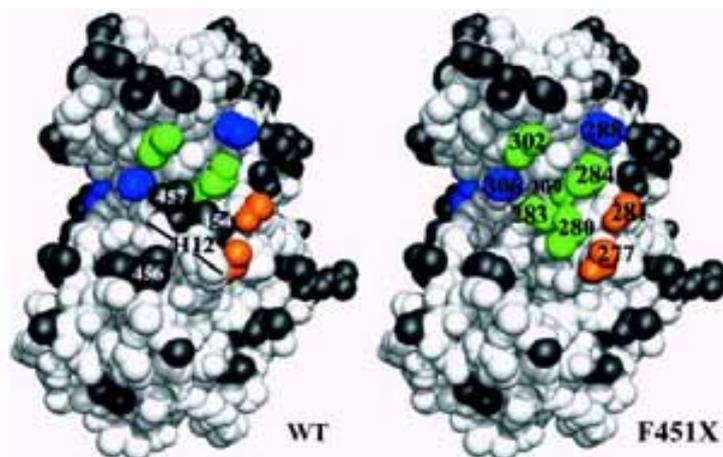


Figura 1.4 : Estrutura cristalográfica do TRwt mostrando os aminoácidos da superfície de ligação ao coativador e o posicionamento da H12. E também a estrutura do TR com a H12 deletada (mutante F451X), onde podemos visualizar os resíduos importantes para a interação com os correpressores (Marimuthu, Feng *et al.*, 2002).

No presente estudo, nós avaliamos a importância do resíduo I280 para a interação do TR β 1 com os corepressores e com os coativadores, e também o papel dessas interações na repressão transcricional mediada pelo hormônio tireoideano. Para isso, selecionamos mutantes com diferentes afinidades por estas proteínas (I280R, I280M, I280K, F451X e I280R/F451X). Estudos anteriores demonstraram que mutações no resíduo I280 (I280M e I280K) impedem que o receptor se associe ao corepressor NCoR, diminuem a afinidade pelo T3 (I280M $K_d = 0,24$ nM versus TRwt $K_d = 0,035$ nM), mas não impede sua ligação ao coativador GRIP-1, nem sua atividade transcricional em F2 (dados desmotrados apenas para o I280M e não para o I280K)(Marimuthu, Feng *et al.*, 2002). A mutação natural do TR (F451X), onde a H12 está ausente, apresenta baixa afinidade pelo T3 (F451X $K_d = 100$ nM) (Marimuthu, Feng *et al.*, 2002), é incapaz de se associar aos coativadores SRC-1a e GRIP1(Santos, Afonso *et al.*, 2006), mas se interage

avidamente aos corepressores NCOR (Marimuthu, Feng *et al.*, 2002) e SMRT (Santos, Afonso *et al.*, 2006), tanto na ausência quanto na presença do ligante. O receptor F451X com uma mutação no I280 é incapaz de se associar tanto aos corepressores quanto aos coativadores (Marimuthu, Feng *et al.*, 2002).

1.2 OBJETIVO

Estudar a importância do resíduo I280 para interação do TR β 1 com correpressores e coativadores e avaliar o papel dessas interações na repressão transcricional mediada pelo hormônio tireoideano.

1.3 MATERIAIS E MÉTODOS

1.3.1 - Vetores Plasmídiais

O plasmídeo pCMX-hTR β 1 foi utilizado para a síntese do receptores do hormônio tireoideano β 1. A transcrição deste vetor é controlada pelo promotor do citomegalovírus o que permite sua expressão em células de mamíferos e pelo promotor da RNA polimerase do bacteriófago T7 que permite sua expressão em sistemas de transcrição e tradução in vitro. Os detalhes da construção desses plasmídios foram descritos anteriormente (Umesono, Murakami *et al.*, 1991; Feng, Ribeiro *et al.*, 1998).

Os vetores que codificam o TR β 1 com a troca da isoleucina 280 para lisina e isoleucina 280 para metionina (M) (pCMX-I280K e pCMX-I280M) foram gentilmente doados pelo Professor Brian West e estão descritos em (Marimuthu, Feng *et al.*, 2002). Os vetores que possuem a mutação de isoleucina 280 para arginina (pCMV-I280R) e a deleção dos 10 últimos aminoácidos do TR β 1 (pCMX-F451X) foram gerados pela técnica de mutagênese sítio-dirigida (Quick Change Site-Directed Mutagenesis; Stratagene), empregando-se oligonucleotídeos sintéticos (primers), contendo a seqüência de nucleotídeos necessárias criação das respectivas mutações. O Duplo mutante I280R/F451X foi construído adicionando a mutação I280R ao mutante pCMX-F451X.

Os plasmídeos para expressão de proteínas de fusão com Glutathione S-Transferase (GST) utilizados foram pGEX (Pharmacia- Upjohn), PGEX-SRC1 (381-882) (Feng, Ribeiro *et al.*, 1998) , PGEX-GRIP1 (563-767) , PGEX-SMRT (987-1491) (Webb, Nguyen *et al.*, 2003), pGEX-RXR α (completo) (Feng, Ribeiro *et al.*, 1998) e codificam as proteínas GST, GST-SMRT, GST-SRC1, GST-GRIP e GST-RXR, respectivamente. Estes plasmídeos, assim como os plasmídeo reporteres contendo os elementos resposivos positivos DR4/F2/TRE α 1-TK-LUC e o promotor regulado negativamente Δ Coll T3-LUC (Lopez, Schaufele *et al.*, 1993), foram gentilmente doados pelo Dr. Jonh D. Baxter. O promotor do hormônio liberador de tirotropina (TRH) (Guissouma, Dupre *et al.*, 2002) e da superóxido

dismutase (SOD-1) (Santos, Afonso *et al.*, 2006) estão clonados no plasmídeo pGL3 (promega) e foram gentilmente cedidos pelos respectivos autores.

1.3.2 - Expressão e purificação de proteínas recombinantes em *Escherichia coli*.

Nesse trabalho as proteínas de fusão com glutathione-s-transferase (GST) utilizadas foram expressas em *E.coli* e purificadas segundo protocolo descrito abaixo: 50 μ l de bactérias *E.coli* cepa BL21 foram transformadas com 1-2 μ g dos plasmídeos, pGEX, pGEX-SRC1 (381-882), pGEX-GRIP1 (563-767) ou pGEX-SMRT (987-1491), que expressam respectivos fragmentos das proteínas em questão fusionados ao GST. A colônia isolada foi inoculada em 5ml de meio de cultura 2x LB (pré-inóculo) e crescida por 6-10 horas a 22°C. Após o término desse período, o pré-inóculo foi dividido transferido para dois frascos de 500 ml de 2x LB com ampicilina. Essas bactérias cresceram até a OD⁶⁰⁰ de 0.8 quando foi adicionado à cultura IPTG (concentração final de 1mM). Esta cultura permaneceu a 22°C por 16 horas para que a proteína de fusão fosse expressa. Ao final desse período, as células foram separadas por centrifugação e ao precipitado celular foi adicionado 20 ml/litro de cultura de TST 1x (50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl e 0.05% Tween 20), 500 μ l de lisozima (10mg/ml), e toda a mistura foi transferida e incubada no gelo durante 15 minutos. Ao final desse período, as células foram lisadas por sonicação (4 pulsos de 20 segundos no nível 5.5 com um intervalo de 5 minutos entre cada pulso). Logo após, o lisado celular foi separado por centrifugação a 12.000 rpm por 30 minutos. Concomitantemente, 665 μ l de beads com glutathione na superfície foram preparados segundo as instruções do fabricante. Resumidamente, os beads foram lavados com 5 volumes de TST 1x e separados por uma centrifugação rápida (5000 rpm por 2 minutos). Em seguida, para que pudessem interagir com o GST da proteína, esses beads foram ressuspensos em 500 μ l de TST 1x e adicionado ao sobrenadante da cultura. Essa incubação foi mantida a temperatura de 4°C durante 2 horas. E em seguida os beads foram coletados por centrifugação 5000 rpm por 5 minutos e seguidamente lavados 3 vezes com 20 ml de TST 1X. Após a lavagem os beads foram ressuspensos em 600 μ l de TST 1X contendo 1mM de DTT, 0.5 mM de PMSF,

1:1000 de coquetel inibidor de protease (SIGMA) e 1 ml de glicerol. Os beads contendo as proteínas de fusão foram guardados a -20°C até o momento da sua utilização nos ensaios de interação proteína-proteína em solução (GST).

1.3.3 - Ensaio de interação proteína-proteína em solução (GST “Pull down”)

O ensaio de GST “Pull Down”, simplificado e chamado de GST, é utilizado para verificar a capacidade de duas proteínas se interagirem *in vitro*. Para isto, utiliza-se duas proteínas, sendo que uma delas necessita estar fusionada ao GST e a outra deve estar radiomarcada. A proteína fusionada ao GST funcionará como uma isca e a proteína radiomarcada será a presa a ser pescada. A proteína de fusão funciona como uma isca porque está fixada a uma partícula pesada de aproximadamente 45-165 µm, os beads de Sepharose™ com moléculas glutaciona na superfície que facilita sua precipitação e separação da solução estudada. O preparo da proteína de fusão fixada a uma partícula pesada utiliza-se do próprio processo de purificação da proteína de fusão conforme foi descrito no item anterior. Desta forma, o ensaio consiste em incubar a isca (beads-GST-proteína de interesse) com a proteína radiomarcada sintetizada *in vitro* (presa – TR selvagem ou mutantes), no tampão GST Binding Buffer (GBB - TST 1X, 0,1% Triton X-100, 0,1% NP-40, 1mM DTT, 0,5mM PMSF e 1:1000 de coquetel de inibidores de protease). Após 100 minutos de incubação, os beads com a proteína de fusão, associado ou não à proteínas sintetizadas *in vitro*, são centrifugados e o material precipitado é lavado 2x com GST Binding Buffer para remoção de proteínas que fizeram ligações inespecíficas. Caso a proteína radiomarcada seja capaz de se interagir com a proteína de interesse, esta também será precipitada. Caso contrário, ou seja, não ocorra interação, não conseguiremos “pescar” nenhuma proteína, pois esta será eliminada durante as lavagens. Em seguida, para se avaliar a interação da presa com a isca, o precipitado da incubação é analisado em “SDS-PAGE” seguido posteriormente de uma autoradiografia. Assim, a presença de uma proteína radiomarcada no precipitado é sinal de que ela foi capaz de se interagir com a proteína de fusão (GST) (**Figura 1.5 e 1.6**). Além disto, com a finalidade de se quantificar quanto da proteína sintetizada *in*

in vitro interagiu com a proteína de fusão, no momento da análise da reação de GST no SDS-PAGE é aplicado em um poço separadamente uma quantidade conhecida da proteína radiomarcada utilizada em cada reação. Esse poço é denominado de input.

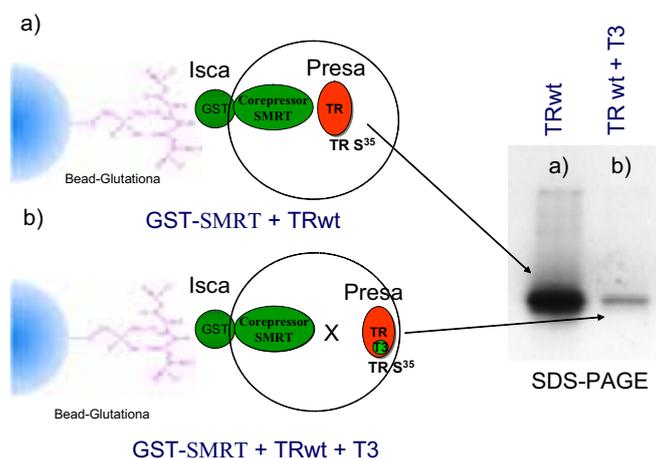


Figura 1.5, Desenho esquemático da interação entre a proteína isca e a presa no ensaio de GST. Neste exemplo foi utilizado o corepressor GST-SMRT para se interagir com o TR selvagem radiomarcado com S^{35} , na ausência (a) e na presença de T_3 (b). Nota-se que na ausência do ligante o TR se interage bem com o corepressor. No entanto, na presença de T_3 esta interação é reduzida drasticamente.

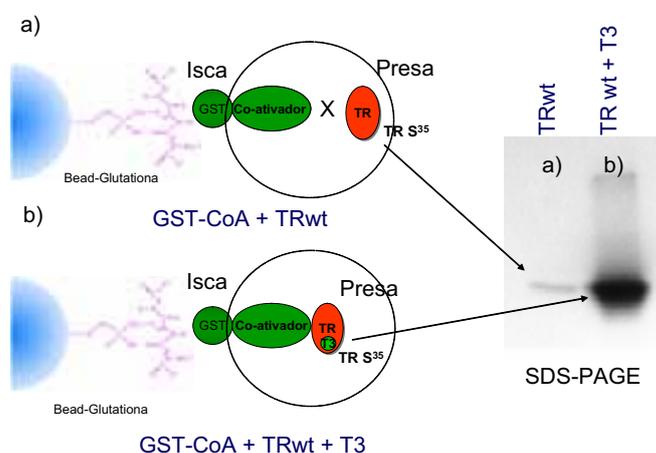


Figura 1.6, Desenho esquemático do ensaio de GST com Coativadores. Neste exemplo foi avaliada a capacidade de ligação do coativadores GST-SRC ao TR selvagem radiomarcado com S^{35} , na ausência (a) e na presença de T_3 (b). Nota-se que na ausência do ligante o TR não se interage com o coativador e a adição de T_3 promove esta interação.

1.3.4 - Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida com sulfato duodecil sódico (SDS)

A eletroforese de proteínas, em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE), foi utilizada para confirmar a eficiência da síntese protéica *in vitro* e as reações de GST “pull down”. As proteínas foram submetidas a separação eletroforética segundo protocolo descrito por Laemmli (Laemmli, 1970). Para a análise da expressão de proteínas de fusão o gel foi corado com comassie blue. Para a análise das proteínas radiomarcadas ou das reações de GST, o gel foi fixado em uma solução de 30% de metanol e 10% de ácido acético glacial durante 30 minutos, sendo em seguida colocado pelo mesmo período de tempo em uma solução amplificadora (Amplify, Amershan) utilizada para intensificar a transmissão da energia radioativa e secado a vácuo sob uma folha de papel de filtro a 70°C por 40 minutos (Geldryer, Biorad). O gel, já seco, foi colocado em um chassis radiográfico juntamente com um filme de raio-X (Kodak) e submetido a autoradiografia a -80°C por um período de 12 horas quando era analisada a eficiência da síntese de proteínas e por 12-96 horas para as reações de GST.

1.3.5 - Síntese in vitro de Proteínas.

Os receptores utilizados para os ensaios de GST foram sintetizados utilizando-se o kit de transcrição e tradução *in vitro* (TNT T7-Quick coupled Transcription/Translation System-Promega). Nesta técnica, plasmídeos pCMX contendo o cDNA do TR β 1wt ou dos mutantes sob controle do promotor T7 são adicionados a um sistema que contém toda a maquinaria protéica necessária para a transcrição e tradução deste cDNA. Esse sistema consiste de um lisado de reticulócitos de coelho suplementado com 40 μ M de ZnCl₂, dos aminoácidos (exceto a metionina), da T7 RNA polimerase, ribonucleotídeos, e um inibidor de RNase. A metionina (1 μ L) radiomarcada com enxofre 35 (Met-S³⁵, Amershan-

Pharmacia) foi adicionada somente no momento da reação de síntese dos receptores. As reação foram feitas em tubo de microcentrifuga de 1,5 ml com adição de 1-2 μg do plasmídeo a 25 μl dos componentes descritos anteriormente e incubada em banho maria a 30°C por 90 minutos. Após o término da reação uma alíquota de 1ul era retirada para verificação da eficiência da síntese em SDS-PAGE (**Figura 1.7**), e o restante foi armazenado a -80°C.

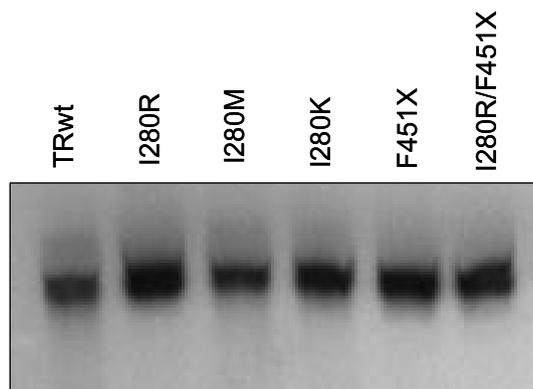


Figura 1.7 - Síntese in vitro das proteínas marcadas radioativamente utilizadas como presa utilizando-se o kit TNT T7-Quick. Podemos observar que a síntese protéica do TR β 1 selvagem, I280R, I280M, I280K, F451X e I280R/F451X radiomarcados foi eficaz.

1.3.6 - Cultura de células, transfecção e ensaio da atividade da enzima luciferase.

Os procedimentos de cultura de células, transfecção e ensaio da atividade da enzima luciferase foram realizados de acordo com métodos descritos anteriormente (Chiellini, Apriletti *et al.*, 1998). Para isto, utilizamos células derivadas de promonócitos humanos (U937) obtidas do Centro de Cultura de Células da Universidade da Califórnia, San Francisco (UCSF – University of California San Francisco). Estas células foram cultivadas em meio RPMI 1640, contendo 10% de soro fetal bovino com 2mM glutamina, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ penicilina e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ estreptomicina e mantidos em uma incubadora 37°C com 5% de CO₂. O método de electroporação foi utilizado para a transfecção das células mantidas em cultura. As células U937 (9 milhões) foram coletadas por centrifugação e suspensas em 0,5mL de solução PBS (Phosphate Buffered Saline) contendo 0.1% dextrose. Estas células foram a seguir misturadas a 4 μg do plasmídeo repórter e de 0,5 μg do vetor de expressão dos TRs e a seguir transferidas para

uma cuveta. Após manutenção em temperatura ambiente por 5 minutos foram eletroporadas utilizando-se um gerador de pulso (Bio-Rad) com voltagem de 0,3 volts e 960 μ F. Imediatamente após, as células eletroporadas foram transferidas para recipientes contendo 4mL de RPMI 1640 com 10% soro fetal bovino. Nesse meio, as células foram ressuspensas e colocadas em triplicata em placas de 12 poços (1mL/poço), e em seguida foram incubadas por 24hs a 37°C com etanol (veículo) ou 10⁻⁷ M de T3. Para o ensaio da enzima Luciferase, as células foram coletadas das placas de 12 poços e transferidas para tubos de eppendorf de 1,5mL e centrifugadas por 1 minuto a 13.000 rpm. O sobrenadante foi aspirado e descartado, enquanto que o precipitado celular foi lisado e solubilizado pela adição de 150 μ L de 0,25M tris- HCl, pH 7,6 contendo 0,5% de triton X 100 a 0.1%. O lisado celular foi misturado com o substrato para enzima luciferase, a luciferina (Luciferase Assay System – Promega) e a medida da atividade desta enzima foi quantificada em um luminômetro (Turner).

1.3.7 - Cálculo da taxa de ativação e análise estatística

Para o cálculo da taxa de ativação nos experimentos de transfecção e ensaio com gene repórter, utilizamos os valores da leitura da luciferase nos experimentos tratados com T3 e dividimos pelo valor da leitura nos experimentos tratados com etanol (veículo).

$$\text{Taxa de ativação} = (\text{Leitura da luciferase c/ T3} / \text{Leitura da luciferase s/ T3}).$$

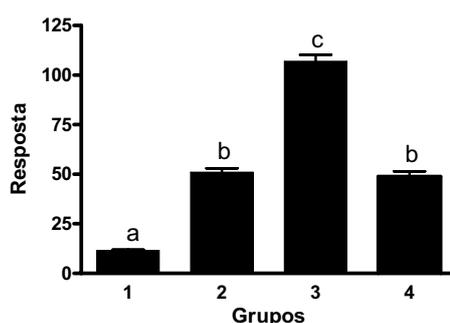
Esse valor, taxa de ativação, foi utilizado para o cálculo do percentual de resposta alcançado, considerando-se o maior valor da taxa de ativação do T3 como sendo a resposta máxima ou 100%.

$$\% \text{Taxa de ativação} = (\text{Taxa de ativação do receptor em questão} / \text{Taxa de ativação do TR selvagem}) \times 100\%$$

Com relação às transfecções nos promotores regulados negativamente, é apresentado porcentagem da leitura da atividade luciferase e a taxa de repressão. A porcentagem da leitura da luciferase é calculada assumindo que a leitura do TRwt ou do vetor vazio é 100%, na ausência do hormônio, a partir desta correlação se calcula a porcentagem para as outras leituras. Já a porcentagem da taxa de repressão é calculada para representar a diferença entre a leitura sem T3 da leitura com T3 pela seguinte formula:

$$\% \text{Taxa de repressão} = [(\% \text{ leitura da luciferase c/ T3} - \% \text{ leitura da luciferase s/ T3}) \times 100\%] / \% \text{ leitura da luciferase s/ T3}$$

Todos os resultados apresentados nesse trabalho representam a média e o erro padrão da média de pelo menos 4 experimentos independentes. Toda a análise estatística, assim como os gráficos apresentados, foram realizados através do programa PRISM versão 4.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). A análise estatística utilizada nos experimentos foi análise de variância seguida do teste de tukey. Os resultados foram considerados estatisticamente diferentes quando o valor de p foi < 0,05. E as diferenças ou semelhança estão representadas na forma de letras sobre as barras. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes e letras idênticas significa ausência de diferença estatística. O exemplo abaixo ilustra este tipo de representação:



As diferentes letras sobre as barras indicam que o grupo 1 é estatisticamente diferentes dos grupos 2, 3 e 4. O Grupo 2 é estatisticamente diferentes dos grupos 1 e 3, mas não é diferente do grupo 4. O grupo 3 é estatisticamente diferentes dos grupos 1, 2 e 4. E o grupo 4 é estatisticamente diferentes dos grupos 1 e 3 mas não é diferente do grupo 2.

1.3.8 - Mutação Sítio-Dirigida

Os mutantes I280R, F451X e I280R/F451X foram gerados pela técnica de mutag nese sítio-dirigida por PCR (Quick Change Site-Directed Mutagenesis, Stratagene) empregando-se oligonucleotídeos sintéticos como iniciadores (primers) contendo a seq ncia dos nucleotídeos mutados (substitui o do códon codificador do aminoácido correto por um codificador do aminoácido arginina ou um stop códon no caso do F451X).

Por esse método, utilizando os primers relatados acima, o vetor de expressão do TR 1 nativo (pCMX-hTR 1) foi amplificado utilizando-se a enzima pfu DNA polimerase de alta fidelidade gerando plasmídeos mutantes. Para separar os plasmídeos nativos dos mutantes utilizou-se a enzima Dpn I, a qual digere DNA metilado. O DNA original se encontra metilado, pois   proveniente de uma purifica o de plasmídeo feita a partir de E.coli que, naturalmente, metila seu DNA através do sistema DAM metilase. Então, os plasmídeos mutantes não são degradados pela Dpn I, pois foram gerados pela rea o de PCR, são transformados em E.coli DH5 , cultivados em meio LB e purificados por miniprep (QUIAGEN). A seq ncia mutada foi verificada por sequenciamento do DNA (Sequenase, Stratagene).

1.3.9 - Ensaio prote o contra tripsina

3 l do TR 1 selvagem ou dos mutantes sintetizados *in vitro* com Met-S³⁵ foram pre-incubados com T3 (10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} M) ou veículo (etanol) por 20 minutos a temperatura ambiente em um volume final de 10 l de TST 1X. Em seguida foi acrescentado tripsina (concentra o final na rea o de 10 mg/ml) durante 10 minutos. Os produtos das rea o es foram fervidos e analisados por SDS-PAGE seguido de autoradiografia (Pissios, Tzameli *et al.*, 2000).

1.3.10 - Ensaio de ligação ao T3

Os TRs foram expressos utilizando o kit (TNT T7-Quick coupled Transcription/Translation System-Promega). E as afinidades da ligação ao T3 foi determinada utilizando-se o ensaio de ligação saturante. Resumidamente, 15 fmol de cada proteína sintetizada *in vitro* foi incubada “overnight” a 4 °C com concentrações variadas de T3 marcado com I¹²⁵ (PerkinElmer Life Sciences) em 100 µl do tampão E400 (400 mM NaCl, 20 mM KPO₄, pH 8, 0.5mM EDTA, 1.0 mM MgCl₂, 10% glicerol), 1 mM monotioglicerol, e 50 µg de histonas de timus de bezerro [(“calf thymus histones”) Calbiochem]. O T3 I¹²⁵ ligado foi isolado por gravidade através de uma coluna de Sephadex G-25 (Amersham Biosciences) de 2 ml e quantificado em um contador-γ (COBRA, Packard Instruments). As curvas de ligação foram montadas por regressão não linear e a constante de dissociação (K_d) foram calculados utilizando os modelos de ligação de saturação de um sitio “one-site saturation binding” e decaimento exponencial de uma fase “one-phase exponential decay”, respectivamente, presentes no programa PRISM versão 4.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).

1.4 RESULTADOS

1.4.1-TR com diferentes mutações no resíduo I280 apresentam atividade transcricional específicas.

Primeiramente, atividade transcricional dos diferentes mutantes no resíduo I280 (I280R, I280M, I280K), do F451X e do duplo mutante I280R/F451X sobre TREs (DR4, F2 ou TREpal) foi testada em ensaios de gene reporter. A ativação transcricional nestes TREs é extremamente dependente da dissociação dos correpressores e interação com os coativadores na presença de T3 (Feng, Ribeiro *et al.*, 1998). No ensaio, células promonocíticas humanas U937 foram transfectadas com vetores de expressão codificando o TR β 1 selvagem ou os TR β 1 mutantes, juntamente com uma construção reporter dirigida pelos elementos responsivos DR4, F2 ou TREpal. Os resultados obtidos nestes ensaios demonstraram que apenas o mutante I280M foi capaz de ativar estes TREs-Tk-LUC de forma comparável ao TR β 1 selvagem. Taxa de ativação transcricional de $82,9\pm 5\%$, $41,9\pm 8\%$ e $63,3\pm 21\%$ foram observadas para I280M em DR4, F2 e TREpal, respectivamente. Os demais mutantes apresentaram taxa de ativação transcricional diminuída e significativamente diferente da apresentada pelo TR selvagem (**Figura 1.8, A, B, e C**). No mesmo sentido, os mutantes F451X e I280R/F451X também não apresentaram atividade transcricional.

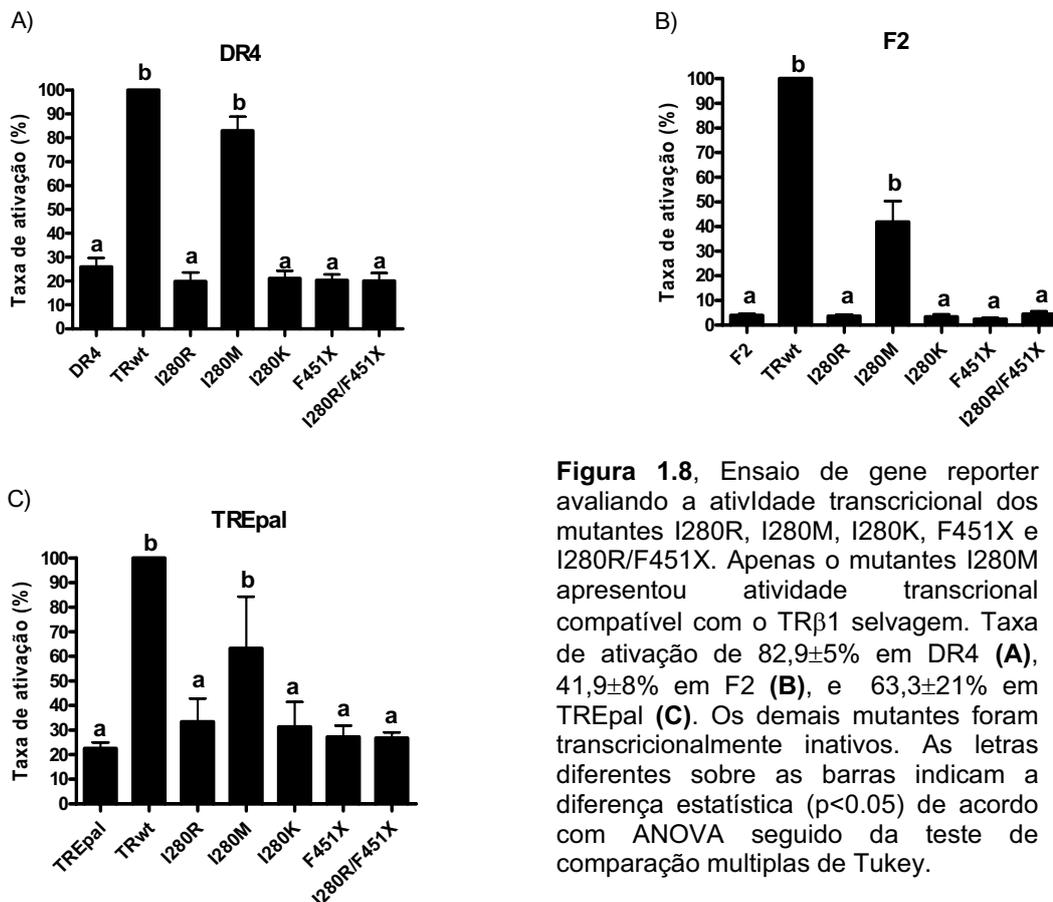


Figura 1.8. Ensaio de gene reporter avaliando a atividade transcricional dos mutantes I280R, I280M, I280K, F451X e I280R/F451X. Apenas o mutante I280M apresentou atividade transcricional compatível com o TR β 1 selvagem. Taxa de ativação de 82,9 \pm 5% em DR4 (A), 41,9 \pm 8% em F2 (B), e 63,3 \pm 21% em TREpal (C). Os demais mutantes foram transcricionalmente inativos. As letras diferentes sobre as barras indicam a diferença estatística ($p < 0.05$) de acordo com ANOVA seguido da teste de comparação múltiplas de Tukey.

1.4.2 - Mutantes I280 apresentam diferentes afinidades pelos corretores.

Em seguida, a capacidade dos mutantes se interagirem com os coativadores SRC-1, GRIP-1 e com o correpressor SMRT foi testada, *in vitro*, por ensaio de GST “pull down”. Para isto as proteínas GST, GST-SMRT, GST-SRC1a e GST-GRIP1, expressas e purificadas de bactérias, foram incubadas com TR selvagem e com os mutantes I280R, I280M, I280K, F451X e I280R/F451X, sintetizados *in vitro* e marcados com Met-S³⁵, na ausência e na presença de T3. O TR β 1 selvagem se interagiu com SMRT na ausência de T3 e a adição do hormônio rompeu esta interação (Figura 1.9 A e B, TRwt, linhas 4 e 5). Já os mutantes I280R e I280M apresentaram uma interação diminuída ao SMRT na

ausência de T3, e o mutante I280K apresentou uma interação ainda menor (**Figura 1.9 A, linha 4**), quando comparados ao TR selvagem. O mutante F451X também foi avaliado, este possui uma alta afinidade pelo SMRT, tanto na presença quanto na ausência de T3 (**Figura 1.9 B, linha 4 e 5**) (Santos, Afonso *et al.*, 2006). Por outro lado, é interessante observar que a adição da mutação I280R no F451X (I280R/F451X) aboliu completamente a alta afinidade do F451X por SMRT (**Figura 1.9 A, I280R/F451X, linha 4 e 5**). Assim, conclui-se que o I280 é importante também para ligação do SMRT ao TR β 1 e diferentes mutações (R, M e K) neste resíduo diminuem esta interação em diferentes intensidades. Outro fato observado é que os mutantes I280R e I280K apresentaram capacidade de se ligar ao SMRT na presença de T3 semelhante a observada na ausência, o mesmo não foi observado para o TR β 1 selvagem e para o I280M (**Figura 1.9 A, linha 4 versus linha 5**). Ademais, o TR β 1 selvagem se interagiu com os coativadores SRC1 e GRIP apenas na presença de T3 (**Figura 1.9 A e B, TRwt, linhas 6 versus 7 e 8 versus 9**). Entretanto, observamos que I280R, I280M, I280K interagiram com os coativadores com diferentes intensidades. O I280M se interagiu de forma semelhante ao TR β 1 selvagem com SRC1 e GRIP (**Figura 1.9 A, I280M, linhas 7 e 9**), o mutante I280R apresentou uma diminuição na capacidade de se interagir com SRC (**Figura 1.9 A, I280R, linhas 7**) e completa incapacidade de se interagir com GRIP (**Figura 1.9 A, I280R, linhas 9**), o I280K foi incapaz de se interagir com ambos coativadores (**Figura 1.9 A, I280K, linhas 7 e 9**). Como esperado, F451X (**Figura 1.9B, F451X, linhas 4 e 5**) (Santos, Afonso *et al.*, 2006) e I280R/F451X não se interagem a coativadores devido a ausência da H12. Assim, a partir desses resultados conclui-se que dos mutantes I280 apenas o I280M se interage bem aos coativadores SRC1 e GRIP.

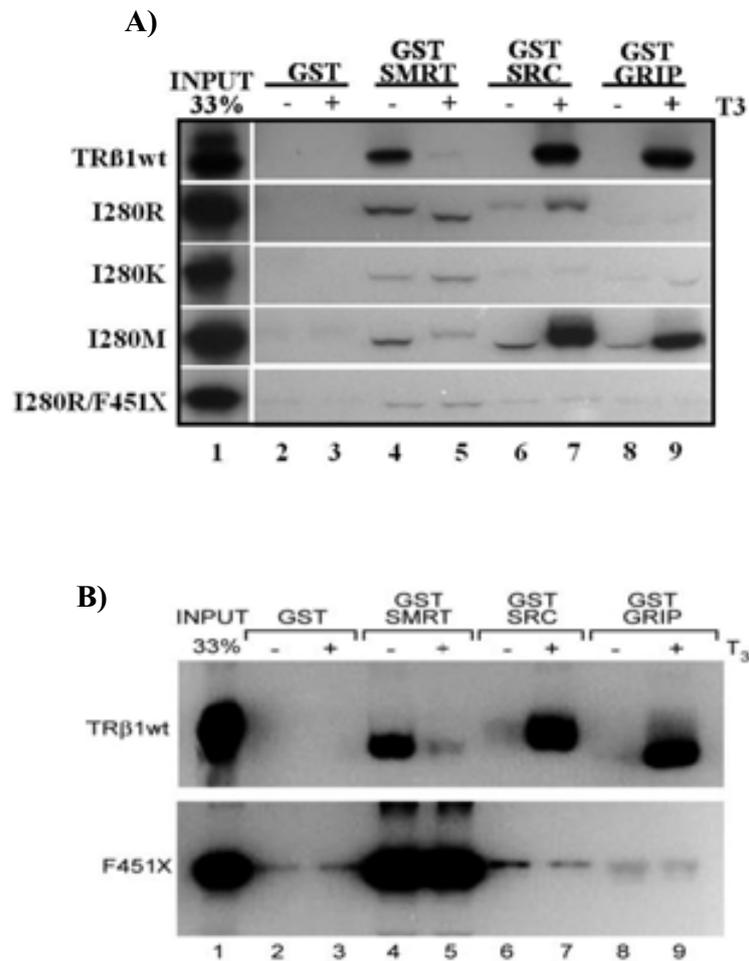


Figura 1.9, A e B) Ensaio de GST avaliando a interação entre os mutantes I280R, I280M, I280K, I280R/F451X e F451X ao correpressor SMRT e aos coativadores SRC1 e GRIP. Mutações no resíduo I280 diminuem em diferentes intensidades a afinidade do TRβ1 selvagem pelo SMRT. Afinidades do F451X > TRβ1selvagem > I280R e I280M > I280K e I280R/F451X (linha 4, A e B), TRβ1wt, I280R, I280M e I280K). O acréscimo da mutação I280R no F451X diminui a alta afinidade desse mutante pelo correpressor SMRT [(linha 4, I280R/F451X versus linha 4, F451X Figura 1.9B (Santos, Afonso et al., 2006)]. Além disso, a adição de T₃ 10⁻⁶ M rompe a ligação do TRβ1 selvagem e do I280M ao SMRT (linha 4 versus linha 5, TRβ1wt e I280M). Fato que não ocorre para I280R, I280K e I280R/F451X (linha 4 versus linha 5, I280R e I280K). Por outro lado, adição de T₃ faz com que o TRβ1 selvagem e o mutante I280M se interajam aos coativadores SRC1 e GRIP1, ou seja, a mutação I280M não interfere na capacidade do TRβ1 de se ligar aos coativadores (linhas 6 versus linha 7 e linhas 8 versus linha 9, TRβ1wt e I280M). Já as mutações I280K e I280R abolem quase por completo esta ligação (linhas 6 versus linha 7 e linhas 8 versus linha 9, I280R e I280K). Apenas o I280R foi capaz de se ligar fracamente a SRC1 na presença do ligante (linha 7, I280R).

1.4.3 - Mutantes I280 apresentam diferentes afinidades pelo T3.

Como as diferenças observadas entre I280M, I280R e I280K na ligação aos coativadores podem ser secundárias a capacidade de ligação hormônio, esta foi avaliada através do ensaio proteção contra tripsina (Bhat, Parkison *et al.*, 1993; Pissios, Tzamelis *et al.*, 2000). Para isto, o TR β 1 selvagem e os mutantes I280R, I280M, I280K, F451X e I280R/F451X, sintetizados *in vitro* na presença de Met-S³⁵ e incubados com tripsina, na ausência e na presença de T3. Neste ensaio, a ação da tripsina sobre TR β 1 selvagem, não ligado ao T3, provoca a digestão de sua banda correspondente (53kDa) e formação de uma banda de aproximadamente 24kDa. Com adição de T3 uma segunda banda, de aproximadamente 28kDa, é protegida contra a ação da tripsina indicando que o hormônio se liga ao receptor (**Figura 1.10, A**). Para os mutantes I280M, I280R e I280K a proteção promovida pelo T3 contra a ação da tripsina foi testada ao longo de concentrações crescentes do hormônio. Assim, para o TR selvagem a banda de 28kDa foi observada nas concentrações de 10^{-7} M e 10^{-6} M e para o mutante I280M na concentração de 10^{-6} M, no entanto, esta não foi observada para os mutantes I280R e I280K (**Figura 1.10, A**). Como controle foi utilizado o mutante F451X, que sabidamente tem afinidade pelo T3 muito pequena (Marimuthu, Feng *et al.*, 2002), e não foi observada banda de 28kDa na concentração de 10^{-6} M do hormônio. O mesmo foi observado para o duplo mutante I280R/F451X (**Figura 1.10, B**). Estes resultados demonstram que o mutante I280M apresenta uma menor afinidade pelo T3, e que o I280R e o I280K possuem baixa afinidade por T3.

Esses resultados foram posteriormente confirmados por ensaios ligação do TR ao hormônio marcado (T3-I¹²⁵). Para isto, TR β 1 selvagem, I280R, I280M e I280K sintetizados *in vitro* foram incubados com diferentes concentrações de T3 marcado com I¹²⁵. O T3 ligado é então isolado por gravidade através de uma coluna de Sephadex G-25 e quantificado em um contador γ . A curva de ligação é montada e a constante de dissociação (K_d) é então calculada. O K_d para o TR β 1 selvagem nestes experimento foi de $0,13 \times 10^{-9}$ M e para o I280M foi de $0,45 \times 10^{-9}$

M. Já os mutantes I280R e I280K apresentaram capacidade de ligação ao T3 extremamente baixa, o que impossibilitou a execução do ensaio. Assim, concluí-se que os mutantes I280R e I280K não se ligam bem ao T3 (**Figura 1.11, A, B, C**).

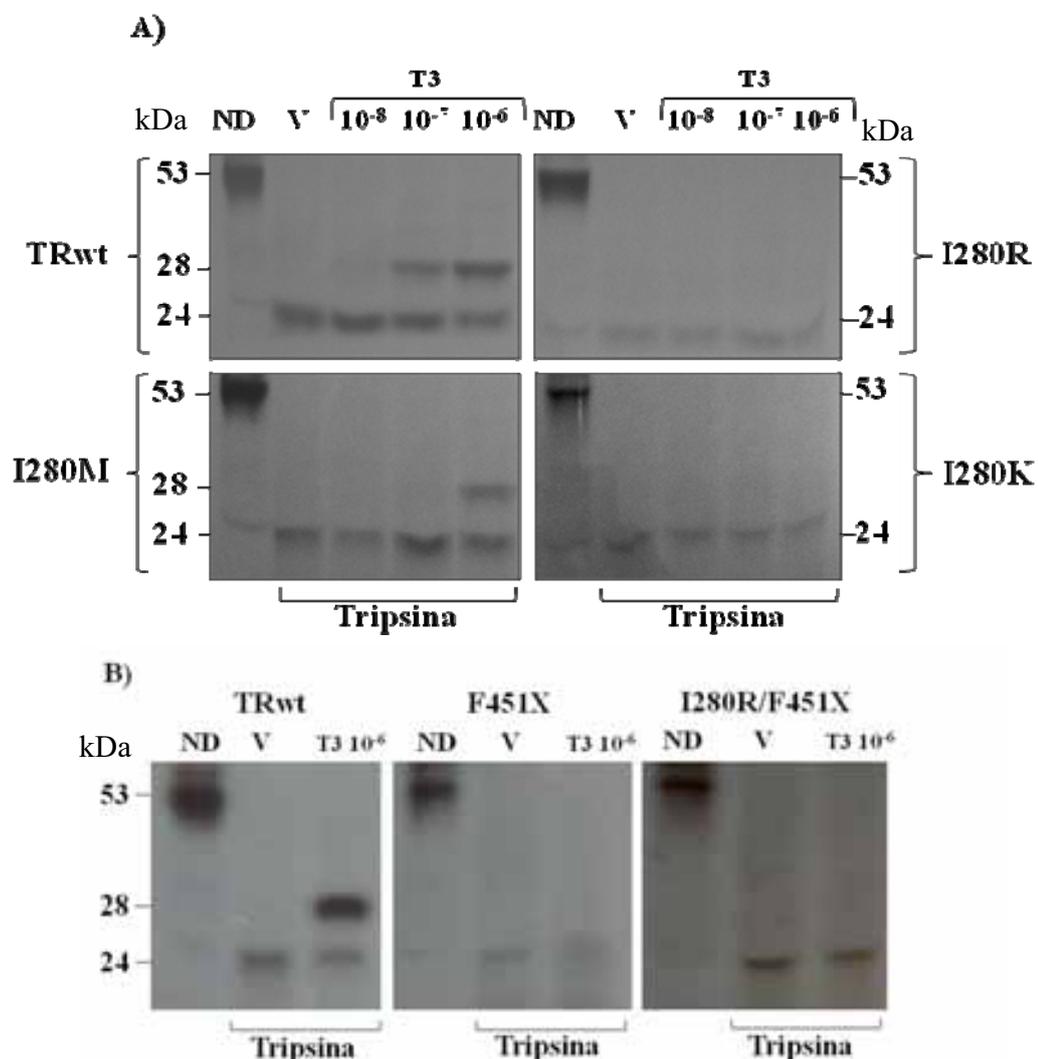


Figura 1.10, Ensaio de proteção contra tripsina para avaliar ligação dos mutantes I280R, I280M, I280K, F451X e I280R/F451X ao T3. TR β 1 selvagem e os mutantes foram sintetizados in vitro na presença de metionina [S^{35}] e incubados com tripsina na presença de veículo (V) ou T3. A tripsina atua sobre o receptor digerindo sua banda de 53 kDa em uma de 24kDa. Na presença de T3, quando esse se liga ao receptor, é observada uma segunda banda (banda protegida pelo hormônio) de 28 kDa. Assim, em A, podemos observar que a banda de 28 kDa protegida pelo hormônio contra a ação da tripsina estava presente nos ensaios com TR β 1 selvagem (concentrações de 10^{-7} M e 10^{-6} M) e o com I280M (concentrações de 10^{-6} M). Entretanto, esta não foi observada para os mutantes I280R e I280K. Isto sugere que o I280M ainda se liga ao T3, mas possui uma afinidade menor, e que os mutantes I280R e I280K não se ligam bem ao T3. Em B, como controle foi avaliada a proteção contra tripsina promovida pelo T3 para os mutantes F451X,

que não possui H12 e, sabidamente, tem uma baixa afinidade pelo T3 ($K_d=100\text{nM}$) (Marimuthu, Feng *et al.*, 2002), e para o I280R/F451X. Concentrações de 10^{-6}M de hormônio foram utilizadas. Como esperado, nenhum desses mutantes apresentou banda protegida pelo hormônio.

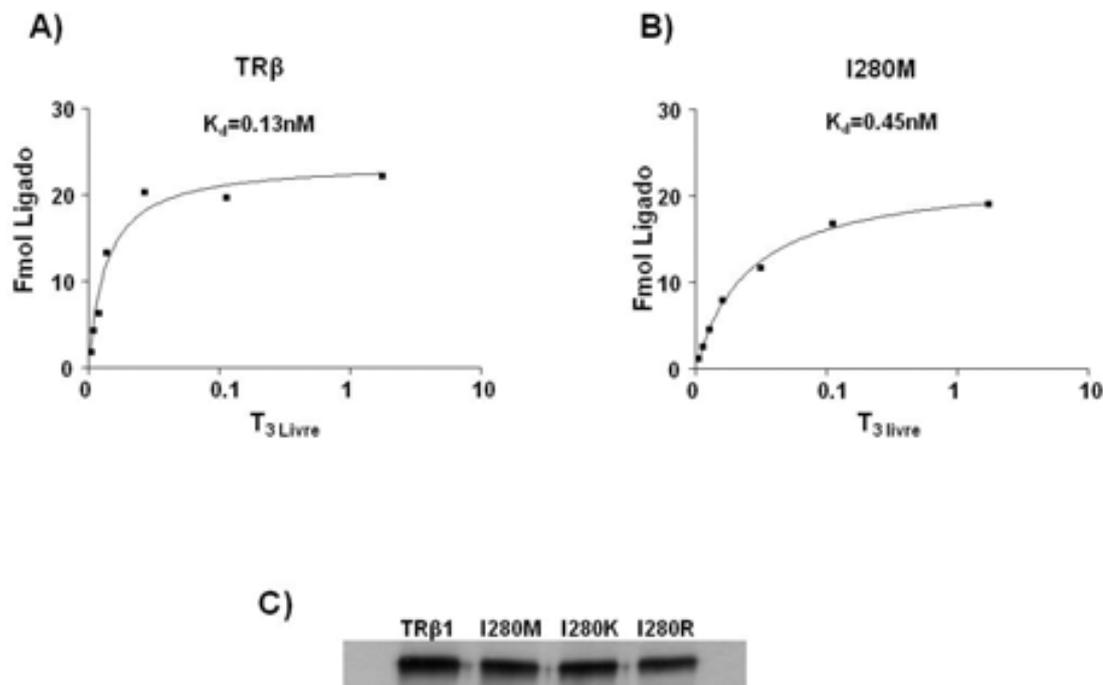


Figura 1.11, Ensaio de ligação ao T3 medindo a afinidade dos mutantes I280 pelo hormônio. As curvas de ligação ao T3 [^{125}I], em A) para a TRβ1 selvagem e em B) para o mutante I280M montadas utilizando o modelo de ligação de saturação em um sítio "one-site saturation binding". As constantes de dissociação (K_d) foram calculados utilizando o modelo de decaimento exponencial de uma fase "one-phase exponential decay". Para o TRβ1 selvagem foi de 0,13nM e para o I280M foi de 0,45 nM C) Expressão *in-vitro* do TRβ1 selvagem (TRβ1), I280M, I280K e I280M mostrando que todos os receptores estavam sendo expressos. Contudo, a ligação do T3 [^{125}I] aos mutantes I280K e I280R foi muito baixa, o que impossibilitou a execução do ensaio de ligação ao T3 para estes mutantes, sugerindo uma afinidade muito menor comparada com a do TRβ1 selvagem e I280M.

1.4.4 -Heterodimerização dos mutantes I280R e I280K está preservada.

Como os mutantes I280R e I280K não se ligaram ao T3, não se interagiram com os coativadores e, conseqüentemente, não foram transcricionalmente ativos, suspeitou-se que estes receptores poderiam não estar assumindo a conformação necessária para exercer suas funções, ou seja, não estariam se dobrando corretamente. Para testar essa hipótese a heterodimerização com RXR foi avaliada *in vitro* pelo ensaio de GST uma vez que TRβ1 e RXRα se interagem

através de uma superfície não relacionada com a superfície de interação com os corretores. Para isto, GST e GST-RXR α , expressos e purificados de bactérias, foram incubadas com TR selvagem ou os mutantes I280R, I280M, I280K, F451X e I280R/F451X sintetizados *in vitro* na presença de Met-S³⁵. Obsevamos que todos os mutantes se heterodimerizaram com o RXR de forma semelhante ao TR β 1 selvagem demonstrando que as mutações não interferem com esta propriedade do receptor, e que as proteínas estão se dobrando corretamente (Figura 1.12).

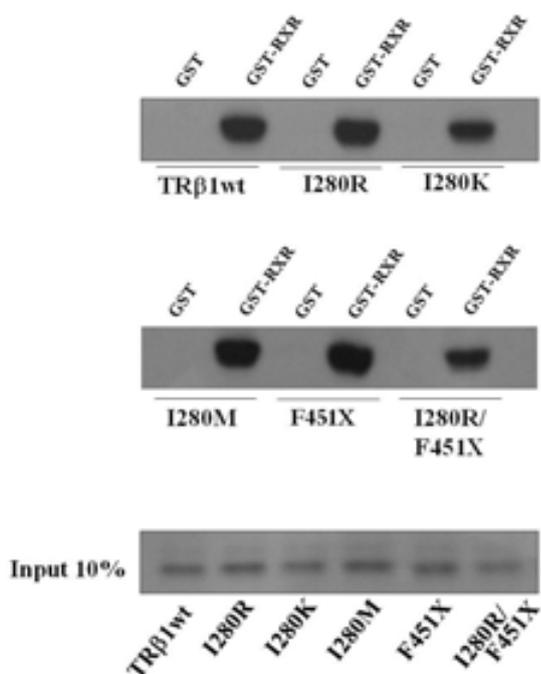


Figura 1.12. Ensaio de GST avaliando a heterodimerização com o RXR em solução do TR β 1 selvagem (TR β 1wt) e dos mutantes I280R, I280K, I280M, F451X e I280R/F451X. Todos os mutantes se interagiram com o RXR de forma semelhante ao TR β 1 selvagem.

1.4.5 - Nos genes negativamente regulados pelo T3, a superfície de ligação ao coativadores é importante para repressão e superfície de ligação aos correpressores é importante para ativação.

Em seguida, atividade transcricional dos diferentes mutantes no resíduo I280 (I280R, I280M, I280K), do F451X e do duplo mutante I280R/F451X foi testada sobre os promotores de alguns genes regulados negativamente pelo T3 (Colagenase-1, TRH e SOD-1). No ensaio, células promonocíticas humanas U937 foram transfectadas com vetores de expressão codificando o TR β 1 selvagem ou os TR β 1 mutantes, juntamente com as construções reporteres Δ colIT3-LUC, ⁻⁵⁴⁷+84TRH-LUC ou ⁻¹⁵⁷⁺¹⁷SOD-LUC.

Na **figura 1.13, painel esquerdo**, representamos o percentual da leitura de luciferase mediada pelos TR β 1mutantes em relação ao TR β 1 selvagem das transfecções realizadas no promotor da colagenase-1. Podemos observar que, além do TR β 1 selvagem (porcentagem de ativação arbitrariamente selecionada como 100%), somente os mutantes I280R e F451X foram capazes de ativar a transcrição na ausência do hormônio, sendo que as médias dos valores das leituras foram 122,7 \pm 8% e 172,8 \pm 19%, respectivamente. Inversamente, os mutantes I280M (67,14 \pm 4%), I280K (54,3 \pm 1%) e I280R/F451X (88 \pm 7%) apresentaram uma pequena capacidade de ativar a transcrição na ausência de T3. Além disso, a percentagem de ativação do vetor vazio (pCMX) foi de 62,8 \pm 3% na ausência de ligante.

Com a adição de T3 podemos observar ainda na **figura 1.13, painel esquerdo**, que redução da atividade transcricional significativa foi observada apenas para o TRwt (% da leitura diminuiu de 100% para 51,3 \pm 3%, P<0,05). As demais diferenças observadas entre as percentagem das leituras na ausência e na presença de T3 não foram significativas, sendo que os valores observados na presença de ligante foram: I280R (122,7 \pm 8% \rightarrow 105 \pm 9%), I280M (67,14 \pm 4% \rightarrow 49,7 \pm 2%), I280K (54,3 \pm 1% \rightarrow 51,6 \pm 5%), F451X (186,1 \pm 19% \rightarrow 172,8 \pm 21%), I280R/F451X (88 \pm 7% \rightarrow 71,2 \pm 6%) e pCMX (62,8 \pm 3%

→74±9%). O mutante I280M apesar de diminuir o % de ativação de 67,14±4% para 49,7±2%, essa redução não foi estatisticamente significativa. Por outro lado, ao avaliarmos a % da repressão, ou seja, a percentagem da diferença entre as leituras na presença e na ausência de T3, observamos valores de -48,6±3% para TR selvagem, -14,6±4% para I280R, -29,6±2% para I280M, -5,5±7% para I280K, -7,8±3% para F451X, -16±4% para I280R/F451X e 10,8±8% para pCMX, sendo que, exceto a % repressão observada para o I280M, todas foram estatisticamente diferentes do TR selvagem (**Figura 1.13, painel direito**). Assim, os resultados observados no promotor da collagenase-1 indicam uma tendência dos mutantes que se interagem bem aos correpressores ativar a transcrição, como por exemplo o F451X, e os que se interagem melhor aos coativadores reprimem a transcrição, como por exemplo o I280M.

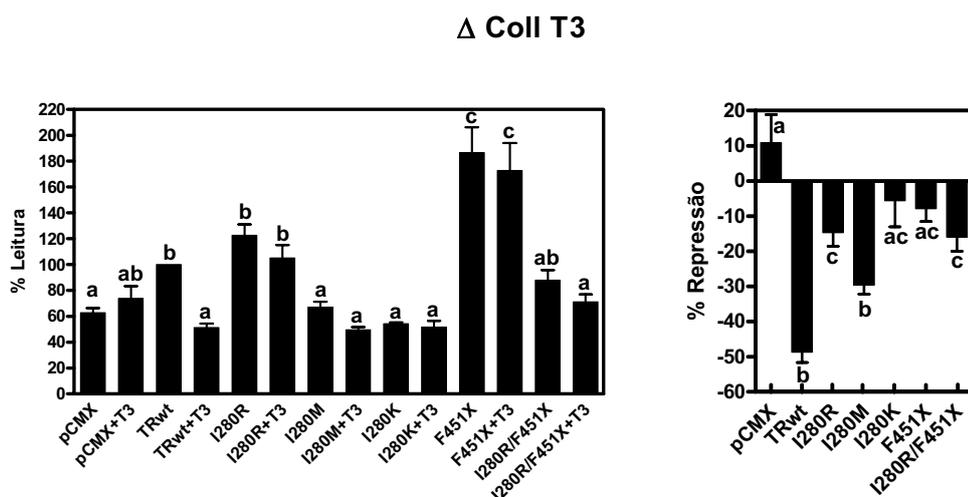


Figura 1.13, Painel esquerdo, experimentos de transfeção e análise de gene reporter luciferase examinando a % da atividade transcricional do TR β 1 selvagem e dos mutantes I280R, I280M, I280K, F451X e I280R/F451X sobre o promotor da collagenase-1, na ausência e na presença de T3. Células U937 foram transfectadas com plasmídeo reporter Δ collT3-LUC e com os vetores de expressão do TR β 1 selvagem, dos TR β 1s mutantes ou vetor vazio (pCMX) e tratadas com veículo (etanol) ou 100 nM de T3. O gráfico representa a média±erro padrão de 6 experimentos. As letras diferentes sobre as barras indicam a diferença estatística ($p < 0.05$) de acordo com ANOVA seguido da teste de comparação múltiplas de Tukey. **Painel direito**, representa % da repressão observada pelos diferentes mutantes neste experimento. As letras diferentes sobre as barras indicam a diferença estatística ($p < 0.05$) de acordo com ANOVA seguido da teste de comparação múltiplas de Tukey.

Na **figura 1.14, painel esquerdo**, representamos o percentual da leitura de luciferase mediada pelos TR β 1 mutantes em relação ao TR β 1 selvagem das transfecções realizadas no promotor do TRH. Podemos observar que, somente o mutante F451X foi capaz de ativar a transcrição na ausência do hormônio, percentagem de ativação de $146,9\pm 19\%$. O TR β 1 selvagem e os mutantes I280R, I280M, I280K e I280R/F451X apresentaram percentagem de ativação de $93\pm 5\%$, $81,1\pm 5\%$, $102,8\pm 7\%$, $93,5\pm 20\%$, $104,4\pm 11\%$, respectivamente, valores semelhante a percentagem de ativação do vetor vazio (pCMX). Neste caso, arbitrariamente selecionado como 100%, pois apresentou valores maiores que o TR selvagem na ausência de ligante.

Com a adição de T3 podemos observar ainda na **figura 1.14, painel esquerdo**, a redução na percentagens das leituras, sendo que os valores observados, na presença de ligante, foram: TR selvagem ($93\pm 5\% \rightarrow 51,1\pm 2\%$), I280R ($81,1\pm 5\% \rightarrow 73,6\pm 5\%$), I280M ($102,8\pm 7\% \rightarrow 64,1\pm 4\%$), I280K ($93,5\pm 20\% \rightarrow 86,8\pm 21\%$), F451X ($146,9\pm 19\% \rightarrow 138\pm 22\%$), I280R/F451X ($104,4\pm 11\% \rightarrow 96\pm 12\%$) e pCMX ($100\% \rightarrow 93\pm 7\%$). Apesar de nenhuma destas reduções apresentarem diferença estatística é interessante destacar que os menores valores (maior repressão) foram para TR selvagem e I280M, indicando uma maior capacidade de reprimir a transcrição na presença de T3. Neste sentido, avaliamos também a % da repressão transcricional e observamos valores de $-44,1\pm 3\%$ para TR selvagem, $-9,5\pm 2\%$ para I280R, $-34\pm 2\%$ para I280M, $-8,8\pm 5\%$ para I280K, $-5,6\pm 4\%$ para F451X, $-9,9\pm 4\%$ para I280R/F451X e $-7\pm 6\%$ para pCMX, sendo que, exceto a % repressão observada para o I280M, todas foram estatisticamente diferentes do TR selvagem (**Figura 1.14, painel direito**). Assim, estes resultados sugerem novamente uma tendência dos mutantes que se interagem bem aos correpressores ativar a transcrição e os que se interagem bem ao coativadores reprimem a transcrição.

TRH

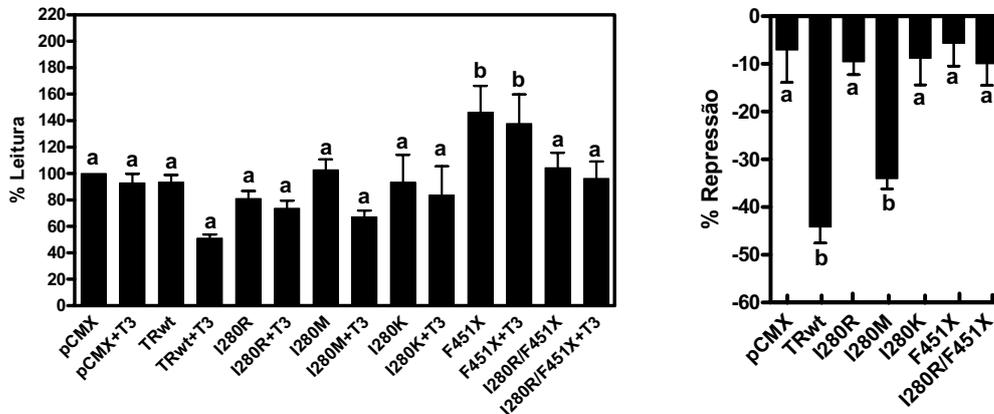
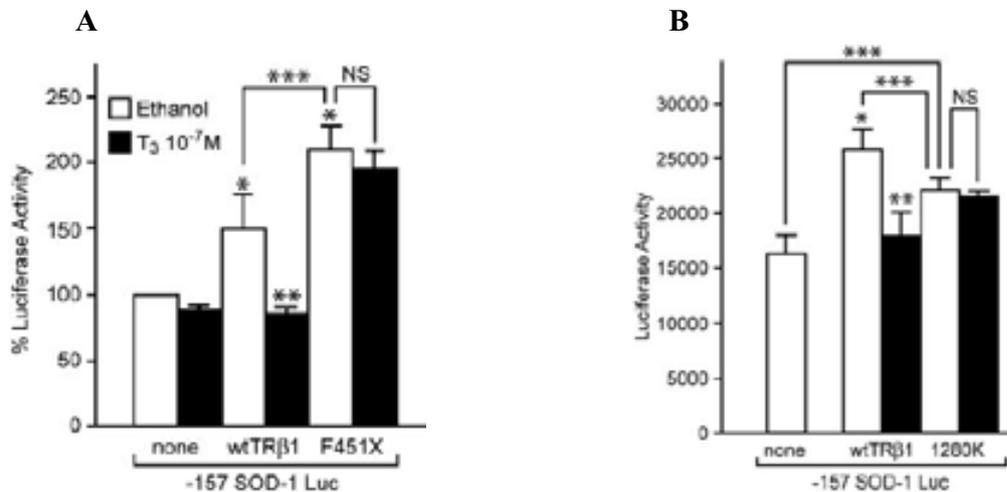


Figura 1.14, painel esquerdo, experimentos de transfeção e análise de gene reporter luciferase examinando a atividade transcricional do TR β 1 selvagem e dos mutantes I280R, I280M, I280K, F451X e I280R/F451X sobre o promotor do TRH. Células U937 foram tranfectadas com o plasmídeo reporter TRH-LUC e com os vetores de expressão para TR β 1 selvagem, TR β mutantes ou vetor vazio (pCMX) e tratadas com veículo (etanol) ou 100 nM de T3. O gráfico representa a média \pm erro padrão de 6 experimentos. As letras diferentes sobre as barras indicam a diferença estatística ($p < 0.05$) de acordo com ANOVA seguido da teste de comparação múltiplas de Tukey. **Painel direito**, representa % da repressão observada pelos diferentes mutantes neste experimento. As letras diferentes sobre as barras indicam a diferença estatística ($p < 0.05$) de acordo com ANOVA seguido da teste de comparação múltiplas de Tukey.

Em um estudo anterior descrevemos que o promotor da SOD-1 é significativamente estimulado pelo TR β 1 e a adição de T3 inverte esta ativação. Além disso, TR mutantes que se interagem bem aos correpressores, como por exemplo o F451X, ativaram eficientemente o promotor da SOD-1 e não o reprime com a adição do ligante (**Figura 1.15 A**). Inversamente, TR mutantes que não se interagem com correpressores, como por exemplo o I280K, ativam este promotor mas, não tão bem quanto o TR selvagem. Este mesmo mutante (I280K), que também não se interage bem com coativadores, apresentaram a regulação negativa T3 dependente abolida (**Figura 1.15 B**). Estes resultados indicam que o papel das superfícies de ligação aos correpressores e coativadores estão invertidas no promotor da SOD-1, o que é observado para outros genes regulados negativamente (Santos, Afonso *et al.*, 2006). Agora, nós testamos a ação do

mutante I280M (que se interage bem apenas aos coativadores) sobre o promotor da SOD-1, e observamos que na ausência de T3 este receptor ativou o promotor de forma semelhante ao TR selvagem, (100%) para TR selvagem e (99±4%) para I280M) **figura 1.15 C, painel esquerdo**. Com a adição de T3 podemos observar ainda na **figura 1.15 C, painel esquerdo** que este mutante reduziu a % da leitura tão eficientemente quanto o TR selvagem (70±7% para TR selvagem e 62±2% para I280M). O vetor vazio apresentou % de leitura de 63±2% e 76±4% na ausência e na presença de T3, respectivamente. Ao avaliarmos a repressão transcricional, observamos que realmente ambos receptores se comportaram de forma semelhante, pois as percentagens de repressão foram de -47±14% e -58±9% para TR selvagem e I280M, respectivamente. Percentagem de repressão para pCMX foi 16±5% (**Figura 1.15 C, painel superior**). Assim, estes resultados indicam que para o promotor da SOD-1, a interação com do TR com os correpressores é importante para uma boa ativação transcricional na ausência de ligante e a interação com os coativadores é importante para uma boa repressão transcricional.



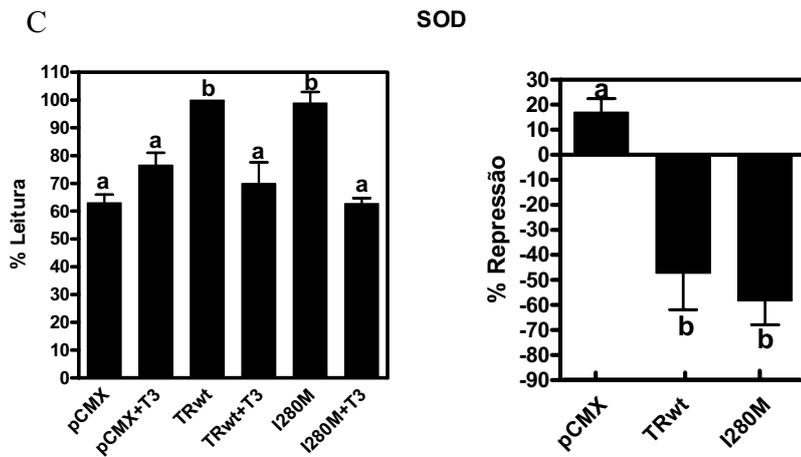


Figura 1.15 A, B e C). Experimentos de transfeção e análise de gene reporter luciferase examinando a atividade transcricional do TR β 1 selvagem e dos mutantes, F451X, I280K e I280M sobre o promotor da SOD-1. Células U937 foram tranfectadas com plasmídeo reporter - 157+17SOD-LUC e com os vetores de expressão para TR β 1 selvagem, TR β 1 mutantes ou vetor vazio (pCMX) e tratadas com veículo (etanol) ou 100 nM de T3. Os gráficos das **figura 1.15 A e B** foram retirados do artigo (Santos, Afonso et al., 2006), **Anexo I**. A **figura 1,15 C, painel esquerdo**, representa a a % da leitura da atividade luciferase (média \pm erro padrão de 4 experimentos). As letras diferentes sobre as barras indicam a diferença estatística ($p < 0.05$) de acordo com ANOVA seguido da teste de comparação multiplas de tukey. **Painel direito**, representa % da repressão do TR selvagem e do mutante I280M neste experimento. As letras diferentes sobre as barras indicam a diferença estatística ($p < 0.05$) de acordo com ANOVA seguido da teste de comparação multiplas de Tukey.

1.5 – DISCUSSÃO

A ligação do T3 ao TR β 1 induz mudanças conformacionais no receptor que promove a liberação dos correpressores e associação com proteínas coativadoras. Os correpressores se interagem com o TR β 1 através de uma superfície composta, principalmente, por aminoácidos localizados nas hélices 3 e 5-6. Com a ligação do T3 ao TR ocorre o fechamento da H12 sobre o corpo do receptor. Esse movimento da H12 desloca o correpressor e forma a superfície de interação com o coativador que é composta pelas hélices 3, 5-6 e 12. (Feng, Ribeiro *et al.*, 1998; Ribeiro, R. C., Apriletti, J. W. *et al.*, 1998; Marimuthu, Feng *et al.*, 2002).

O movimento da H12 faz com que essa hélice se sobreponha a alguns aminoácidos que compõem a superfície de ligação aos correpressores. Um dos principais resíduos que compõe a superfície de ligação ao correpressor, e que é sobreposto pela H12, é a isoleucina 280, pois mutações nesse resíduo é uma das que mais interfere com a ligação do TR β 1 ao correpressor NCoR (Marimuthu, Feng *et al.*, 2002).

Nesse trabalho, estudamos a importância do resíduo I280 na interação do TR β 1 às proteínas correguladoras e a importância dessas na modulação da transcrição mediada por T3. Para isso, utilizamos os mutantes I280R, I280M, I280K, F451X e I280R/F451X. Primeiramente, foi avaliado os efeitos dessas mutações na capacidade do TR estimular a transcrição em elementos responsivos positivos (TREs - DR4, F2, TREpal) por ensaios de gene repórter em células promonocíticas humanas (U937). Além disso, foi avaliada a capacidade de ligação dos mutantes ao correpressor SMRT e aos coativadores GRIP e SRC1 através do ensaio de GST, a ligação ao hormônio por ensaio de proteção contra tripsina e ensaio de ligação ao T3 marcado. Em seguida, avaliamos atividade transcricional desses mutantes sobre promotores regulados negativamente (Colagenase-1, TRH e SOD-1) também por ensaio de gene repórter em células promonocíticas humanas (U937).

Os resultados dos ensaios de gene repórter utilizando o TR β 1 selvagem e os mutantes mostraram que I280R e I280K foram incapazes de ativar a transcrição mediada pelo T3. O mesmo foi observado para o mutante F451X. Esse resultado pode refletir a incapacidade destes mutantes se ligar aos coativadores (fato posteriormente observado nos ensaios de GST “pull down”). Pois esta interação é extremamente necessária para ativação nos elementos responsivos positivos. Entretanto, ao se avaliar o mutante I280M observamos que esse foi capaz de ativar a transcrição nos diferentes TREs testados com uma taxa de ativação semelhante ao TR β 1 selvagem, $82,9\pm 5\%$ em DR4 e $63,3\pm 21\%$ em TREpal. No entanto, no palíndromo invertido (F2) I280M apresentou uma taxa de ativação de $41,9\pm 8\%$, apesar desse valor não ser estatisticamente diferente do TR β 1 selvagem (100%) é possível que esse resultado reflita as diferenças na estrutura que o TR assume em cada elemento responsivo e, conseqüentemente, na importância do resíduo I280 para a interação com os coativadores.

Para avaliar a interação dos diferentes mutantes ao correpressor utilizamos o ensaio de GST. Observamos que o resíduo I280 é extremamente importante para a ligação do TR β 1 ao correpressor SMRT, pois quando esse aminoácido é trocado por R, K, ou M a afinidade do TR β 1 por este correpressor diminui. Este resultado confirma os dados disponíveis na literatura (Marimuthu, Feng *et al.*, 2002) onde I280M e I280K apresentaram afinidade diminuída pelo correpressor NCoR e juntos indicam que o I280 está envolvido em contatos específicos e diretos do TR β 1 com os correpressores. Essa hipótese é reforçada pelo fato de que quando substituímos o I280 por arginina no mutante F451X a afinidade deste pelo SMRT reduziu muito. Assim, o resíduo I280 faz parte da superfície de ligação do TR β 1 ao correpressor sendo muito importante para as interações específicas com SMRT.

Outro fato observado é que os mutantes I280R e I280K apresentaram capacidade de se ligar ao SMRT na presença de T3 semelhante a observada na ausência, ou seja, a adição do ligante não influencia a interação com o SMRT. O mesmo não foi observado para o TR β 1 selvagem e para o I280M (**Figura 1.9**).

Essas observação pode indicar uma menor capacidade de ligação ao T3 do I280R e I280K quando comparados com TR β 1 selvagem e com I280M. O que realmente foi comprovado no ensaio de proteção contra tripsina e confirmado pelo ensaio de ligação ao hormônio marcado (resultados que serão discutidos posteriormente).

Quanto a ligação aos coativadores GRIP e SRC1, na presença de T3, observamos que as mutações I280R e I280K diminuem a interação do TR β 1 com esses coativadores. Por outro lado, a mutação I280M praticamente não modificou a capacidade do TR β 1 de se ligar a GRIP e SRC1. Esses resultados demonstram que, ao contrário do descrito na literatura que o resíduo I280 interfere apenas com a interação do TR β 1 ao correpressores (Marimuthu, Feng *et al.*, 2002), I280 é também fundamental para a interação do TR β 1 com os coativadores. Os resultados obtidos em nosso estudo mostram que I280K e I280R não se interagem bem com coativadores na presença de T3, diferentemente do I280M. Como a única distinção entre esses mutantes é a característica da cadeia lateral pela qual a isoleucina 280 é trocada, a hipótese mais provável para a explicação desses resultados é que existem diversidades estruturais entre esses mutantes provocadas pelas diferenças existentes entre R, M e K (**Figura 1.16**). Além disso, podemos perceber que a ligação do I280R ao coativador SRC1 diminuiu muito, mas não foi abolida como ocorreu com a ligação deste mutante ao GRIP. Isto pode ser explicado devido ao fato de que o GST-GRIP é o GST fusionado aos resíduos 563-767, onde se localizam apenas as regiões de interação com os receptores nucleares; e o GST-SRC1 ser composto dos aminoácidos 381-882 que contém as regiões de interação e mais algumas seqüências adjacentes. Essas seqüências adjacentes poderiam influenciar a capacidade de ligação do TR β 1 ao coativador.

Quanto aos aminoácidos em questão (R, M e K), sabe-se que a arginina e a lisina são aminoácidos polares e com a cadeia lateral carregada positivamente. Já a metionina é um aminoácido com cadeia lateral hidrofóbica como a isoleucina (**Figura 1.16**).

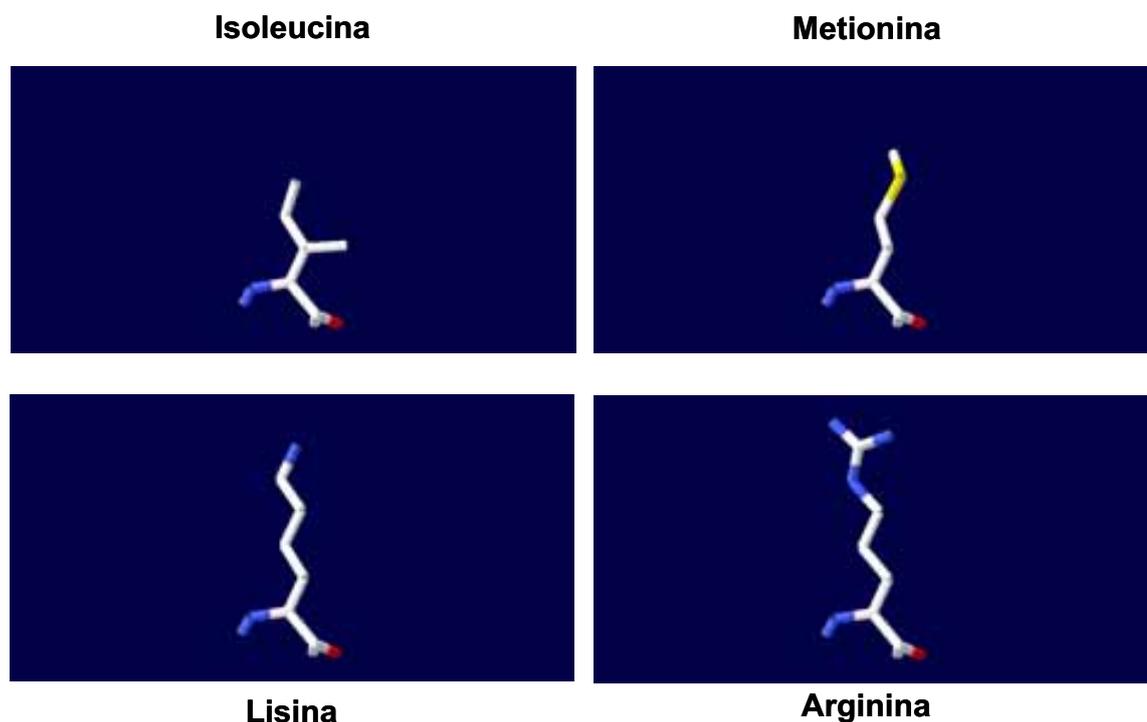


Figura 1.16, Nesta figura estão representadas as diferenças entre as cadeias laterais dos aminoácidos isoleucina, metionina, lisina e arginina. A isoleucina e a metionina são aminoácidos hidrofóbicos e podem ser substituídos um pelo outro sem muitas alterações estruturais, pois são resíduos de características semelhantes mesmo a metionina possuindo um átomo de enxofre (amarelo) na sua cadeia lateral (M.J. Betts, 2003). Entretanto, no caso do TR a isoleucina deve fazer contatos específicos com o correpressor, pois a sua troca pela metionina (I280M) diminuiu a afinidade do TR pelo SMRT. Já a lisina e a arginina são aminoácidos polares e carregados positivamente. Esta carga positiva é conferida pela presença de átomos de nitrogênio nas extremidades das cadeias laterais. A lisina possui 1 átomo de nitrogênio e a arginina 3 átomos. Desta forma, a arginina pode fazer um número maior de pontes de hidrogênio do que a lisina, apesar dessa diferença esses dois aminoácidos tem características bem semelhantes.

Assim, substituir uma isoleucina por uma arginina ou uma lisina pode provocar alterações estruturais no TR β 1, pois são aminoácidos de características diferentes. No entanto, devido ao fato da metionina ser um aminoácido hidrofóbico como a isoleucina esses dois aminoácidos são intercambiáveis sem grandes alterações estruturais (M.J. Betts, 2003). Além disso, a análise da estrutura tridimensional do LBD do TR β 1 ligado ao T3 revela que o resíduo I280 participa de algumas interações hidrofóbicas na borda superior do bolso de ligação ao hormônio mas, principalmente, interage com a face interna (hidrofóbica) da H12, sendo aparentemente importante para manutenção de sua posição (**figura 1.18**).

Ademais, o alinhamento da seqüência de vários receptores nucleares humanos e de outras espécies revela que na posição correspondente ao I280 sempre um aminoácido hidrofóbico está presente, limitando-se a isoleucina, leucina, metionina, valina (**Figura 1.17**). Além disso, a análise da estrutura tridimensional de outros receptores revela que tais aminoácidos hidrofóbicos sempre participam de interações com a face interna da hélice correspondente a H12, o que sugere uma função estrutural e, conseqüentemente, biológica comum para tais resíduos. Assim, estas observações sugerem que a posição 280 não comporta aminoácidos carregados positivamente como R e o K, pois estes não seriam capazes de realizar as interações hidrofóbicas necessárias para posicionamento correto da H12 e montagem da superfície de interação aos coativadores. Essa pode ser a explicação por que os mutantes I280R e I280K não se ligam bem aos coativadores.

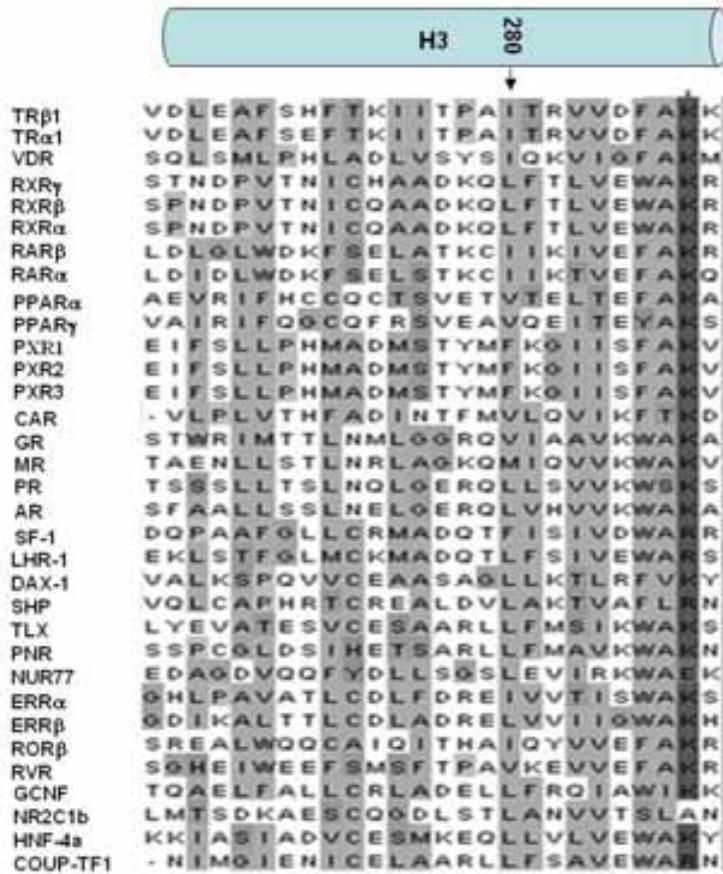


Figura 1.17, alinhamento das seqüências correspondente a H3 do TRβ1 da maioria dos receptores nucleares humanos. Em destaque, a posição correspondente ao resíduo I280 onde a presença de um aminoácido hidrofóbico como I, L, V, M é unânime.

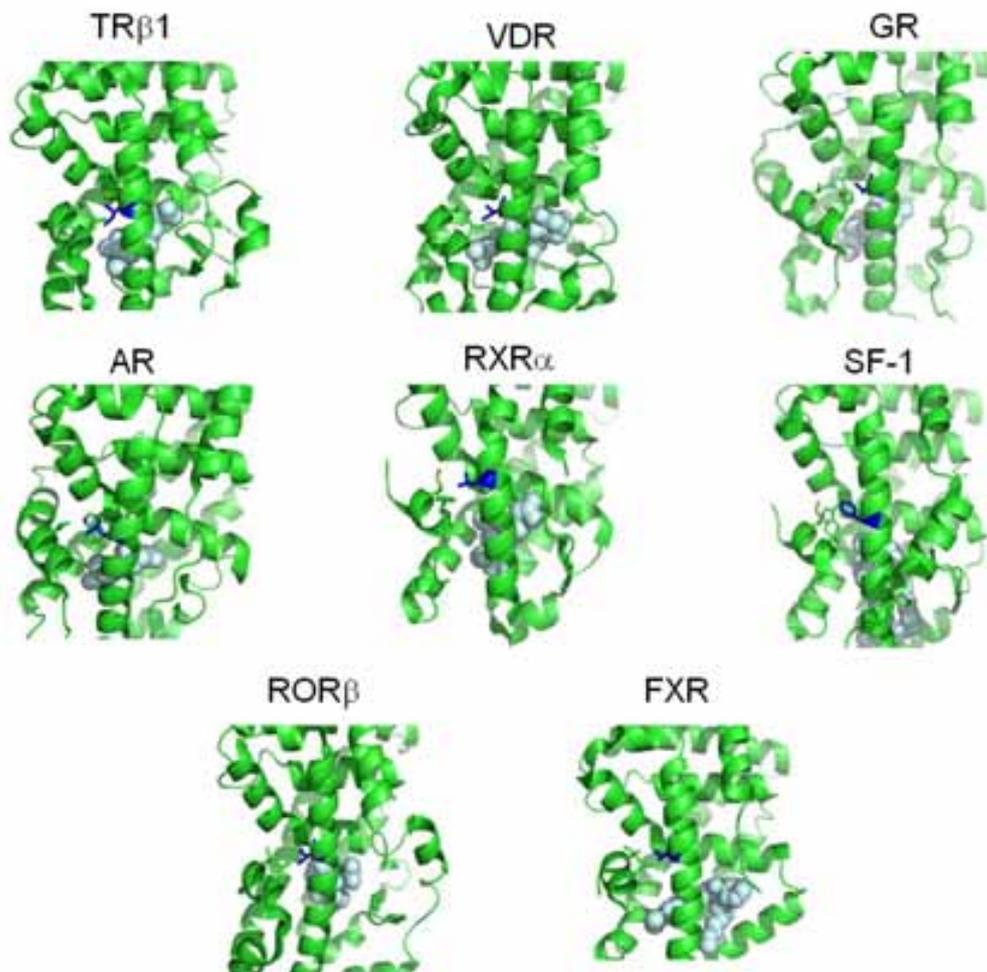


Figura 1.18, Estruturas do LBD de alguns receptores nucleares: TR β 1, receptor da vitamina D (VDR), receptor de glicocorticóide (GR), receptor de androgênio (AR), RXR α , fator esteróide-1 (SF-1), receptor orfão relacionado ao retinóide beta (ROR β), e receptor de farnesóides (FXR). Em destaque (Azul) nos receptores os resíduos correspondentes no I280 no TR β 1 demonstrando que estes aminoácido se interagem com aminoácidos (verde) a face interna (hidrofóbica) da H12. Todas as estruturas foram obtidas na presença do respectivos ligantes (estrutura em branco no centro dos LBDs).

Entretanto, os mutantes I280R e I280K não foram capazes de se ligar ao T3 e assumir uma conformação que protege parte da sua estrutura contra a ação da tripsina como o TR β 1 selvagem e o I280M, indicando uma baixa afinidade pelo

hormônio. O mesmo fato ocorreu para os mutantes controles que não possuem H12 (F451X e I280R/F451X). Assim, para realmente medir a afinidades dos mutantes I280 pelo hormônio foi realizado o ensaio de ligação ao T3 marcado. O K_d observado para o TR β 1 selvagem e para o I280M foi $0,13 \times 10^{-9}M$ e $0,45 \times 10^{-9}M$, respectivamente. Já os mutantes I280R e I280K não apresentaram ligação pelo T3 suficiente para execução do ensaio. Assim, para os 3 mutantes, os resultados do ensaio de ligação e o ensaio de proteção à tripsina são concordantes. O mutante I280M apresentou uma menor afinidade pelo T3 comparado ao TR β 1 selvagem (Banda de proteção presente na concentração de $10^{-6}M$ para I280M *versus* $10^{-7}M$ para TR β 1 selvagem e K_d 3,4 vezes maior para I280M). Já para os mutantes I280K e I280R não houve a presença da banda de proteção em nenhuma das concentrações de T3 testadas e nem foram capazes de se ligar ao T3 no ensaio de ligação. Estes resultados podem explicar os achados anteriores: 1) A menor atividade transcrional do I280M em DR4, F2 e TREpal, pois este mutante tem menor afinidade pelo T3. 2) A ligação hormônio independente ao SMRT de I280R e I280K, pois estes mutantes não se ligam ao T3. 3) A incapacidade de ligação a SRC1 e GRIP1 dos mutantes I280R e I280K, pois estes mutantes não se ligam ao T3. 4) A insuficiência transcrional dos mutantes I280R e I280K, pois estes mutantes não se ligam ao T3 e, conseqüentemente, não se interagem com os coativadores. Estes resultados comprovam que diferentes mutações no resíduo I280 apresentam diferentes conseqüências para as funções do receptor.

Diantes desses dados é interessante questionar a integridade dos mutantes I280R e I280K, ou seja, avaliar se as mutações não alteraram completamente a estrutura terciária do receptor. Pois, estes receptores não se ligam bem aos corepressores, nem aos coativadores e nem mesmo ao T3. Assim, a heterodimerização em solução com o RXR foi testada. Neste ensaio, tanto I280R e I280K quanto I280M, F451X e I280R/F451X se dimerizam com o RXR de forma semelhante ao TR β 1 selvagem demonstrando que as estruturas terciárias estão parcialmente preservadas.

Ademais, alguns questionamentos sobre as alterações conformacionais ocorridas no receptor com a ligação do T3 podem ser levantados a partir deste estudo com mutantes I280. O modelo proposto para a ação do TR sugere que a ligação do T3 promove uma mudança conformacional caracterizada pela movimentação da H12 sobre o corpo do TR (Feng, Ribeiro *et al.*, 1998). Esta movimentação da H12 favorece o deslocamento do correpressor e cria, simultaneamente, uma superfície de ligação do TR com o coativador. O resíduo I280 participa diretamente da interação com os corepressores SMRT e NCoR, pois sua mutação interfere com a ligação do TR β 1 a essas proteínas. Além disso, um resíduo hidrofóbico nesta posição é observado em todos os receptores nucleares e sua função é interagir com a face interna da H12 na presença do ligante. Assim, é razoável afirmar que correpressores e H12 se interagem com o resíduo I280. No caso do TR β 1, correpressores exigem uma isoleucina para uma boa ligação, já a H12 exige um aminoácido hidrofóbico (I ou M). No entanto, quando o I280 é substituído por R ou por K o receptor perde também a capacidade de ligação ao hormônio, e como na presença do ligante o resíduo I280, ou seus correspondentes hidrofóbicos nos outros receptores nucleares, se interagem com resíduos da H12 é razoável questionar se o fechamento do H12 é importante para manter o hormônio dentro do receptor, ou seja, para a afinidade do hormônio pelo receptor. Uma observação favorável a esta hipótese é que o mutante F451X, que tem a H12 deletada, apresenta afinidade baixa pelo hormônio (Marimuthu, Feng *et al.*, 2002). Além disso, uma das poucas estruturas resolvidas do domínio de ligação ao hormônio na ausência de ligante é a do receptor de proliferadores peroxissomais gama (PPAR γ). Ao se comparar as estruturas do PPAR γ na ausência do ligante (apoPPAR) e na presença (holoPPAR) podemos observar que o resíduo correspondente ao I280 (em azul) na forma “apo” está disponível para interações com os correpressores e na forma “holo” se interage com a H12. O que reforça a hipótese de que um resíduo carregado positivamente não seria aceito nesta posição, o que prejudicaria, inclusive, a ligação ao hormônio (**Figura 1.19**).

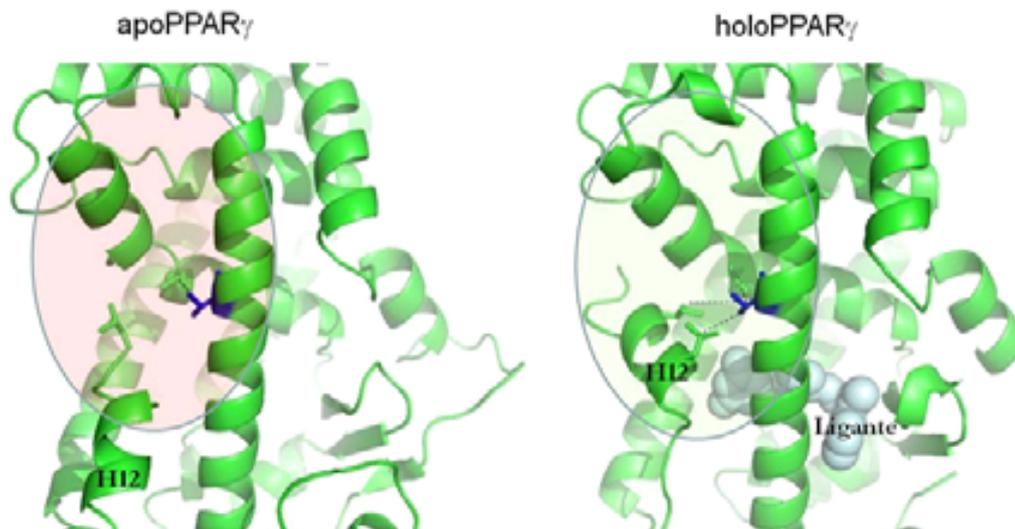


Figura 1.19, estrutura do receptor PPAR γ na ausência (apoPPAR γ) e na presença (holoPPAR γ) do ligante destacando o resíduo (valina) correspondente ao I280 neste receptor em azul e sua participação na superfície de interação aos corepressores (círculo vermelho) e com os coativadores (círculo verde). A hipótese mais provável para as diferenças observadas entre os mutantes I280M e I280K/I280R com é que a carga positiva não faz interações com os aminoácidos hidrofóbicos da parte interna da H12 e, conseqüentemente, impedindo seu posicionamento correto para montagem da superfície de interação com os coativadores.

Na repressão transcricional mediada pelo T3 observa-se que na ausência do ligante o receptor ativa a transcrição do gene alvo e na presença reprime. E para investigar a importância da interação com corepressores e coativadores neste tipo de regulação realizamos ensaios de gene repórter utilizando o TR β 1 selvagem e os mutantes I280R, I280M, I280K, F451X e I280R/F451X. Assim, foi possível avaliar a capacidade destes receptores modular a transcrição das construções repórteres Δ collT3-LUC (promotor onde o TR atua via AP-1 e não existe ligação direta ao DNA), -547+84TRH-LUC ou -157+17SOD-LUC (promotores onde o TR se liga diretamente ao DNA) (Santos, 2006) em células U937. De fato nestes ensaio foi avaliada a importância da superfície de interação com os corepressores e a montagem da superfície de interação com os coativadores. Uma vez que não foram estudadas quais proteínas se interagem com o receptor nestes promotores. Classicamente, TR β 1 se interage com

corepressores na ausência e coativadores na presença de T3, e estes ativam e reprimem a transcrição, respectivamente. No entanto, alguns estudos sugerem que nos genes regulados negativamente, o correpressor funciona como um ativador da transcrição (T3 independente) e o coativador funcionaria como um repressor (T3 dependente) (Lazar, 2003). O mecanismo molecular envolvido nesse fenômeno não está bem definido. Algumas evidências apontam que na ausência de T3, o TR sequestra os correpressores em solução, impedindo que esse iniba a maquinaria de transcrição. Assim, com a chegada do T3, os correpressores deixariam de se ligar ao TR que passaria a recrutar os coativadores não os deixando estimular a transcrição do gene (Lazar, 2003). Outra possibilidade é que diferentes proteínas correpressoras estão envolvidas na repressão mediada pelo T3. Por exemplo, RIP140 (receptor-interacting protein) é um fator que inibe a transcrição ao se ligar ao TR na presença de T3 (Treuter, Albrektsen *et al.*, 1998). Inversamente, alguns coativadores se ligam ao TR na ausência de ligante como um coativador codificado por adenovirus (human adenovirus type 5 early region 1A) e uma variante truncada do N-CoR (N-CoRI) descrita recentemente (Meng, Webb *et al.*, 2005).

Nos nossos ensaios, observamos que o TR β 1 selvagem ativou a transcrição na ausência e reprimiu na presença de T3 os promotores da colagenase-1 e SOD-1. No promotor do TRH foi observado apenas a repressão na presença do ligante. Isto pode ser explicado pelo fato do ensaio ter sido realizado em células U937 que normalmente não expressa o TRH e algum fator de transcrição importante para a ativação hormônio independente do TR β 1 neste promotor pode não estar presente nesta célula. Em relação a atuação dos mutantes observa-se que existe padrões e particularidades para cada promotor. Com relação aos padrões, primeiramente, o mutante F451X, que possui alta afinidade pelos correpressores e não se desliga deles na presença de T3, ativou os três promotores de forma mais eficiente que o TR β 1 selvagem. E, além disso, este mutante não foi capaz de reprimir a transcrição na presença de T3 em nenhum dos promotores testados (**Figura 1.13, 1.14, 1.15**). Estas observações confirmam que a superfície de interação com os correpressores é importante para

a ativação dos promotores regulados negativamente e a incapacidade de montar a superfície de interação com os coativadores abole a repressão transcricional mediada pelo hormônio. Inversamente, observou-se que o mutante I280M, que se interage mal ao correpressores e não tem a ligação aos coativadores afetada, foi o mutante que melhor reprimiu a transcrição com a adição de T3. Este resultado confirma que a montagem da superfície de interação com os coativadores é importante para repressão transcricional nesses promotores. Juntas estas observações reproduzem estudos anteriores onde achados semelhantes são descritos (Ortiga-Carvalho, Shibusawa *et al.*, 2005).

Com relação as particularidades, sob a colagenase-1, os mutantes I280K, I280M e I280R/F451X não foram capazes de ativar a transcrição o que reflete a incapacidade de se interagir com correpressores. Já o I280R ativou a transcrição de forma semelhante ao TR β 1 selvagem. Dos mutantes I280 o I280R é o que melhor se interage com o correpressor SMRT, o que talvez possa ser o suficiente para sua atuação sobre este promotor. Já no promotor do TRH apenas o F451X conseguiu ativar bem a transcrição os demais mutantes foram transcricionalmente inativos apresentado valores de % de ativação semelhante ao controle (vetor vazio-pCMX), fato discutido anteriormente. No promotor da SOD-1 todos os mutantes testados, tanto nos trabalhos anteriores quanto neste, foram capazes de ativar a transcrição hormônio independente. O fato de alguns mutantes, mesmo sem interagir bem com correpressores e coativadores, serem transcricionalmente ativos sugere que a ativação seja parcialmente independente destas superfícies, possivelmente porque outras proteínas reguladoras poderiam estar envolvidas.

Assim, concluímos que a repressão transcricional mediada pelo T3 é complexa e pode variar de promotor para promotor. Entretanto, de forma geral nossos resultados sugerem que a superfície de interação com os correpressores é importante para a ativação transcricional e a superfície de interação com os coativadores é importante para a repressão.

1.6 - CONCLUSÕES

1. No TR β 1, o aminoácido I280 é importante tanto para a ligação ao correpressor SMRT quanto para ligação aos coativadores SRC-1 e GRIP-1, mesmo não fazendo parte da superfície de ligação aos coativadores.
2. No TR β 1, o aminoácido I280 se interage diretamente com o correpressor SMRT.
3. T3 promove a movimentação da hélice 12 sobre o TR β 1 e mutações que modificam esta movimentação impedem a ligação do hormônio, a formação da superfície de ligação ao coativador e, conseqüentemente, o acoplamento dos coativadores ao TR β 1.
4. Nos gene regulados negativamente pelo T3 a superfície de interação com aos correpressores do TR β 1 é importante para ativação da transcrição e a de interação com os coativadores é importante para a repressão, independentemente, se existe ligação direta do TR ao DNA ou não.

REFERÊNCIAS

- Angel, P. e M. Karin. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. Biochim Biophys Acta, v.1072, n.2-3, Dec 10, p.129-57. 1991.
- Balkan, W., M. A. Taviani, *et al.* Expression of rat thyrotropin-releasing hormone (TRH) gene in TRH-producing tissues of transgenic mice requires sequences located in exon 1. Endocrinology, v.139, n.1, Jan, p.252-9. 1998.
- Barra, G. B., L. F. Velasco, *et al.* Molecular mechanism of thyroid hormone action]. Arq Bras Endocrinol Metabol, v.48, n.1, Feb, p.25-39. 2004.
- Becker, N., I. Seugnet, *et al.* Nuclear corepressor and silencing mediator of retinoic and thyroid hormone receptors corepressor expression is incompatible with T(3)-dependent TRH regulation. Endocrinology, v.142, n.12, Dec, p.5321-31. 2001.
- Berghagen, H., E. Ragnhildstveit, *et al.* Corepressor SMRT functions as a coactivator for thyroid hormone receptor T3Ralpha from a negative hormone response element. J Biol Chem, v.277, n.51, Dec 20, p.49517-22. 2002.
- Bhat, M. K., C. Parkison, *et al.* Conformational changes of human beta 1 thyroid hormone receptor induced by binding of 3,3',5-triiodo-L-thyronine. Biochem Biophys Res Commun, v.195, n.1, Aug 31, p.385-92. 1993.
- Bohmann, D., T. J. Bos, *et al.* Human proto-oncogene c-jun encodes a DNA binding protein with structural and functional properties of transcription factor AP-1. Science, v.238, n.4832, Dec 4, p.1386-92. 1987.
- Bourguet, W., M. Ruff, *et al.* Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR-alpha. Nature, v.375, n.6530, Jun 1, p.377-382. 1995.
- Caelles, C., J. M. Gonzalez-Sancho, *et al.* Nuclear hormone receptor antagonism with AP-1 by inhibition of the JNK pathway. Genes Dev, v.11, n.24, Dec 15, p.3351-64. 1997.
- Castillo, A. I., R. Sanchez-Martinez, *et al.* A permissive retinoid X receptor/thyroid hormone receptor heterodimer allows stimulation of prolactin gene transcription by thyroid hormone and 9-cis-retinoic acid. Mol Cell Biol, v.24, n.2, Jan, p.502-13. 2004.

Cheung, E., M. L. Acevedo, *et al.* Altered pharmacology and distinct coactivator usage for estrogen receptor-dependent transcription through activating protein-1. Proc Natl Acad Sci U S A, v.102, n.3, Jan 18, p.559-64. 2005.

Chiellini, G., J. W. Apriletti, *et al.* A High Affinity Subtype-Selective Agonist Ligand for the Thyroid Hormone Receptor. Chemistry and Biology, v.5, n.6, p.299-306. 1998.

Desvergne, B. How do thyroid hormone receptors bind to structurally diverse response elements? Mol Cell Endocrinol, v.100, n.1-2, Apr, p.125-31. 1994.

Doyle, G. A., R. A. Pierce, *et al.* Transcriptional induction of collagenase-1 in differentiated monocyte-like (U937) cells is regulated by AP-1 and an upstream C/EBP-beta site. J Biol Chem, v.272, n.18, May 2, p.11840-9. 1997.

Eckey, M., U. Moehren, *et al.* Gene silencing by the thyroid hormone receptor. Mol Cell Endocrinol, v.213, n.1, Dec 31, p.13-22. 2003.

Feng, W., R. C. J. Ribeiro, *et al.* Hormone-Dependent Coactivator Binding to a Hydrophobic Cleft on Nuclear Receptors. Science, v.280, n.5370, p.1747-1749. 1998.

Feng, X., Y. Jiang, *et al.* Thyroid hormone regulation of hepatic genes in vivo detected by complementary DNA microarray. Mol Endocrinol, v.14, n.7, Jul, p.947-55. 2000.

Flamant, F., K. Gauthier, *et al.* Thyroid hormones signaling is getting more complex: STORMs are coming. Mol Endocrinol, v.21, n.2, Feb, p.321-33. 2007.

Guissouma, H., S. M. Dupre, *et al.* Feedback on hypothalamic TRH transcription is dependent on thyroid hormone receptor N terminus. Mol Endocrinol, v.16, n.7, Jul, p.1652-66. 2002.

Guissouma, H., M. T. Ghorbel, *et al.* Physiological regulation of hypothalamic TRH transcription in vivo is T3 receptor isoform specific. Faseb J, v.12, n.15, Dec, p.1755-64. 1998.

Gutman, A. e B. Wasylyk. The collagenase gene promoter contains a TPA and oncogene-responsive unit encompassing the PEA3 and AP-1 binding sites. Embo J, v.9, n.7, Jul, p.2241-6. 1990.

Guyton, A. C. e J. E. Hall. Textbook of medical physiology. Philadelphia: Elsevier Saunders. 2006. xxxv, 1116 p. p.

Hennemann, G., R. Docter, *et al.* Plasma membrane transport of thyroid hormones and its role in thyroid hormone metabolism and bioavailability. Endocr Rev, v.22, n.4, Aug, p.451-76. 2001.

Herschman, H. R. Primary response genes induced by growth factors and tumor promoters. Annu Rev Biochem, v.60, p.281-319. 1991.

Hollenberg, A. N., T. Monden, *et al.* The human thyrotropin-releasing hormone gene is regulated by thyroid hormone through two distinct classes of negative thyroid hormone response elements. Mol Endocrinol, v.9, n.5, May, p.540-50. 1995.

Jho, S. H., N. Radoja, *et al.* Negative response elements in keratin genes mediate transcriptional repression and the cross-talk among nuclear receptors. J Biol Chem, v.276, n.49, Dec 7, p.45914-20. 2001.

Jho, S. H., C. Vouthounis, *et al.* The book of opposites: the role of the nuclear receptor co-regulators in the suppression of epidermal genes by retinoic acid and thyroid hormone receptors. J Invest Dermatol, v.124, n.5, May, p.1034-43. 2005.

Jonat, C., H. J. Rahmsdorf, *et al.* Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. Cell, v.62, n.6, Sep 21, p.1189-204. 1990.

Kamei, Y., L. Xu, *et al.* A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. Cell, v.85, n.3, May 3, p.403-14. 1996.

Kushner, P. J., D. A. Agard, *et al.* Estrogen receptor pathways to AP-1. J Steroid Biochem Mol Biol, v.74, n.5, Nov 30, p.311-7. 2000.

Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, v.227, n.259, p.680-5. 1970.

Laflamme, L., G. Hamann, *et al.* RXR acts as a coregulator in the regulation of genes of the hypothalamo-pituitary axis by thyroid hormone receptors. J Mol Endocrinol, v.29, n.1, Aug, p.61-72. 2002.

Langlois, M. F., K. Zanger, *et al.* A unique role of the beta-2 thyroid hormone receptor isoform in negative regulation by thyroid hormone. Mapping of a novel amino-terminal domain important for ligand-independent activation. J Biol Chem, v.272, n.40, Oct 3, p.24927-33. 1997.

Lazar, M. A. Thyroid hormone action: a binding contract. J Clin Invest, v.112, n.4, Aug, p.497-9. 2003.

- Lee, W., P. Mitchell, *et al.* Purified transcription factor AP-1 interacts with TPA-inducible enhancer elements. Cell, v.49, n.6, Jun 19, p.741-52. 1987.
- Li, D., T. Li, *et al.* Functional evidence for retinoid X receptor (RXR) as a nonsilent partner in the thyroid hormone receptor/RXR heterodimer. Mol Cell Biol, v.22, n.16, Aug, p.5782-92. 2002.
- Li, D., T. Yamada, *et al.* Novel roles of retinoid X receptor (RXR) and RXR ligand in dynamically modulating the activity of the thyroid hormone receptor/RXR heterodimer. J Biol Chem, v.279, n.9, Feb 27, p.7427-37. 2004.
- Lin, H. M., L. Zhao, *et al.* Cyclin D1 Is a Ligand-independent Co-repressor for Thyroid Hormone Receptors. J Biol Chem, v.277, n.32, Aug 9, p.28733-41. 2002.
- Liu, Y., S. Ando, *et al.* p62, A TFIIH subunit, directly interacts with thyroid hormone receptor and enhances T3-mediated transcription. Mol Endocrinol, v.19, n.4, Apr, p.879-84. 2005.
- Lopez, G., F. Schaufele, *et al.* Positive and negative modulation of Jun action by thyroid hormone receptor at a unique AP1 site. Mol Cell Biol, v.13, n.5, May, p.3042-9. 1993.
- M.J. Betts, R. B. R. Amino acid properties and consequences of substitutions. In: I. C. G. M.R. Barnes (Ed.). Bioinformatics for Geneticists. Wiley, 2003. Amino acid properties and consequences of substitutions.
- Marimuthu, A., W. Feng, *et al.* TR surfaces and conformations required to bind nuclear receptor corepressor. Mol Endocrinol, v.16, n.2, p.271-86. 2002.
- Meng, X., P. Webb, *et al.* E1A and a nuclear receptor corepressor splice variant (N-CoRI) are thyroid hormone receptor coactivators that bind in the corepressor mode. Proc Natl Acad Sci U S A, v.102, n.18, May 3, p.6267-72. 2005.
- Nicholson, R. C., S. Mader, *et al.* Negative regulation of the rat stromelysin gene promoter by retinoic acid is mediated by an AP1 binding site. Embo J, v.9, n.13, Dec, p.4443-54. 1990.
- Norman, A. W. e G. Litwack. Hormones. San Diego: Academic Press. 1997
- Nygaard, M., G. M. Wahlstrom, *et al.* Hormone-dependent repression of the E2F-1 gene by thyroid hormone receptors. Mol Endocrinol, v.17, n.1, Jan, p.79-92. 2003.

O'shea, P. J., J. H. Bassett, *et al.* Characterization of skeletal phenotypes of TRalpha1 and TRbeta mutant mice: implications for tissue thyroid status and T3 target gene expression. Nucl Recept Signal, v.4, p.e011. 2006.

Ortiga-Carvalho, T. M., N. Shibusawa, *et al.* Negative regulation by thyroid hormone receptor requires an intact coactivator-binding surface. J Clin Invest, v.115, n.9, Sep, p.2517-23. 2005.

Perez, P., T. Palomino, *et al.* Determination of the promoter elements that mediate repression of c-fos gene transcription by thyroid hormone and retinoic acid receptors. Biochem Biophys Res Commun, v.205, n.1, Nov 30, p.135-40. 1994.

Pissios, P., I. Tzamelis, *et al.* Dynamic stabilization of nuclear receptor ligand binding domains by hormone or corepressor binding. Mol Cell, v.6, n.2, p.245-53. 2000.

Ribeiro, R. C., J. W. Apriletti, *et al.* X-ray crystallographic and functional studies of thyroid hormone receptor. J Steroid Biochem Mol Biol, v.65, n.1-6, p.133-41. 1998.

Ribeiro, R. C. J., J. W. Apriletti, *et al.* Mechanisms of Thyroid Hormone Action: Insights from X-ray Crystallographic and Functional Studies. Recent Prog Horm Res, v.53, p.351-394. 1998.

_____. The molecular biology of thyroid hormone action. Ann. N. Y. Acad. Sci., v.758, p.366-389. 1995.

Ribeiro, R. C. J., W. Feng, *et al.* Definition of the surface in the Thyroid Hormone Receptor ligand binding domain for association as homodimers and heterodimers with retinoid X receptor. JBC, v.276, n.Issue of May 4, p.14987-14995. 2001.

Santos, G. M., V. Afonso, *et al.* Negative regulation of superoxide dismutase-1 promoter by thyroid hormone. Mol Pharmacol, v.70, n.3, Sep, p.793-800. 2006.

Satoh, T., T. Monden, *et al.* DNA binding and interaction with the nuclear receptor corepressor of thyroid hormone receptor are required for ligand-independent stimulation of the mouse preprothyrotropin-releasing hormone gene. Mol Cell Endocrinol, v.154, n.1-2, Aug 20, p.137-49. 1999.

Satoh, T., M. Yamada, *et al.* Negative regulation of the gene for the preprothyrotropin-releasing hormone from the mouse by thyroid hormone requires additional factors in conjunction with thyroid hormone receptors. J Biol Chem, v.271, n.44, Nov 1, p.27919-26. 1996.

Shibusawa, N., K. Hashimoto, *et al.* Thyroid hormone action in the absence of thyroid hormone receptor DNA-binding in vivo. J Clin Invest, v.112, n.4, Aug, p.588-97. 2003.

Shibusawa, N., A. N. Hollenberg, *et al.* Thyroid hormone receptor DNA binding is required for both positive and negative gene regulation. J Biol Chem, v.278, n.2, Jan 10, p.732-8. 2003.

Tagami, T., Y. Park, *et al.* Mechanisms that mediate negative regulation of the thyroid-stimulating hormone alpha gene by the thyroid hormone receptor. J Biol Chem, v.274, n.32, Aug 6, p.22345-53. 1999.

Takeda, T., T. Nagasawa, *et al.* The function of retinoid X receptors on negative thyroid hormone response elements. Mol Cell Endocrinol, v.128, n.1-2, Apr 4, p.85-96. 1997.

Treuter, E., T. Albrechtsen, *et al.* A regulatory role for RIP140 in nuclear receptor activation. Mol Endocrinol, v.12, n.6, Jun, p.864-81. 1998.

Umesono, K., K. K. Murakami, *et al.* Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D3 receptors. Cell, v.65, p.1255-1266. 1991.

Wagner, R. L., J. W. Apriletti, *et al.* A structural role for hormone in the thyroid hormone receptor. Nature, v.378, n.6558, p.690-697. 1995.

Warnmark, A., E. Treuter, *et al.* Activation functions 1 and 2 of nuclear receptors: molecular strategies for transcriptional activation. Mol Endocrinol, v.17, n.10, Oct, p.1901-9. 2003.

Webb, P., P. Nguyen, *et al.* Differential SERM effects on corepressor binding dictate ERalpha activity in vivo. J Biol Chem, v.278, n.9, Feb 28, p.6912-20. 2003.

Williams, G. R. Cloning and characterization of two novel thyroid hormone receptor beta isoforms. Mol Cell Biol, v.20, n.22, Nov, p.8329-42. 2000.

Wu, Y., P. Delerive, *et al.* Requirement of helix 1 and the AF-2 domain of the thyroid hormone receptor for coactivation by PGC-1. J Biol Chem, v.277, n.11, Mar 15, p.8898-905. 2002.

Wu, Y., B. Xu, *et al.* Thyroid hormone response element sequence and the recruitment of retinoid X receptors for thyroid hormone responsiveness. J Biol Chem, v.276, n.6, p.3929-36. 2001.

Wurtz, J. M., W. Bourguet, *et al.* A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors. Nature Struct Biol, v.3, n.1, p.87-94. 1996.

Xu, B. e R. J. Koenig. An RNA-binding domain in the thyroid hormone receptor enhances transcriptional activation. J Biol Chem, v.279, n.32, Aug 6, p.33051-6. 2004.

Yang-Yen, H. F., J. C. Chambard, *et al.* Transcriptional interference between c-Jun and the glucocorticoid receptor: mutual inhibition of DNA binding due to direct protein-protein interaction. Cell, v.62, n.6, Sep 21, p.1205-15. 1990.

Yang, M. L., T. S. Huang, *et al.* Inhibition of endogenous thyroid hormone receptor-beta and peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activities by humic acid in a human-derived liver cell line. Thyroid, v.12, n.5, May, p.361-71. 2002.

Yen, P. M. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. Physiol Rev, v.81, n.3, p.1097-142. 2001.

Yen, P. M., X. Feng, *et al.* Effects of ligand and thyroid hormone receptor isoforms on hepatic gene expression profiles of thyroid hormone receptor knockout mice. EMBO Rep, v.4, n.6, Jun, p.581-7. 2003.

Estudo 2

Nova mutação no sítio de “splicing” do gene do hormônio luteinizante.

RESUMO

Dois pacientes do sexo masculino e posteriormente sua irmã, que receberam o diagnóstico de hipogonadismo hipogonadotrófico devido à deficiência isolada do hormônio luteinizante (LH), foram apresentados ao laboratório de Farmacologia Molecular da Universidade de Brasília para avaliação do mecanismo genético e molecular envolvido nesse processo.

O LH pertence à família dos hormônios glicoprotéicos. Esses hormônios são heterodímeros constituídos de uma subunidade alfa, que é comum a todos os membros da família, e de uma subunidade beta, que lhes confere especificidade. As duas subunidades são associadas por meio de ligações não-convалentes e a dimerização entre elas é essencial para a perfeita ligação com o receptor e a expressão completa da sua atividade biológica. O gene que codifica a subunidade beta (LHB) é composto de três exons e dois introns sendo que os aminoácidos que compõem a proteína madura são codificados pelos exons 2 e 3.

Assim, como eram grandes as suspeitas de se tratar de uma mutação no gene LHB iniciou-se sua análise nos pacientes. O seqüenciamento deste gene nos três pacientes com deficiência seletiva de LH revelou a presença da substituição de uma guanina (G) por uma citosina (C), em homozigose, na posição +1 do íntron 2. O rastreamento desta mutação, chamada de IVS2+1G>C, nos familiares dos pacientes por PCR-RFLP com a enzima *NcoI* resultou na identificação de seis heterozigotos de um total de 13 indivíduos estudados: os pais (que eram primos de segundo grau), duas irmãs, um irmão e um sobrinho, todos assintomáticos. Como controle, 100 indivíduos normais foram avaliados pelo mesmo método e nenhum apresentou a mutação. Considerando que esta mutação poderia estar modificando o splicing do gene do LH, nós resolvemos investigar o processamento do RNA mensageiro (mRNA) do gene LHB. Para isso, utilizando a técnica de RT-PCR, analisamos a expressão do mRNA do LHB em leucócitos que, além da hipófise, também expressam LHB. Na análise do mRNA observamos sistematicamente um produto de RT-PCR maior nos indivíduos homozigotos para a mutação. Verificamos por seqüenciamento que a diferença devia-se à presença de todos os 236 nucleotídeos do íntron 2, sugerindo comprometimento do processamento pós-transcricional resultante da presença da mutação IVS2+1G>C. Na análise da seqüência de aminoácidos da suposta proteína aberrante codificada por este mRNA alterado, em comparação com a selvagem, observamos que a inclusão dos nucleotídeos do íntron 2 resultaria na mudança do quadro de leitura do éxon 3, além da inserção de 79 aminoácidos codificados pelo íntron 2. Essas observações indicam que na proteína aberrante estariam ausentes regiões importantes para sua dimerização correta com a subunidade alfa e poderia assim não ser secretada, dando origem então à condição patológica de deficiência seletiva de LH nos pacientes.

Abstract

Two male patients and her sister, who received the diagnosis of hypogonadotropic hypogonadism due to the isolated deficiency of luteinizing hormone (LH) were submitted to the laboratory of Molecular Pharmacology at the University of Brasilia to evaluate the genetic and molecular mechanisms involved in this process.

The LH belongs to the family of glycoprotein hormones. These hormones are heterodimers formed an alpha subunit, which is common to all members of the family, and a beta subunit, which gives them specificity. The dimerization between the two subunits is essential for the perfect interaction with the receptor and complete expression of their biological activity. The gene encoding the beta subunit (LHB) is composed of three exons and two introns, the amino acids compose the mature protein are encoded by exons 2 and 3.

We started up LHB gene analysis of these patients. The sequencing of the LHB gene in the three patients with revealed the homozygous substitution of a guanine (G) by a cytosine (C) in the position +1 of intron 2. The tracking of this mutation, called IVS2 +1 G> C, in the patients relatives by PCR-RFLP with the enzyme NcoI resulted in the identification of six heterozygous for a total of 13 studied subjects: parents (who were cousins of second degree), two sisters, a brother and a nephew, all asymptomatic. As a control, 100 normal subjects were evaluated by the same method and none showed the mutation. Whereas this mutation could modify the gene splicing of the LH, we resolve to investigate the processing of messenger RNA (mRNA) of the gene LHB. Therefore, using the technique of RT-PCR, we analyzed the expression of the mRNA of LHB in leukocytes that, in addition to the pituitary, also express LHB. In the analysis of mRNA we systematically observed a RT-PCR product higher in subjects homozygous for the mutation. We note by sequencing that the difference was due to the presence of all 236 nucleotides of intron 2, suggesting impairment of post-transcriptional mRNA processing resulting from the presence of the mutation IVS2 +1 G>C. Analysing the amino acids sequence of the supposed aberrant protein encoded by the mRNA we found that the inclusion of the nucleotides intron 2 result in the change of the open reading frame from the exon 3, besides the insertion of 79 amino acids coded by intron 2. These observations indicate that important regions for correctly dimerization with the alpha subunit were absent in the aberrant protein and thus could not be secreted, leading to the pathological condition of the patients.

2.1 INTRODUÇÃO

2.1.1 - *Motivação para o estudo*

Em janeiro de 2006, a endocrinologista Dra. Adriana Lofrano-Porto do Hospital Universitário da Universidade de Brasília apresentou ao Laboratório de Farmacologia Molecular da Faculdade de Ciências da Saúde dois irmãos com quadro clínico de hipogonadismo hipogonadotrófico (HH) devido à deficiência isolada do hormônio luteinizante (LH). O caso-índice foi um paciente de 38 anos, do sexo masculino, média 181 cm de altura, com envergadura de 193 cm e pesava 87 Kg. Apresentava hábito eunucóide, voz juvenil, ginecomastia bilateral, ausência de pelos faciais, raros pelos axilares e desenvolvimento incompleto dos pelos pubianos. O exame genital revelou micropênis (4,5 cm; normal: $13,3 \pm 3.8$), testículos tópicos com volume reduzido (6 cm^3 ; normal adulto: 15 a 25 cm^3). Os exames hormonais constataram: concentração sérica de LH indetectável, FSH elevado, testosterona baixa, estradiol baixo, subunidade alfa elevada. A ausência de LH imunologicamente detectável foi confirmada em repetidas amostras, segundo dois imunoenaios diferentes. O espermograma revelou azoospermia e o cariótipo foi 46XY. A ressonância magnética nuclear da hipófise e região supra-selar não mostrou alterações. O irmão, um homem de 30 anos, vinha sendo tratado com injeções intramusculares de testosterona desde os 25 anos de idade devido à ausência de desenvolvimento puberal. Relatava o desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários, crescimento do pênis e aumento do volume testicular após o início do tratamento com testosterona. Assim, apresentava desenvolvimento puberal completo, ausência de ginecomastia, pênis de 9 cm e testículos de 10 cm^3 , peso 72 Kg, altura 178 cm. O espermograma mostrava azoospermia e a ressonância magnética da hipófise era normal. O exame histopatológico do testículo revelou espessamento fibroso intersticial, hipoplasia de túbulos seminíferos, com espermatogênese bastante reduzida e restrita ao estágio de espermátides. Observou-se ainda a predominância de células de Sertoli e não foram visualizadas células de Leydig. Diante do diagnóstico de HH e

da ausência isolada de LH imunologicamente detectável na circulação resolvemos investigar se se tratava de uma mutação no gene da subunidade beta do LH (LHB) nestes pacientes.

Anormalidades no desenvolvimento do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal podem resultar em prejuízo da função gonadal e, conseqüente, hipogonadismo caracterizado por diminuição da produção de hormônios sexuais, ausência de desenvolvimento puberal e infertilidade. O hipogonadismo é dito hipogonadotrófico quando há secreção deficiente das gonadotrofinas hipofisárias (FSH e/ou LH) e é decorrente de alterações no hipotálamo e/ou na hipófise (Melmed, 2003).

Nos últimos anos, vários defeitos genéticos que resultam em HH vêm sendo identificados. Mutações em genes expressos no hipotálamo, na hipófise ou envolvidos no seu desenvolvimento vêm sendo detectadas em humanos e caracterizadas em modelos animais. Tais mutações, devido ao seu papel crítico no comprometimento da função reprodutiva e fertilidade, são compreensivelmente bastante raras. No entanto, o estudo dos fenótipos resultantes dessas mutações em humanos e em animais geneticamente modificados tem se mostrado uma ferramenta valiosa para o esclarecimento de vários aspectos ainda pouco compreendidos da função gonadal e do controle hormonal da reprodução (Themmen e Huhtaniemi, 2000; Themmen, 2005).

Dessa forma, motivados pela oportunidade de estudar em seres humanos, os aspectos clínicos, hormonais e genéticos da deficiência isolada de LH, procedeu-se a caracterização molecular dos pacientes com deficiência seletiva de LH e seus familiares. Nossa investigação resultou na observação e caracterização de uma nova mutação no gene da subunidade beta do LH (LHB) nessa família e mais ainda, possibilitou a identificação de uma irmã afetada, caracterizada como o primeiro caso descrito na literatura mundial de hipogonadismo hipogonadotrófico por deficiência de LH em uma mulher. Clinicamente esta paciente apresentava amenorréia secundária e infertilidade. Relatava desenvolvimento puberal normal, menarca aos 13 anos seguida de oligomenorréia, e posterior amenorréia nos últimos dois anos. Sua altura era 166 cm, e o peso 56 Kg. Apresentava desenvolvimento completo de caracteres sexuais secundários. Os exames

hormonais iniciais também foram compatíveis com deficiência seletiva de LH. Resumidamente, observou-se concentração de LH indetectável, FSH normal, estradiol e progesterona baixos, porém dentro do intervalo de normalidade para mulheres na fase folicular do ciclo menstrual. A concentração da subunidade alfa livre estavam elevadas. Outros exames realizados nessa paciente incluíram uma densitometria óssea de coluna lombar e fêmur proximal, uma ressonância magnética nuclear de sela túrcica e região supra-selar, todos normais. Ultrasonografia pélvica revelou útero normal (volume, 50 cm³; Normal de 30 a 90 cm³), com endométrio atrófico (3 mm de espessura). Os ovários eram de tamanho normal (ovário direito, 10 cm³; ovário esquerdo, 7 cm³) e continham múltiplos folículos antrais (até 13 mm em diâmetro) não restritos a periferia. Ultrasonografias seriadas da pelvis ao longo de duas semanas não apresentou mudanças na espessura do endométrio ou na aparência do ovário demonstrando a ausência de ciclos hormonais.

As conclusões deste raro experimento da natureza suportam a visão de que o LH é essencial para a maturação das células de Leydig e esteroidogênese nos homens e seu principal papel na mulher é induzir a ovulação. Os dados deste estudo clínico-molecular resultaram em um artigo recentemente publicado no "The New England Journal of Medicine" (volume 357:897-904 No. 9 em 30 de agosto de 2007) e que está apresentado no **anexo II**, onde se encontram também os detalhes clínicos do estudo. Apenas investigação molecular do estudo será abordada em detalhes a seguir. É importante ressaltar que esses dados também foram utilizados na defesa de tese da Dra Adriana Lofrano-Porto, entretanto com ênfase aos aspectos clínicos do trabalho.

2.1.2 - O Hormônio Luteinizante

O LH pertence a família dos hormônios glicoprotéico da qual também fazem parte o TSH (hormônio tireoestimulante), o FSH (hormônio foliculoestimulante) e o hCG (gonadotrofina coriônica humana). Esses hormônios são heterodímeros constituídos de duas subunidades: a subunidade alfa, que é comum a todos os

membros da família, e a subunidade beta, que lhes confere especificidade. As duas subunidades são associadas por meio de ligações não-convалentes. A dimerização das duas cadeias intactas é essencial para a perfeita ligação com o respectivo receptor e a expressão completa da atividade biológica dos hormônios glicoprotéicos. As estruturas tridimensionais descritas até o momento foram: a do hCG e do FSH. A análise destas estruturas revelou uma grande semelhança entre as duas proteínas (Lapthorn, Harris *et al.*, 1994; Ulloa-Aguirre e Timossi, 1998; Themmen e Huhtaniemi, 2000).

A subunidade alfa é uma proteína constituída por 92 aminoácidos, idêntica para todos os hormônios glicoprotéicos. As subunidades beta de cada hormônio têm uma seqüência própria de aminoácidos, que confere especificidade ao heterodímero, porém também apresentam grande homologia (32% entre LH e TSH, e 83% entre LH e hCG). As subunidades betas do FSH, LH e CG humanos contêm 117, 121 e 145 aminoácidos, respectivamente (Themmen, 2005).

As subunidades betas são ricas em cisteínas (12 pares) e formam seis pontes dissulfeto entre esses resíduos, dentro de cada subunidade (intra-cadeia), que conferem a estabilização da proteínas. Contém ainda moléculas de carboidrato, uma (no LH) ou duas (no hCG e FSH) cadeias de oligossacarídeos ligadas a resíduos de asparagina (*Asp-linked* ou *N-linked*), que têm papel importante para a ação biológica e metabolismo desses hormônios. O conteúdo de carboidratos das moléculas de gonadotrofinas influencia suas taxas de secreção e meia-vida no soro. Quanto maior esse conteúdo, menor a taxa de metabolização e mais longa a meia-vida. Assim, o maior conteúdo de ácido siálico do FSH em relação ao LH determina sua eliminação mais lenta da circulação. O LH tem depuramento mais rápido e a meia-vida mais curta (20 minutos), enquanto o hCG tem a meia-vida mais longa (24 horas) (Bulun, 2003).

Outra característica importante das subunidades dos hormônios glicoprotéicos, que também resulta da presença das várias pontes dissulfeto entre os resíduos de cisteína, é a formação do nó de cisteínas (*cysteine knot*). Essa estrutura é composta por duas pontes dissulfeto que formam uma espécie de anel, por onde uma terceira ponte passa, assim formando o “nó”. Além disso, essas

proteínas possuem formato alongado, com duas alças (loop) beta em forma de “grampo de cabelo” de um lado, e uma longa alça (loop) do outro lado, sendo o nó de cisteínas a região central. Existe ainda um segmento das subunidades beta que se estende como um “cinto de segurança” (seat belt), que envolve a subunidade alfa e é “fechado” por uma ponte dissulfeto (**Figura 2.1**). No hCG, o cinto de segurança é formado pelos resíduos 91-110. Essa estrutura é importante para a estabilização e manutenção da associação não-covalente entre as duas subunidades, sendo assim essencial para a heterodimerização. Tanto a associação das subunidades alfa e beta como a ligação do heterodímero ao receptor dependem da presença do cinto de segurança intacto (Matzuk, Spangler *et al.*, 1989; Laphorn, Harris *et al.*, 1994; Ulloa-Aguirre e Timossi, 1998). Após ligação do GnRH (*gonadotropin-releasing hormone*, hormônio liberador de gonadotrofinas) ao seu receptor nos gonadotrofos, a biossíntese das gonadotrofinas é ativada, resultando em transcrição dos genes das subunidades, tradução dos RNA mensageiros (mRNA), modificações pós-tradução, dobramento e associação das subunidades, empacotamento e secreção do hormônio maduro pela hipófise. A presença de ligações dissulfeto confere a estrutura tridimensional da proteína garantindo a atividade biológica do dímero alfa-beta (Bulun, 2003).

A)

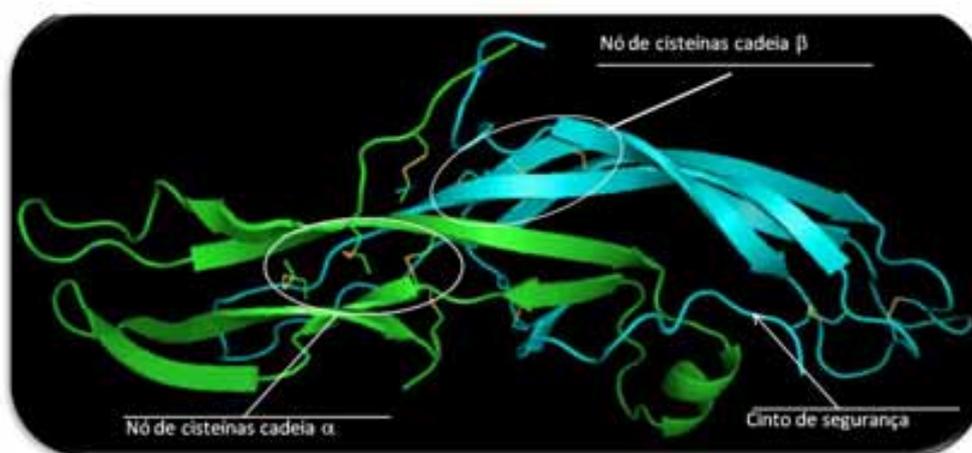


Figura 2.1 – Estrutura tridimensional do hCG. A) A subunidade alfa está representada em verde e a subunidade beta em azul. Subunidade beta do hCG possui 83% com a do LH. Traços amarelos representam as pontes dissulfeto. B) Em destaque os nós de cisteínas (círculos) e o “cinto de

segurança" (seta). Estrutura depositada no *Protein Data Bank* (PDB), referência: 1HRP. Imagem criada e visualizada com o programa PYMOL (DeLano Scientific LLC, Palo Alto, USA).

Os receptores para o LH pertencem à família dos receptores acoplados à proteína G. São compostos de sete domínios transmembrana, conectadas por três alças extracelulares e três intracelulares. Apresentam um grande domínio extracelular, em sua porção N-terminal, que é o domínio de ligação do hormônio. O domínio acoplado a proteína G está situado na porção C-terminal do receptor, e é homólogo a todos os receptores de hormônios glicoprotéicos (Themmen e Huhtaniemi, 2000). Este receptor é expresso nos testículos e nos ovários. No ovário, os receptores para LH são expressos na teca, estroma, granulosa luteinizada e células do corpo lúteo (Themmen e Huhtaniemi, 2000). Dessa forma, o LH é responsável pelo estímulo à produção de andrógenos nas células tecais, fornecendo assim substrato para a granulosa produzir estrógenos na fase folicular do ciclo menstrual. Considerando que para a produção de estrogênio pela granulosa na fase folicular do ciclo menstrual é necessária a produção de andrógenos, que servem como substratos, pelas células tecais, fica claro a importância do LH na produção de estrogênio. Além disso, no meio do ciclo menstrual o pico de LH induz a ovulação e, em seguida, o LH regula a produção de progesterona pelo corpo lúteo (Bulun, 2003). Nos testículos os receptores para LH situam-se exclusivamente nas células de Leydig. Sob estímulo do LH e após a puberdade as células de Leydig produzem testosterona. A testosterona é essencial para a espermatogênese atuando juntamente com o FSH na promoção desse processo (**Figura 2.2**) (Kretser, 2007).

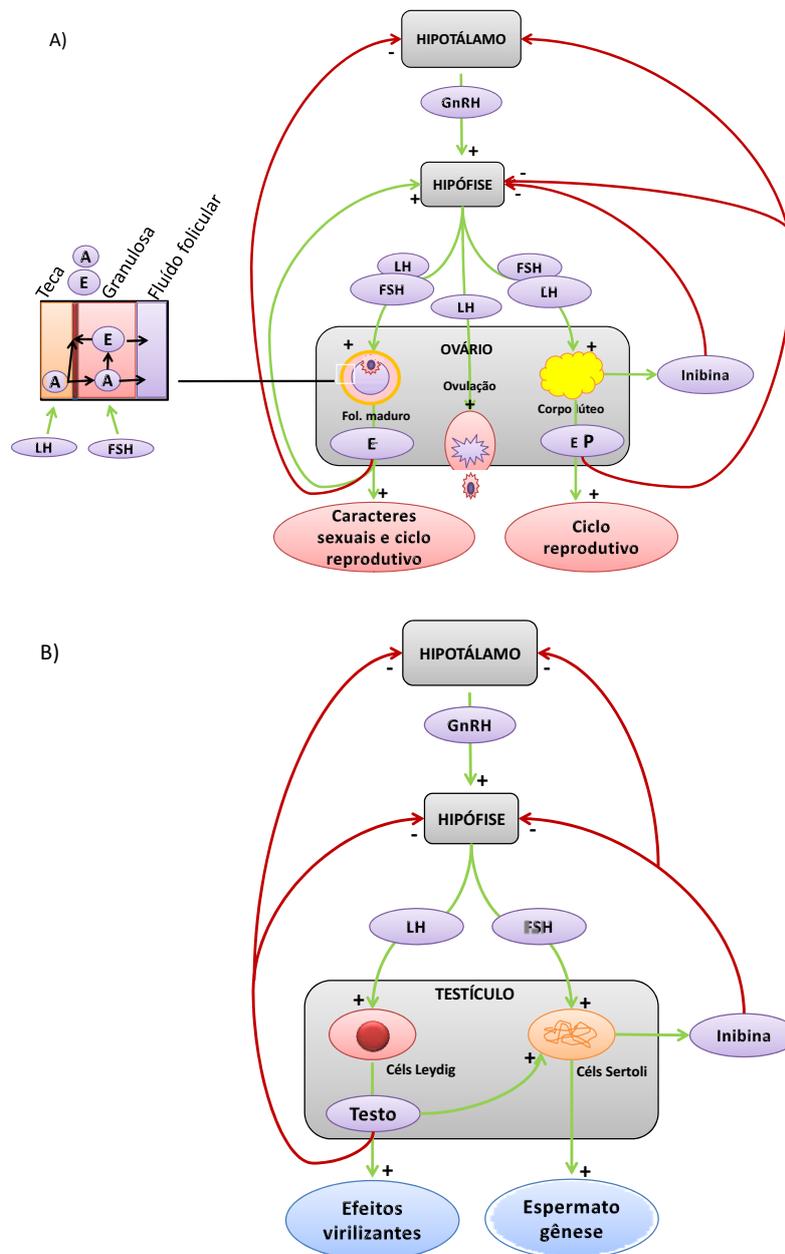


Figura 2.2 – Esquema representativo do eixo Hipotálamo-Hipófise-Gonadal destacando a ação das gonadotrofinas (LH e FSH). A produção das gonadotrofinas é ativada pela ação do GnRH, produzido no hipotálamo, sobre a hipófise, em ambos os sexos na puberdade. Serão detalhadas principalmente as ações do LH; setas verdes indicam estimulação e setas vermelhas inibição. A) No ovário durante a fase folicular, caracterizada pela formação do folículo dominante, a concentração de FSH é ligeiramente maior que a do LH. O FSH estimula a produção de estrógeno pelas células da granulosa do folículo e juntos são responsáveis pela seleção do folículo dominante. Nesta fase, o LH estimula as células tecais a produzirem androstenediona que será convertido em estradiol na granulosa e indiretamente participa da seleção do folículo dominante. A secreção de estrógenos na circulação permite sua ação nos tecidos alvos. A elevação progressiva da secreção das gonadotrofinas e estrógenos culmina em um pico de secreção de LH no meio do

ciclo que estimula a ovulação sendo esta uma das suas principais funções. Na fase lútea do ciclo o LH estimula o corpo lúteo a produzir progesterona. Nesta fase o corpo lúteo secreta inibina que reduz a secreção de FSH. Com a ausência de fertilização o corpo lúteo regride diminuindo a produção de esteróides gonadais e inibina. Assim, a secreção de FSH aumenta novamente e recomeça então o crescimento de um novo folículo dominante para o ciclo subsequente (Bulun, 2003). B) Nos testículos, o LH estimula a produção de testosterona pelas células de Leydig. A testosterona secretada na circulação exerce seus efeitos sobre os tecidos alvos. Além disso, a testosterona é essencial para a promoção da espermatogênese e age de forma paracrina sobre as células de sertoli. O FSH estimula as células de sertoli a produzir varias substâncias esperatogênicas. Para se iniciar a espermatogênese FSH e testosterona são necessários (Kretser, 2007).

O gene da subunidade beta do LH (gene LHB) está localizado no cromossomo 19 (cromossomo 19q13.3), o qual contém um agrupamento de sete seqüências relacionadas. Dessas seqüências, cinco são pseudogenes (não-codificantes), arrançados em grupos de pares invertidos (duplicados), um atrás do outro. Apenas os outros dois genes, LHB e hCGB, são funcionais. O gene LHB é expresso primariamente na hipófise de várias espécies de animais e nos humanos. Esse gene contém 1662 pares de base (pb), que constituem três éxons e dois íntrons (Talmadge, Vamvakopoulos *et al.*, 1984; Themmen, 2005). O mRNA da subunidade beta do LH codifica uma proteína precursora de 145 aminoácidos, que é posteriormente processada em um peptídeo maduro (121 aminoácidos), biologicamente ativo. As seqüências de aminoácidos da subunidade beta do LH humano e do hCG são 82% homólogas e têm atividade biológica idêntica, quando associadas à subunidade alfa (Themmen e Huhtaniemi, 2000).

2.1.3 - Mutações na subunidade beta do gene LH (LHB)

Apenas dois homens com deficiência seletiva de LH e mutação inativadora da subunidade beta do LH foram descritos na literatura. Ambos tinham virilização normal ao nascimento e se apresentaram com ausência de desenvolvimento puberal e azoospermia (Weiss, Axelrod *et al.*, 1992; Valdes-Socin, Salvi *et al.*, 2004). O estudo genético da família revelou que o caso-índice era homozigoto para uma mutação “missense” (A→G) no códon 54 do LHB, onde uma glutamina foi substituída por uma arginina (Gln→Arg). A mãe, uma irmã e três tios eram

heterozigotos para a mesma mutação. O gene mutado foi inserido num plasmídeo simultaneamente com o gene normal (selvagem) da subunidade alfa. O vetor contendo ambos os genes (subunidade alfa selvagem e subunidade beta mutado) foi transfectado em células de ovário de hamster (CHO), as quais são capazes de secretar o LH maduro. Nesse ensaio, observou-se que o hormônio mutado era secretado, pois foi detectado pelo ensaio imunoradiométrico específico para o dímero, demonstrando que a subunidade beta mutada foi capaz de se dimerizar com a subunidade alfa. Entretanto, nos ensaios de afinidade pelo receptor foi demonstrada ausência de ligação. Assim, os autores concluíram que a mutação Gln54Arg não afetava a dimerização ou a imunoreatividade do hormônio, contudo eliminava sua ligação ao receptor (Weiss, Axelrod *et al.*, 1992). No segundo caso, a apresentação clínica foi semelhante, exceto pelo LH sérico indetectável. O paciente afetado era homozigoto para uma mutação “missense” no códon 36 do gene da subunidade beta do LH (G→A), resultando na substituição de um aminoácido glicina por um ácido aspártico (Gly→Asp). Os genes das subunidades beta (selvagem e mutado) e alfa (selvagem) foram clonados em vetores que contêm tags logo após a seqüência codificante da extremidade C-terminal das proteínas, imediatamente antes do códon de parada. Para as subunidades beta, o “tag” escolhido a cauda de histidina (6xHis), e para a subunidade alfa, um epítipo da proteína do simian vírus 5 (V5). Em seguida, células HEK 293T (human embryonic kidney; rim humano embrionário) transfectadas com esses vetores de expressão e foi demonstrado por imunoprecipitação seguida de imunoblot que o LH β mutado não se dimerizava como o LH α e por esse motivo a mutação aboliu a secreção de LH (Valdes-Socin, Salvi *et al.*, 2004).

Em resumo, os dois casos de mutação inativadora do LHB em homens reforçam que o LH não é necessário para diferenciação sexual masculina no feto, mas é absolutamente necessário para o início da função testicular e desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários na puberdade. Antes do nosso estudo (**anexo II**) o fenótipo feminino de mutações inativadoras do LHB ainda não havia sido conhecido, pois nenhuma mulher havia sido identificada (Huhtaniemi, 2006).

2.1.4 - Polimorfismos no gene LHB

No Banco de dados de polimorfismos do National Center for Biotechnology Information (NCBI) estão depositados vinte e um polimorfismos de um único nucleotídeo no gene LHB, sete localizados no intron 1 (rs2387589, rs34489570, rs35427734, rs35612764, rs34398326, rs3956233, rs4002462), oito no exon 2 (rs34247911, rs5030775, rs35296413, rs1800447, rs35270001, rs34349826, rs6521, rs1056914), dois no intron 2 (rs4287687 e rs2387588) e quatro no exon 3 (rs5030773, rs1056917, rs5030774, rs2013040) (**Figura 2.3**). Dentre as variantes presentes nos exons trocas de aminoácidos ocorre em sete (rs34247911, rs5030775, rs1800447, rs35270001, rs34349826, rs5030773, rs5030774) e dentre elas destacam-se as variantes rs1800447 (Trp8Arg) e rs34349826 (Ile15Thr), que estão em completo desequilíbrio de ligação (sempre segregam juntas). O LH variante (Arg8/Thr15) está associado a uma maior atividade biológica e meia vida plasmática mais curta comparada com o LH selvagem (Trp8/Ile15). Além disso, o LH variante (Arg8/Thr15), em alguns estudos, está associadas com condições patológicas como ovário policístico e infertilidade (Lamminen, 2001). Não existem associações para os outros polimorfismos e nos introns as variações não se localizam nos sítios de splicing e, a princípio, não possuem conseqüências moleculares importantes.

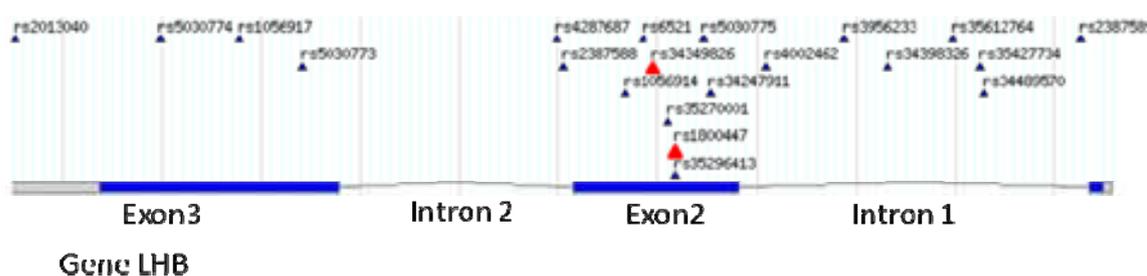


Figura 2.3 - Esquema do gene LHB onde estão representados seus exons (retângulos) e introns (linhas). As regiões em azul nos retângulos demarcam as regiões codificantes nos exons. Os triângulos acima de cada região representam a posição dos polimorfismos até então identificados no gene. Nesta Figura, o gene está representado na ordem inversa (Exon3-intron2-Exon2-Intron1-Exon 1) pois é esta sua disposição em relação ao início do cromossomo 19, forma de representação padrão dos bancos de dados de polimorfismos. Os triângulos vermelhos representam os polimorfismos rs1800447 (Trp8Arg) e rs34349826 (Ile15Thr) do exon 2. (Adaptado de http://www.hapmap.org/cgi-perl/gbrowse/hapmap_B35/).

2.2 OBJETIVO

Considerando que os 3 pacientes apresentam um quadro de hipogonadismo hipogonadotrófico com deficiência seletiva de LH nosso objetivo foi investigar a existência de mutação no gene do LHB, caracterizá-la molecularmente, e comprovar sua associação com o quadro de hipogonadismo hipogonadotrófico apresentado pelos pacientes

2.3 MATERIAIS E MÉTODOS

2.3.1 - Extração de DNA genômico de leucócitos do sangue periférico

O DNA dos sujeitos do estudo foi extraído de leucócitos do sangue periférico pelo método CHELEX-100™ (Walsh, 1991), conforme descrito a seguir. Cinco mililitros de sangue venoso foram colhidos em tubos com ácido etileno diaminotetracético (EDTA). Para extração do DNA, 1 ml de água milliQ foi misturado a 50 µl de sangue total e em seguida a mistura foi centrifugada por 3 min. Após descarte do sobrenadante, esse procedimento foi repetido uma vez. Em seguida, adicionou-se 200 µl da suspensão CHELEX-100™ 5%. Após homogeneização da amostra, a mesma foi incubada a 56°C por 30 min e a 100°C por 8 min e em seguida foi centrifugada 1 minutos a temperatura ambiente. Feito isso, o sobrenadante foi coletado e armazenado a -20°C para posterior utilização.

2.3.2 - Reação em cadeia da polimerase (PCR)

O DNA genômico foi utilizado como substrato para amplificação do gene *LHB*, utilizando-se um par de oligonucleotídeos iniciadores previamente descritos (Shiraishi e Naito, 2003), aqui representados por LH23F e LH23R (**Tabela 2.1**). Esses iniciadores se anelam no íntron 1 e na região 3' não traduzida do gene, respectivamente, e portanto amplificam um fragmento contendo o éxon 2, íntron 2 e éxon 3, que inclui toda a seqüência codificante da proteína madura. A extremidade 3' do oligonucleotídeo LH23R contém nucleotídeos que são complementares exclusivamente ao gene *LHB*, possibilitando assim sua amplificação específica a despeito dos altamente homólogos genes e pseudogenes da subunidade beta do hCG. Na reação de amplificação foram utilizados 5 ul de DNA genômico, 0,2 mM de cada desoxinucleotídeo (dNTP) , 50 ng de cada oligonucleotídeo iniciador, 1,25 U da enzima Taq DNA polimerase (Fermentas Inc., Hanover, MD), tampão de reação e sulfato de magnésio

fornecido e usado de acordo com o sugerido pelo fabricante, resultando em um volume final de 50 µL. A amplificação foi realizada em um termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc. Waltham, MA), em condições previamente descritas: 35 ciclos de 1 min a 94°C (desnaturação), 40 s a 65°C (anelamento) e 1 min a 72°C (extensão) (Shiraishi e Naito, 2003).

Tabela 2.1, Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na reação de polimerase em cadeia.

Nome	Orientação	Seqüência (5'>3')	Posição no <i>LHB</i>	Tamanho do fragmento
LH23F	<i>Sense</i>	GGGAATTCTCTTTGTGGGTGGTG TACCACGC	íntron 1	806 pb
LH23R	<i>Antisense</i>	GGAGGATCCGGGTGTCAGGGCTC CA	3' não-traduzida	

Para confirmação da amplificação do fragmento de interesse (806 pares de base), os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% e/ou acrilamida 5%, corados com brometo de etídio (0,5 µg/mL), visualizados em luz ultravioleta e fotografados.

2.3.3 - Sequenciamento automático

Os produtos da amplificação foram purificados por meio enzimático (sistema "EXO-SAP"). Num volume de 10 µl do produto de PCR foram acrescentados 1 U de exonuclease I (Biolabs) e 1 U de *shrimp alkaline phosphatase* (fosfatase alcalina de camarão - Promega). Em seguida, o produto foi incubado a 37°C por 30 min e depois a 80°C por 20 min.

Aos produtos de PCR purificados foram acrescentados 50 ng do oligonucleotídeo de interesse (*sense* ou *antisense*) e em seguida o material foi enviado para o serviço de seqüenciamento da Universidade Católica de Brasília. A análise, alinhamentos e comparações entre as seqüências foram realizadas com o

auxílio de softwares especializados: clustalw (Chenna, Sugawara *et al.*, 2003), pDRAW32 (AcaClone Software), chromas (Technelysium Pty LTD) e sequencher (Gene Codes corporation).

2.3.4 - Digestão enzimática

A seqüência de DNA dos pacientes foi comparada com a do gene LHB selvagem (X00264) disponível no banco de dados de seqüências nucleotídicas do NCBI. Observou-se que a nova mutação (IVS2+1G>C) destrói um sítio para a enzima *NcoI* no gene. Isso permitiu sua detecção por análise de restrição do tipo *restriction fragment length polymorphism* (RFLP). Assim, o rastreamento da mutação (IVS2+1G>C) nos demais familiares dos pacientes afetados e em 100 indivíduos normais (grupo controle) foi realizado por esse tipo de ensaio.

Para que o procedimento de RFLP pudesse ser aplicado outros sítios para *NcoI* no fragmento do gene LHB amplificado pelos primers LH23F e LH23R (806 bp) foram identificados e analisados. Observou-se que, nas seqüências de disponíveis e em bancos de dados de polimorfismos no NCBI, o fragmento LHB amplificado contém dois sítios para *NcoI*, um deles constante e um polimórfico. O sítio polimórfico contém uma variante alélica comum do gene *LHB* (Trp8Arg), onde ATC>ACC, localizada no éxon 2, e que destrói o sítio para enzima *NcoI* no local. A mutação IVS2+1G>C destrói o sítio constante presente nas seqüências. Assim, para facilitar tanto a análise quanto a compreensão do procedimento foram evidenciados apenas os fragmentos afetados pela IVS2+1G>C. Assim, a mutação pode ser identificada pela presença de um fragmento de 642 pb, e as selvagens por um de 542 pb no ensaio de RFLP. No caso dos indivíduos heterozigotos os dois fragmentos (642 pb e 542 pb) eram visualizados concomitantemente. Os locais dos sítios de restrição e o tamanho dos fragmentos gerados podem ser visualizados na **Figura 2.4**.

Assim, o fragmento do gene *LHB* (éxon 2, íntron 2 e éxon 3) desses indivíduos, após amplificação com primers LH23 F e LH23R, foram submetido à digestão enzimática. A reação de digestão constituiu-se de 20 µL do produto de

PCR, 0,5U da enzima *NcoI* (Fermentas Inc., Hanover, MD) e tampão de reação fornecido pelo fabricante, num volume final de 30 µl, com posterior incubação a 37°C de um dia para o outro. Os produtos dessa digestão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% ou acrilamida 5%, corados com brometo de etídio (0,5 µg/mL) e fotografados sob luz ultravioleta.

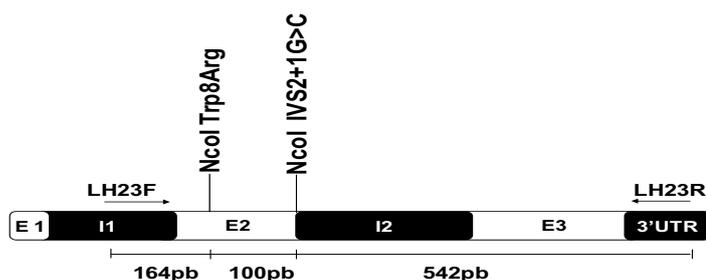


Figura 2.4, Representação esquemática:

- Do produto de PCR amplificado a partir do gene LHB com primers LH23F e LH23R.
- Dos locais dos sítios para a enzima *NcoI* usada no ensaio de RFLP para detecção da mutação IVS2+1G>C nos familiares dos pacientes e no grupo controle.
- Dos tamanhos dos fragmentos gerados pela digestão enzimática. O alelo selvagem (WT) apresenta 3 fragmentos: 542, 164 e 100 pb. Um indivíduo homocigoto para a mutação IVS2+1G>C (MUT) apresenta 2 fragmentos (642 e 164 pb) e um heterocigoto, 4 fragmentos (642, 542, 164 e 100 pb). Apenas os fragmentos de 642 e 542 foram avaliados para facilitar a compreensão do experimento.

2.3.5 - Extração de RNA de sangue total

Com a hipótese de que a nova mutação encontrada, por estar localizada no sítio doador de *splicing* do *LHB*, possivelmente resultaria em anormalidade no processamento do mRNA, analisamos o mRNA dos indivíduos afetados por meio de RT-PCR (RT : transcrição reversa). Considerando que LH é expresso primariamente na hipófise e que esse órgão estaria inacessível, resolvemos avaliar que outro tecido poderia também expressar LH e a resposta encontrada foi os leucócitos. Hotakainen e colaboradores demonstraram que o mRNA LHβ é

expresso também, em menor quantidade, nos leucócitos humanos e que ao serem estimulados com prolactina estas células foram capazes de secretar a proteína LH em pequenas quantidades (Hotakainen, Serlachius *et al.*, 2000).

Utilizando a técnica de *nested* RT-PCR, esses autores demonstraram a expressão de *LHB* mRNA em leucócitos de sangue periférico de seres humanos normais, enquanto a expressão de *CGB* mRNA não foi detectada na ausência de estímulos como, por exemplo, o tratamento das células com prolactina. (Hotakainen, Serlachius *et al.*, 2000).

Assim, procedemos a extração do RNA total com utilização do reagente Trizol[®] (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Inicialmente, à camada leucoplaquetária obtida após centrifugação de 5 ml de sangue total foi adicionado 1 ml de Trizol, seguido de homogeneização e incubação por 5 min à temperatura ambiente. Após este período, adicionou-se 0,2 ml de clorofórmio, seguido de centrifugação a 12,000× *g* por 15 minutos entre 2 e 8°C. À fase aquosa foi adicionado 0,5 ml de isopropanol para precipitação do RNA, seguido de centrifugação a 12,000 × *g* por 10 minutos entre 2 e 8°C. Posteriormente foi realizada lavagem do precipitado com etanol 70% e re-suspensão em água livre de RNase (água DEPC). O material obtido foi armazenado à temperatura de -80°C para posterior análise. As amostras de RNA isolado foram tratadas com a enzima DNase I livre de RNase (Fermentas Inc., Hannover, MD) seguindo as orientações do fabricante, a fim de reduzir ao máximo o conteúdo de DNA genômico contaminante, antes dos experimentos de RT-PCR. Como controle para confirmação da ausência de contaminação por DNA, todas as amostras foram submetidas às reações sem a etapa de transcrição reversa.

2.3.6 - Síntese do cDNA ou transcrição reversa

O primeiro molde de cDNA foi sintetizado a partir de 2 µg do RNA isolado e 0,5 ng do oligonucleotídeo iniciador LH23R, num volume total de 30 µl. Após incubação a 70°C por 5 min e resfriamento em gelo, a amostra foi centrifugada e a solução presente no fundo do tubo foram adicionados 200 U da enzima M-MLV

transcriptase reversa (Promega, Madison, WI, USA), 0,2 mM de cada desoxinucleotídeo (dNTP) e 10 µl de tampão de reação fornecido pelo fabricante. O produto dessa reação foi incubado por 90 minutos a 42°C.

2.3.7 - Amplificação do cDNA (*semi-nested RT-PCR*)

2.3.7.1 - Pré-amplificação

As amostras de cDNA obtidas foram subseqüentemente pré-amplificadas utilizando-se um oligonucleotídeo *sense* que foi denominado 3F, especialmente desenhado para este estudo (**Tabela 2.2**), e o *antisense* LH23R. Para um volume total de reação de 50 µL, foram adicionados 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 50 ng de cada oligonucleotídeo iniciador, 5 µL da solução contendo o cDNA e 1,25 U da enzima Go Taq polimerase (Promega, Madison, WI, USA). O ciclo de pré-amplificação consistiu de uma desnaturação inicial a 94°C durante 3 minutos, seguido de 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 60°C (temperatura de anelamento), 1 min a 72°C (extensão), e em seguida de uma etapa final de extensão de 5 min a 72°C. (**Figura 2.5**)

Tabela 2.2. Oligonucleotídeos utilizados na *semi nested RT-PCR*.

	Seqüência	Sítios de hibridização
1F	GGCGGGGCATGGGCATCCAG	Início éxon 2
2F	CCGGCTACTGCCCCACCATGA	Final do éxon 2 e 1 nucleotídeos do éxon 3
3F	GCACCAAGGATGGAGATGCTCCAG	Éxon 1
4F	GGTGGTCTGCCTCTCTGGCCT	Íntron 2

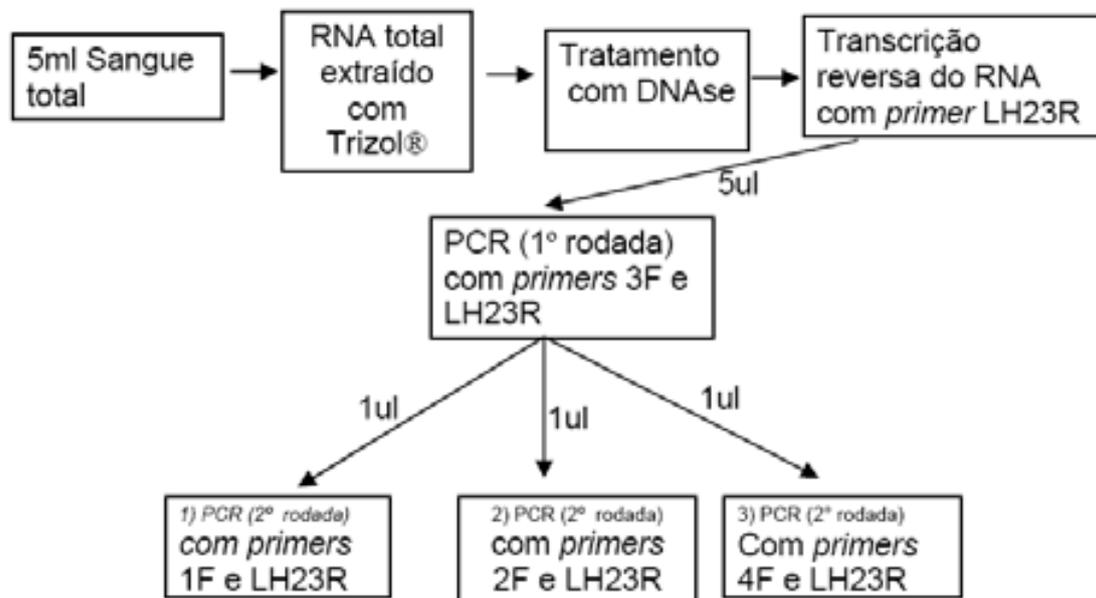


Figura 2.5, Representação esquemática do protocolo utilizado na *semi-nested* RT-PCR para amplificação do mRNA *LHB* de leucócitos de sangue periférico humano.

2.3.7.2 - Semi nested RT-PCR

Um microlitro dos produtos da pré-amplificação foram subsequentemente amplificados por meio de *semi-nested* PCR utilizando-se pares de oligonucleotídeos iniciadores (1F/LH23R, 2F/LH23R e 4F/LH23R) especificamente desenhados para esse estudo, em condições idênticas às da primeira etapa. As seqüências desses oligonucleotídeos estão descritas na **Tabela 2.2**.

A estratégia utilizada nessa RT-PCR e os sítios de hibridização dos oligonucleotídeos encontram-se esquematizados na **Figura 2.6**. Essa estratégia foi definida com o objetivo de detectar anormalidades pós-transcricionais no mRNA *LHB*. A forma *nested* proporciona maior sensibilidade e especificidade na amplificação do cDNA e a escolha de oligonucleotídeos que se anelam em

posições estratégicas permite a diferenciação de formas de mRNA com alguma alteração no processamento.

O oligonucleotídeo LH23R foi o iniciador reverso (*antisense*) escolhido para todas as reações, devido ao seu sítio de hibridização localizado na região 3' não traduzida do gene e à sua seqüência altamente específica para o *LHB*. Na ocorrência de um processamento normal do mRNA no intron 2, o oligo LH23R, em combinação com o oligo 1F, amplificam um fragmento de 445 pb e na ausência um fragmento de 681 pb. O oligo 2F se anela quase completamente no final do éxon 2, mas tem o último nucleotídeo na sua extremidade 3' complementar ao primeiro nucleotídeo no éxon 3, o que o torna específico para a forma normalmente processada do mRNA produzindo um fragmento de 328 pb. Por fim, o oligo 4F se anela completamente no íntron 2, e portanto só amplifica formas de mRNA que não sofreram processamento após a transcrição produzindo um fragmento de 473 pb. Assim, os resultados fornecidos por essa combinação de pares primers poderia se identificar rapidamente as conseqüências da mutação IVS2+1G>C sobre a retirada do intron 2 do *LHB* mRNA (**Figura 2.6**). Os produtos finais da *semi-nested* RT-PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, corados com brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta. Posteriormente, suas seqüências e especificidade foram verificadas por meio de seqüenciamento automático.

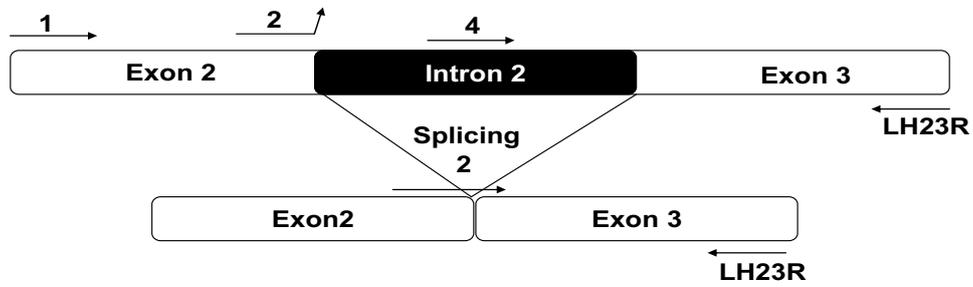


Figura 2.6, Representação esquemática da estratégia de amplificação utilizada na *semi nested* RT-PCR, mostrando as regiões de hibridização dos oligonucleotídeos (1F, 2F, 4F e LH23R) no cDNA.

2.4 RESULTADOS

2.4.1 - Análise do gene *LHB* nos três pacientes com deficiência seletiva de *LH*.

Um fragmento de 806 pares de bases (pb) do gene *LHB* contendo a seqüência codificante da subunidade beta do LH foi amplificado com sucesso a partir do DNA dos indivíduos afetados e de um indivíduo controle. Os produtos de PCR foram seqüenciados e a comparação das seqüências obtidas com as descritas na literatura e com a do controle revelou a substituição de uma guanina (G) por uma citosina (C) na posição +1 do íntron 2 do gene *LHB*, em homozigose, nos três irmãos afetados (**Figura 2.7 e 2.8**).

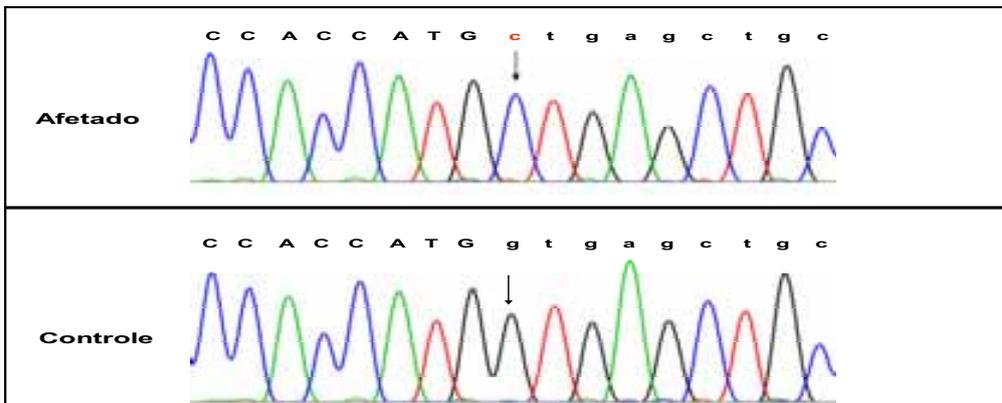


Figura 2.7, Afetado: seqüenciamento da junção éxon 2 – íntron 2 do gene *LHB* da mulher com deficiência seletiva de LH, mostrando a substituição G>C no primeiro nucleotídeo do íntron 2, no sítio doador de *splicing* (5'). Controle: seqüência normal (controle-C1). As setas mostram a mutação (IVS2+1G>C). Letras maiúsculas representam nucleotídeos exônicos e letras minúsculas, nucleotídeos intrônicos.

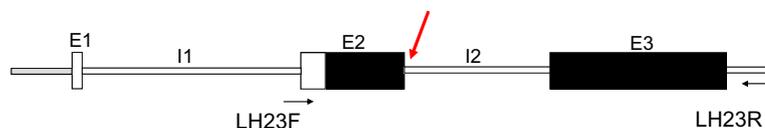


Figura 2.8, Representação esquemática do gene *LHB*, mostrando a posição da mutação IVS2+1G>C (seta vermelha) e os sítios de hibridização dos oligonucleotídeos utilizados na PCR [(LH23F e LH23R) setas pretas]. As regiões que codificam o peptídeo sinal aparecem em branco e as que codificam a proteína madura, em preto. E: éxon; I: íntron.

2.4.2 - Rastreamento da mutação IVS2+1G>C nos familiares

O fragmento do gene *LHB* dos familiares consangüíneos dos indivíduos afetados foi amplificado com sucesso para rastreamento da mutação. A digestão dos produtos de PCR com *NcoI* (**Figura 2.9**) resultou na identificação de seis heterozigotos para mutação de um total de 13 indivíduos estudados: os pais, duas irmãs, um irmão e sobrinho (representados no heredograma da **Figura 2.10** por I-1, I-2, II-2, II-7, II-14 e III-3, respectivamente).

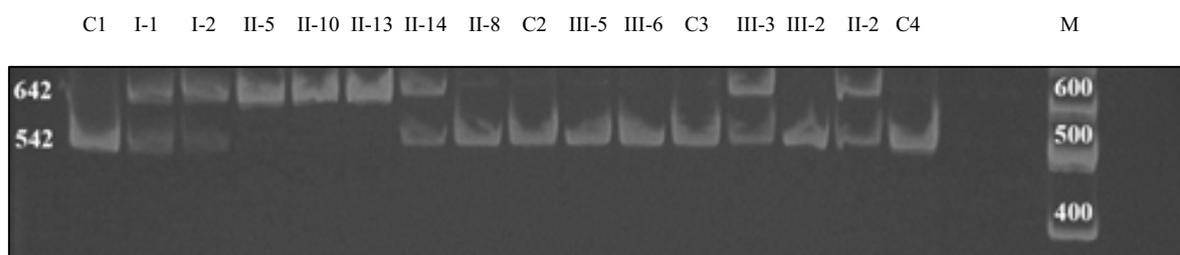


Figura 2.9, Fotografia de um gel de acrilamida, visualizado sob luz ultravioleta, mostrando os produtos da digestão com a enzima *NcoI* de 12 indivíduos da família afetada e 4 indivíduos controles. Os números à esquerda expressam o tamanho dos fragmentos (em pares de bases). A linha acima das colunas de eletroforese se refere à identificação dos indivíduos no heredograma. C1, C2, C3, C4: indivíduos-controles; M: marcador de peso molecular.

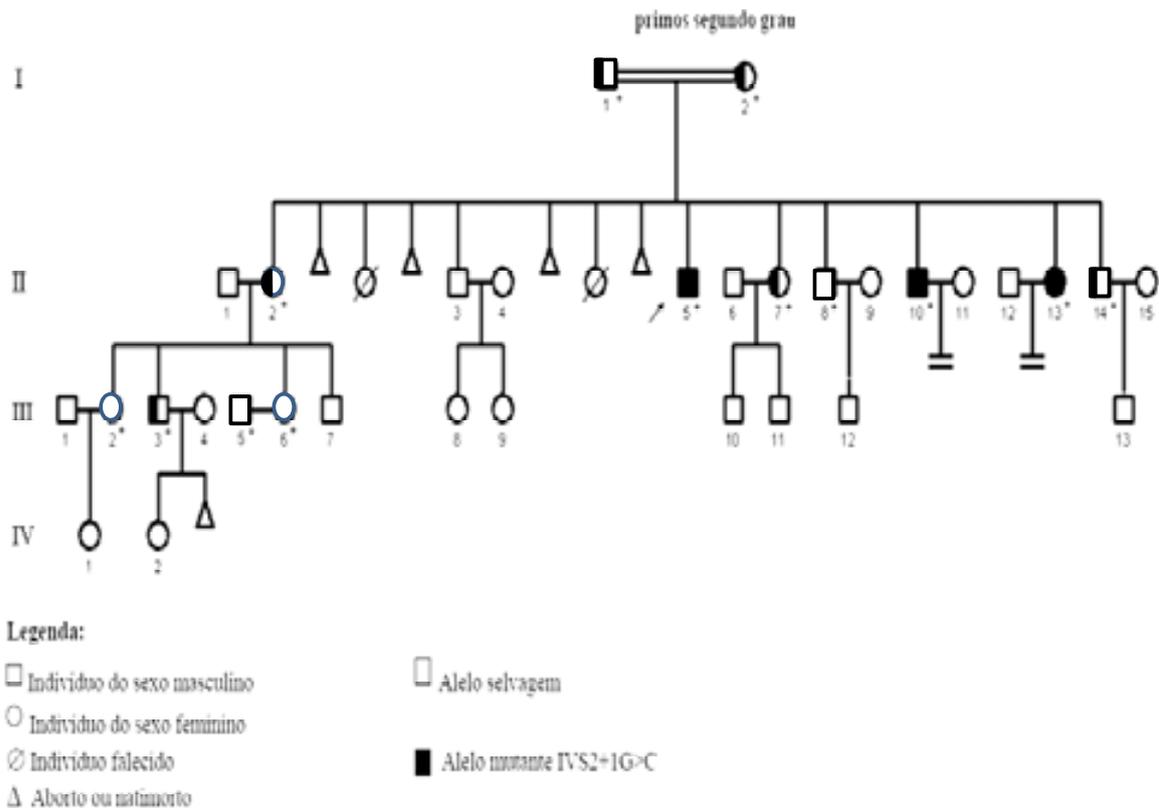


Figura 2.10, Heredograma. Os indivíduos homocigotos para a mutação IVS2+1G>C estão representados por uma Figura preenchida de preto. Os asteriscos sinalizam os indivíduos estudados. A seta aponta o caso-índice.

O LH variante (polimorfismo Trp8Arg) também foi detectado por esta análise e 5 heterocigotos foram identificados (indivíduos I-1, II-14, II-8, III-2, II-2). Não foram identificados indivíduos homocigotos Arg/Arg (dado não mostrado). Os indivíduos afetados apresentaram o genótipo Trp/Trp para este polimorfismo indicando que a mutação IVS2+1G>C ocorreu no LH selvagem.

2.4.3 - Rastreamento da mutação IVS2+1G>C no grupo controle de 100 indivíduos.

Considerando que essa mutação não estava descrita no banco de dados de polimorfismos, nós resolvemos estudá-la em um grupo controle de 100 indivíduos normais. A análise do fragmento do *LHB* por digestão com *NcoI* não demonstrou a presença da mutação IVS2+1G>C em nenhum dos 100 indivíduos estudados.

2.4.4 - Análise do efeito da mutação IVS2+1G>C sobre o processamento do RNA (*splicing*) de leucócitos.

O mRNA do gene *LHB* extraído de leucócitos de 2 pacientes afetados (II-5 e II-13), 2 familiares heterozigotos e do sujeito-controle (C1) foram submetidos à transcrição reversa e amplificados com sucesso. Os resultados da amplificação reversa estão apresentados na **Figura 2.11** e são descritos a seguir:

Um fragmento do tamanho esperado (445 pb) foi amplificado com o par de oligos 1F/LH23R na *semi nested* RT-PCR, no controle e nos heterozigotos assintomáticos. Entretanto, nos indivíduos homozigotos para a mutação, observou-se sistematicamente um produto aproximadamente 681 pb ou seja uma diferença próxima de 236pb maior (**Figura 2.11 - Painel superior**). Com a utilização do oligonucleotídeo 2F, específico para a forma normalmente processada do mRNA *LHB*, não ocorreu amplificação no material extraído dos pacientes homozigotos para a mutação, mas houve amplificação do produto esperado no controle e nos heterozigotos (328 pb) (**Figura 2.11 - Painel central**). Por outro lado, a RT-PCR com o oligo 4F, específico para a forma não processada do mRNA *LHB*, isto é, a forma que inclui o íntron 2, resultou na amplificação de um produto de 473 pb apenas nos homozigotos, mas não nos heterozigotos ou no controle (**Figura 2.11 - Painel inferior**).

Como esperado para uma amostra não contaminada por DNA genômico, não se observou produto de amplificação nas amostras que não foram submetidas à transcrição reversa (representadas na **Figura 2.11** por “-”).

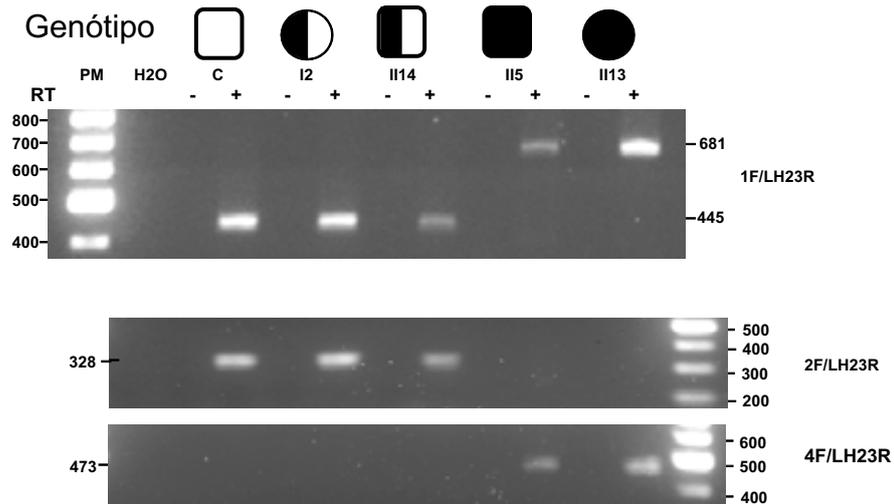


Figura 2.11, Produtos da *semi nested* RT-PCR do mRNA *LHB*, visualizados em gel de agarose. Painel superior: Utilizando-se o par de oligonucleotídeos 1F/LH23R, o fragmento amplificado nos homocigotos para a mutação IVS2+1G>C é aproximadamente 236 pb maior do que o esperado, que foi normalmente observado no controle (445 pb). Nos heterocigotos, observou-se amplificação apenas do fragmento de tamanho normal (igual ao controle). Painel do meio: Com o par de oligos 2F/LH23R, houve amplificação de um fragmento de 328 pb no controle e nos heterocigotos, mas não nos homocigotos indicando ausência de mRNA processado nos homocigotos. Painel inferior: Com o par de oligos 4F/LH23R, observou-se amplificação de um fragmento de 473 pb presente apenas no RNA extraído dos pacientes homocigotos, mas não no controle ou nos heterocigotos indicando que mRNA não processado estava presente apenas nos homocigotos. Na linha acima da Figura estão representados os indivíduos dos quais as amostras foram obtidas e seus respectivos genótipos, conforme apresentados no heredograma da **Figura 3.10** (I-2, II-14, II-5 e II-13). RT “+” e “-” indicam as amostras que foram (+) submetidas à transcrição reversa antes da PCR e as que não foram (-). MW: marcador de peso molecular. C: controle (C1).

Os produtos da *semi nested* RT-PCR (oligos 1F/LH23R) da paciente afetada (II-13) e controle foram sequenciados para confirmação do defeito no processamento pós-transcricional do mRNA resultante da mutação IVS2+1G>C. Verificou-se que a diferença de tamanho do fragmento obtido na RT-PCR da amostra da paciente em relação ao controle devia-se à presença de todos os 236 nucleotídeos do íntron 2 no mRNA da paciente. Em outras palavras, o seqüenciamento revelou a inclusão completa do íntron 2 no mRNA da paciente, resultante da presença da mutação pontual (G>C) no sítio doador

de *splicing* (5') e conseqüente comprometimento do processamento pós-transcricional (**Figura 2.12**).

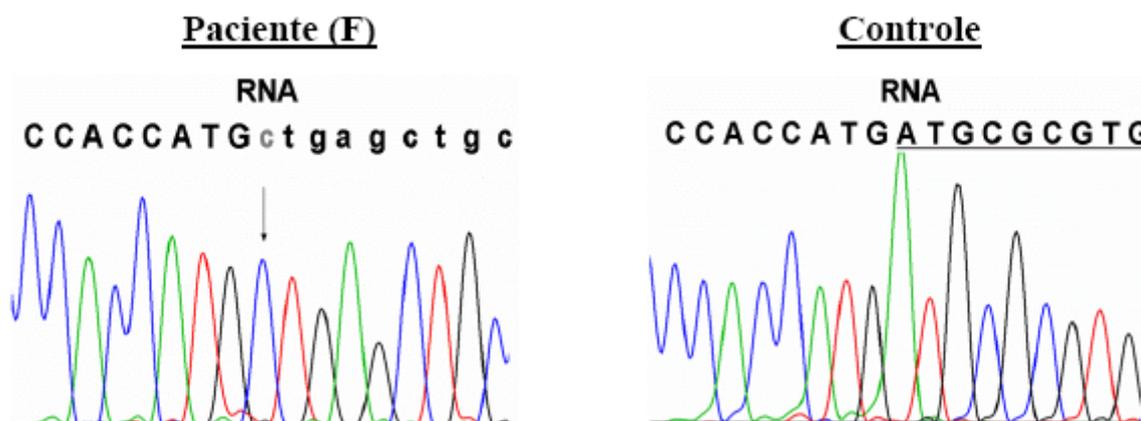


Figura 2.12, Seqüenciamento do produto da RT-PCR da paciente afetada (II-13) e do controle (C1), mostrando a região da junção éxon 2- íntron 2. As letras maiúsculas indicam seqüências exônicas e as minúsculas, seqüências intrônicas. A seta indica a mutação. No controle, observa-se que o mRNA processado possui as seqüências exônicas esperadas, enquanto no mRNA da paciente, a presença de um nucleotídeo C na posição +1 do íntron 2 resultou na retenção desse íntron.

2.4.5 - Análise comparativa das seqüências do *LHB* selvagem (*wt*) e mutante (*mut*).

Os produtos da PCR obtidos com o par de oligos 1F/LH23R foram seqüenciados e as seqüências de nucleotídeos do *LHB* selvagem (éxon 2, íntron 2, éxon 3) e do mutante foram comparadas. Nessa análise, observou-se que a seqüência do fragmento do *LHB* amplificado dos pacientes afetados era idêntica à seqüência de referência do NCBI (ref|NC_000019.8|NC_000019:c54212159-54211049), exceto o nucleotídeo G na posição +1 do íntron 2, que foi substituído por um C (mutação IVS2+1G>C).

Em seguida, procedeu-se à análise da seqüência de aminoácidos da suposta proteína aberrante em comparação com a do LH-beta selvagem. Observou-se que a inclusão da seqüência de nucleotídeos do íntron 2 no mRNA mutante resultaria em mudança da fase de leitura do éxon 3. Além disso, a proteína aberrante apresentaria a inserção de 79 aminoácidos correspondentes ao íntron 2.

Os resultados do alinhamento das seqüências de nucleotídeos e aminoácidos estão esquematicamente apresentados na **Figura 2.13**.

		1	
G L L L L L L L S M G G A W A S R			Selvagem
GGGCTGCTGC TGTGCTGCT GCTGAGCATG GGCGGGGCAT GGGCATCCAG			
G L L L L L L L S M G G A W A S R			Mutante
		10	
E P L R P W C H P I N A I L A V E			Selvagem
GGAGCCGCTT CGGCCATGGT GCCACCCCAT CAATGCCATC CTGGCTGTCG			
E P L R P W C H P I N A I L A V E			Mutante
		20	
K E G C P V C I T V N T T I C A		30	Selvagem
AGAAGGAGGG CTGCCCAGTG TGCATCACCG TCAACACCAC CATCTGTGCC			
K E G C P V C I T V N T T I C A			Mutante
		40	
G Y C P T M			Selvagem
GGTACTGCC CCACCATG CT GAGCTGCCTG GGGCCAGGGG CAGATGCTGC			
G Y C P T M L S C L G P G A D A A			Mutante
			Selvagem
CACCTCAGGG CCAGACCCAC AGAGGCAGCG GGGGAGGAAG GGTGGTCTGC			
T S G P D P Q R Q R G R K G G L P			Mutante
			Selvagem
CTCTCTGGCC TCGGTTGGG GAATGGGGTG TGGGAAGGCA GGAACAGAGG			
L W P A V G E W G V G R Q E Q R			Mutante
			Selvagem
GCTTCCTGGG CTCCTGAGTC CAGGACCTGT GGGGTCAGCT TGGGAGCTCA			
A S W A P E S R T C G V S L G A Q			Mutante
			Selvagem
GCTGAGGCGG TGGCCTCAGG CACATGCTCA TTCCCCACT CACACGGCCT			
L R R W P Q A H A H S P T H T A S			Mutante
		50	
...M R V L Q A V L P P L P Q V V C			Selvagem
CCAGATGCGC GTGCTGCAGG CGTCTCTGCC GCCCCTGCCT CAGGTGGTGT			
R C A C C R R S C R P C L R W C			Mutante

60	70	
T Y R	D V R	F E S I R L P G C P
<u>GCACCTACCG</u>	<u>TGATGTGCGC</u>	<u>TTCGAGTCCA</u>
A P T V	M C A	S S P S G S L A A R
80	90	
R G V D	P V V	S F P V A L S C R C
<u>CGTGGTGTGG</u>	<u>ACCCCGTGGT</u>	<u>CTCCTTCCCT</u>
V V W	T P W S	P S L W L S A V A V
100		
G P C	R R S T	S D C G G G P K D H P
<u>TGGACCCTGC</u>	<u>CGCCGCAGCA</u>	<u>CCTCTGACTG</u>
D P A	A A A	P L T V G V P K T T
110	120	
L T C	D H P	Q L S G L L F L *
<u>CCTTGACCTG</u>	<u>TGACCACCCC</u>	<u>CAACTCTCAG</u>
P *		<u>GCCTCCTCTT</u>
		<u>CCTCTAAAGA</u>
CCCTCCCCGC	AGCCTTCCAA	GTCCATCCCCG ACTCC

Figura 2.13, Alinhamento das seqüências de nucleotídeos e aminoácidos do *LHB* selvagem e mutante. O nucleotídeo que sofreu a mutação no sítio de *splicing* 5' está destacado em vermelho. As seqüências exônicas estão sublinhadas e a seqüência do íntron 2 está em laranja. A retenção do íntron 2 resultaria na inserção de 79 aminoácidos (destacados em cinza claro) na suposta proteína aberrante e na mudança da fase de leitura do éxon 3 (*frameshift*). Os números acima de cada série se referem às posições dos aminoácidos na proteína madura selvagem. Em amarelo estão destacados os resíduos de cisteína 57, 88 e 90 (C) essenciais para a formação do "nó de cisteínas". Em cinza, está destacada a seqüência correspondente ao "cinto de segurança" (aminoácidos 90 a 110) na proteína madura (*LHB*: NCBI ref|NC_000019.8|NC_000019:c54212159-54211049).

2.5 Discussão

Neste estudo, foi descrita uma nova mutação no gene LHB que causou deficiência seletiva de LH em três irmãos, dois homens e uma mulher, de pais consangüíneos. A mutação está localizada numa região altamente conservada do íntron 2 do gene LHB, no sítio doador de splicing (IVS2+1G>C). Os três irmãos afetados foram homozigotos para a nova mutação e seis heterozigotos foram encontrados na família. A análise da mutação revelou que a substituição do nucleotídeo G por um C na posição +1 do íntron 2 resultou na inclusão dos 256 pares de bases do íntron 2 no mRNA dos afetados, o que representa a inclusão de 79 aminoácidos na suposta proteína aberrante e alteração no quadro de leitura do éxon 3.

Quanto à análise dos indivíduos heterozigotos, observou-se que todos eram férteis e não apresentavam condições clínicas relacionadas à presença do alelo mutante. Aparentemente a secreção de LH era normal nesses indivíduos.

Todas as mutações nos genes das gonadotrofinas descritas até o momento estão localizadas nos éxons desses genes (Weiss, Axelrod *et al.*, 1992; Layman, Lee *et al.*, 1997; Lindstedt, Nystrom *et al.*, 1998; Layman, Porto *et al.*, 2002; Valdes-Socin, Salvi *et al.*, 2004; Daly, 2006). A mutação descrita nesse trabalho está localizada no íntron e resultou em deficiência de LH por um mecanismo molecular distinto. Foi descrito que as seqüências que flanqueiam as junções éxon-íntron são críticas para o reconhecimento dos sítios de *splicing*, pois contém sinais reguladores importantes para o processamento pós-transcricional do mRNA (Xing, Wang *et al.*, 2006). Mutações nessas regiões freqüentemente têm sido associadas a doenças (Lopez-Bigas, Audit *et al.*, 2005). Por esse motivo, com a hipótese de que a substituição G>C pudesse interferir no *splicing* do íntron 2, realizamos a análise da transcrição do gene *LHB in vivo*, utilizando o RNA isolado de leucócitos dos pacientes afetados. Nós utilizamos leucócitos por recentemente, foi demonstrado que o mRNA LHβ é expresso, em menor quantidade, nos leucócitos humanos e que ao serem estimulados com prolactina estas células foram capazes de secretar a proteína

LH em pequenas quantidades. A maior secreção de LH observada ocorreu ao se estimular as células com 100ng/ml de prolactina, o que também induziu um pronunciado efeito mitogênico. Esta concentração é similar as observadas em grávidas e lactantes, e é 5-10 vezes maior que a de homens e mulheres não grávidas. No entanto, a concentração de LH no meio de cultura das células é muito pequena quando comparados com a de hCG no sangue durante a gravidez (Hotakainen, Serlachius *et al.*, 2000). Dessa forma, está claro que além da hipófise, leucócitos expressam LH e é possível que possua alguma importância fisiológica por uma atuação parácrina ou autócrina. Em nosso estudo, não estimulamos os leucócitos com prolactina pois, nós conseguimos amplificar bem o mRNA do LH β sem nenhum estímulo e não sabemos se a adição de prolactina poderia modificar de alguma forma a processamento do mRNA.

Através da análise dos produtos da RT-PCR, foi possível demonstrar que a mutação INS2+1G>C resultou na inclusão de todo o íntron 2, e conseqüentemente, na mudança no quadro de leitura do éxon 3. Além disso, induziu anormalidade grosseira no mRNA do *LHB*, dando origem à seqüência de aminoácidos bastante alterada da suposta proteína aberrante.

Curiosamente, a análise molecular dos heterozigotos revelou a presença apenas do mRNA normal, mas não do mutante (**Figura 2.11**). A razão para esse achado não pôde ser determinada no presente estudo, mas várias possibilidades podem ser sugeridas. A hipótese mais direta e provável nesse caso é que a ausência de detecção do mRNA mutante nos heterozigotos seja decorrente de diferenças nas concentrações iniciais das duas espécies de mRNA, de modo que aquela presente em maior concentração será preferencialmente amplificada na nested RT-PCR. Entretanto, ao se utilizar iniciadores específicos para cada uma das duas espécies de mRNA o mutante continuou não detectado nos heterozigotos (**Figura 2.11, painel inferior**). As diferenças nas concentrações iniciais das duas espécies de mRNA podem ser devido a diferentes níveis de ativação transcricional dos respectivos promotores ou diferenças na estabilidade destes RNAs secundária a mecanismos celulares de controle de qualidade do mRNA que reconhecem e

eliminam transcritos alterados por mutações, como o non-sense mRNA decay (Maquat, 2004).

A ausência da mutação nos cem indivíduos do grupo controle (200 cromossomos) reforça que não se trata de um polimorfismo.

Na análise comparativa das seqüências do mRNA mutante e da suposta proteína codificada, verificou-se que a região do “cinto de segurança” (*seat-belt region*) estaria ausente (**Figura 2.13**). A região da proteína correspondente a essa estrutura constitui-se em um segmento conservado entre as subunidades beta dos hormônios glicoprotéicos, codificado pelo éxon 3 (Lapthorn, Harris *et al.*, 1994). No hCG maduro, essa estrutura envolve a subunidade alfa e é essencial para a manutenção do dímero e, portanto, para a ligação com o receptor (Matzuk, Spangler *et al.*, 1989; Lapthorn, Harris *et al.*, 1994). Além disso, a proteína mutante também perderia resíduos de cisteína importantes para a formação do “nó de cisteínas”, outra estrutura essencial para a dimerização. Esses aspectos estão ilustrados na **Figura 2.14**, na qual estão simulados os efeitos da mutação IVS2+1G>C sobre a estrutura tridimensional do hCG, análoga à do LH (Lapthorn, Harris *et al.*, 1994). Essas observações sugerem que a proteína aberrante seria incapaz de se dimerizar corretamente com a subunidade alfa e por esse motivo não seria secretada, dando origem então à condição patológica de deficiência seletiva de LH.

Assim, a explicação molecular para a condição de hipogonadismo hipogonadotrófico por deficiência seletiva de LH nos pacientes foi secundária a presença de uma mutação intrônica que impediu o processamento normal do mRNA levando a produção de uma proteína aberrante que não é secretada. Trata-se do primeiro caso de mutação localizada no íntron do LH e também da primeira descrição de mutação no gene LHB no sexo feminino ocasionando deficiência seletiva de LH, que mostrou ter infertilidade, mas aspecto fenotípico normal, ao contrário dos homens que apresentam virilização incompleta.

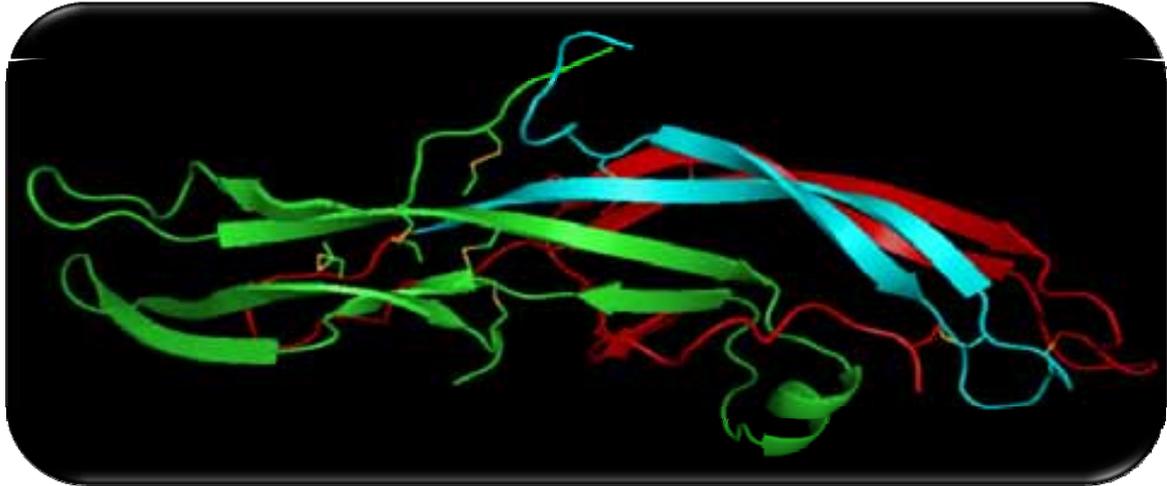


Figura 2.14, Simulação teórica da estrutura tridimensional da proteína madura (dímero subunidade alfa - proteína aberrante), resultante da mutação IVS2+1G>C. A subunidade alfa está representada em verde. Em azul, tem-se a região da subunidade beta do LH que estaria preservada. Em vermelho, está apresentada a região comprometida pela presença da mutação. Estrutura depositada no *Protein Data Bank* (PDB), referência: 1HRP. Imagem criada e visualizada com o programa PYMOL (DeLano Scientific LLC, Palo Alto, USA).

2.6 CONCLUSÃO

- 1- Deficiência seletiva de LH nos pacientes foi secundária a presença de uma mutação intrônica que impediu o processamento normal do mRNA do gene LHB levando a produção de um LH aberrante que não é secretado.

REFERÊNCIAS

- Bulun, S. E. A., E. The physiology and pathology of the female reproductive axis. In: P. Larsen, Kronenberg, H, Melmed, S, and Polonsky, Ks (Ed.). Williams Textbook of Endocrinology. Philadelphia: Saunders, 2003. The physiology and pathology of the female reproductive axis, p.587-648
- Chenna, R., H. Sugawara, *et al.* Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. Nucleic Acids Res, v.31, n.13, Jul 1, p.3497-500. 2003.
- Daly, A. F. S., R.; Menaje, J.; Thiry, A.; Pralong, F.; Gaillard, R.; Beckers, A. Identification of a family harboring a novel LH beta-subunit mutation associated with hypogonadism. (Abstract). Endocrine Society Meeting, 2006. p.
- Hotakainen, P. K., E. M. Serlachius, *et al.* Expression of luteinising hormone and chorionic gonadotropin beta-subunit messenger-RNA and protein in human peripheral blood leukocytes. Mol Cell Endocrinol, v.162, n.1-2, Apr 25, p.79-85. 2000.
- Huhtaniemi, I. Mutations along the pituitary-gonadal axis affecting sexual maturation: novel information from transgenic and knockout mice. Mol Cell Endocrinol, v.254-255, Jul 25, p.84-90. 2006.
- Kretser, D. Endocrinology of the male reproductive system. In: Arnold, A, Grossman, A, Carr, B, Teshoep, M, Chrousos, G, Gharib, H, De Groot, L, Goldfine, I, Hershman, JM, McLachlan, R, New, M, Rebar, R, and Vinik, A (Ed). Endotext.com. MDText.com, Inc, 2007.
- Lamminen, T. e I. Huhtaniemi. A common genetic variant of luteinizing hormone; relation to normal and aberrant pituitary-gonadal function. Eur J Pharmacol, v.414, n.1, Feb 23, p.1-7. 2001.
- Lapthorn, A. J., D. C. Harris, *et al.* Crystal structure of human chorionic gonadotropin. Nature, v.369, n.6480, Jun 9, p.455-61. 1994.
- Layman, L. C., E. J. Lee, *et al.* Delayed puberty and hypogonadism caused by mutations in the follicle-stimulating hormone beta-subunit gene. N Engl J Med, v.337, n.9, Aug 28, p.607-11. 1997.
- Layman, L. C., A. L. Porto, *et al.* FSH beta gene mutations in a female with partial breast development and a male sibling with normal puberty and azoospermia. J Clin Endocrinol Metab, v.87, n.8, Aug, p.3702-7. 2002.
- Lindstedt, G., E. Nystrom, *et al.* Follitropin (FSH) deficiency in an infertile male due to FSHbeta gene mutation. A syndrome of normal puberty and virilization but underdeveloped testicles with azoospermia, low FSH but high lutropin and normal

serum testosterone concentrations. Clin Chem Lab Med, v.36, n.8, Aug, p.663-5. 1998.

Lopez-Bigas, N., B. Audit, *et al.* Are splicing mutations the most frequent cause of hereditary disease? FEBS Lett, v.579, n.9, Mar 28, p.1900-3. 2005.

Maquat, L. E. Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics. Nat Rev Mol Cell Biol, v.5, n.2, Feb, p.89-99. 2004.

Matzuk, M. M., M. M. Spangler, *et al.* Mutagenesis and chimeric genes define determinants in the beta subunits of human chorionic gonadotropin and lutropin for secretion and assembly. J Cell Biol, v.109, n.4 Pt 1, Oct, p.1429-38. 1989.

Melmed, S. E. K., D. Anterior Pituitary. In: P. Larsen, Kronenber, Hm, Melmed, S, and Polonsky, Ks (Ed.). Williams Textbook of Endocrinology. Philadelphia: Saunders, 2003. Anterior Pituitary, p.177-279

Shiraishi, K. e K. Naito. Fertile eunuch syndrome with the mutations (Trp8Arg and Ile15Thr) in the beta subunit of luteinizing hormone. Endocr J, v.50, n.6, Dec, p.733-7. 2003.

Talmadge, K., N. C. Vamvakopoulos, *et al.* Evolution of the genes for the beta subunits of human chorionic gonadotropin and luteinizing hormone. Nature, v.307, n.5946, Jan 5-11, p.37-40. 1984.

Themmen, A. P. An update of the pathophysiology of human gonadotrophin subunit and receptor gene mutations and polymorphisms. Reproduction, v.130, n.3, Sep, p.263-74. 2005.

Themmen, A. P. N. e I. T. Huhtaniemi. Mutations of gonadotropins and gonadotropin receptors: elucidating the physiology and pathophysiology of pituitary-gonadal function. Endocr Rev, v.21, n.5, Oct, p.551-83. 2000.

Ulloa-Aguirre, A. e C. Timossi. Structure-function relationship of follicle-stimulating hormone and its receptor. Hum Reprod Update, v.4, n.3, May-Jun, p.260-83. 1998.

Valdes-Socin, H., R. Salvi, *et al.* Hypogonadism in a patient with a mutation in the luteinizing hormone beta-subunit gene. N Engl J Med, v.351, n.25, Dec 16, p.2619-25. 2004.

Walsh, P. S. M., D.A.; Higuchi, R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. Biotechniques, v.10, n.4, p.506-513. 1991.

Weiss, J., L. Axelrod, *et al.* Hypogonadism caused by a single amino acid substitution in the beta subunit of luteinizing hormone. N Engl J Med, v.326, n.3, Jan 16, p.179-83. 1992.

Xing, Y., Q. Wang, *et al.* Evolutionary divergence of exon flanks: a dissection of mutability and selection. Genetics, v.173, n.3, Jul, p.1787-91. 2006.

Estudo 3

Determinação da atividade da Luciferase: um novo método para medida in vitro de interação proteína-proteína.

RESUMO

O ensaio de glutationa-S-transferase (GST) “pull-down” é um dos principais métodos para análise “in vitro” de interações proteína-proteína. Este ensaio consiste em incubar uma proteína “isca” (fusionada ao GST e imobilizada em partículas pesadas) com uma proteína “presa” (radiomarcada). Se ocorrer interação entre as duas proteínas, ao centrifugarmos a amostra, a proteína “isca” será precipitada e trará junto a proteína “presa”. Em seguida, para avaliar a interação, realiza-se a análise do precipitado em SDS-PAGE que irá mostrar, por autoradiografia, a presença ou a ausência da proteína “presa”. Esse ensaio é de custo elevado, demorado e demanda uso de radioativo.

No presente estudo, nós desenvolvemos uma variação do teste de GST “pull down” que agiliza substancialmente o processo de detecção da “presa” no precipitado. O novo método consiste em fusionar a proteína “presa” com a enzima luciferase. A luciferase quando age sobre seu substrato, a luciferina, emite luz. Assim, a determinação do número de unidades de luz presente no precipitado representa a interação entre as proteínas. Para validar o ensaio, utilizamos as proteínas da família dos receptores nucleares, TR β 1 e RXR α , e sua conhecida capacidade de se interagir com o coativador da família P160 SRC-1 na presença de seus respectivos ligantes. Assim, GST-TR β 1 ou GST-RXR α foram incubados com SRC1a-LUC na ausência e na presença de T3 ou 9-cis RA, respectivamente. Nossos resultados confirmaram os demonstrados por ensaios de GST “pull down” clássico, ou seja, a adição de hormônio tireoidiano em doses crescentes aumentou a interação entre GST-TR β 1 com SRC1a-LUC e, de forma semelhante, GST-RXR α se interagiu fortemente com SRC1a-LUC somente na presença de 9-cis RA.

Além disso, observamos que 20 minutos de incubação entre isca e presa foram suficientes para que ocorra interação entre as diferentes proteínas. Ademais, esse método permite pesquisas de interações protéicas rápidas e em maior escala, pois ensaios realizados em microplacas de 96 poços teve eficiência semelhante à execução em tubos de microcentrifuga.

Assim, conclui-se que esse novo método é funcional e apresenta as seguintes vantagens sobre a metodologia convencional: 1) Diminui o tempo gasto para avaliação da interação proteínas de 16 a 52 horas para 50 a 70 minutos. 2) Dispensa o uso de proteínas radiomarcadas. 3) Reduz o custo financeiro.

Ademais, uma das aplicações direta desse novo teste é a sua utilização para a pesquisa de ligantes sintéticos ou derivados de extratos de plantas para receptores nucleares.

Abstract

The glutathione-S-transferase (GST) pull-down Assay is one of the main methods for analysis of protein-protein interactions "in vitro". This test consist in incubate a "bait" protein (merged the GST and immobilized heavy particles) with a "prey" protein (radiolabelled). If there is interaction between the two proteins, the protein "bait" will be precipitate by centrifugation and brings together the "prey" protein. Then, to evaluate the interaction the precipitate is analysed by SDS-PAGE which will show, by autoradioghrafy, the presence or absence of the "prey" protein. This test is slow and demand the use of radioactive.

In the present study, we developed a variation of GST pull down assay that substantially speeds up the process of the "prey" detection in the precipitate. The new method consists of Synthesize the "prey" protein fused to the enzyme luciferase. The luciferase when acting on its substrate, the luciferine, emits light. Thus, the determination of the number of light units present in the precipitate is direct proprportional to the interaction between proteins.

To validate the test, we use nuclear receptors, RXR α 1 and TR β 1, and their known ability to interact with the coactivator SRC-1 of the P160 family, in the presence of their respective ligands. Thus, GST-TR β 1 and GST-RXR α were incubated with SRC1a-LUC in absence and presence of T3 or 9-cis RA, respectively. Our results confirmed that the results observed by the classic GST "pull down", the addition of thyroid hormone in increasing doses increased the interaction between GST-TR β 1 with SRC1a-LUC and, in a similar way, GST-RXR α interacted strongly with SRC1a-LUC only in the presence of 9-cis RA.

Furthermore, we observed that 20 minutes of incubation between bait and prey were sufficient for the interaction between the proteins. In addition, this method allows searches of protein interactions fast and on a larger scale, because tests on microplate of 96 wells had similar efficiency searches in microcentrifuges tubes.

Thus, it is concluded that this new method is functional and has the following advantages over the conventional method: 1) Reduces the time spent for the evaluation of protein interaction of 16 to 52 hours for 50 to 70 minutes. 2) Waiving the use of radiolabeled. 3) Reduce the financial cost. Moreover, a direct application of this new method is its use for the discovery of nuclear receptors synthetic ligands or ligands derived from plants extracts.

3.1 INTRODUÇÃO

Atualmente, existem diversos métodos para análise *in vitro* de interações proteína-proteína. Um dos principais é o ensaio de glutathione-S-transferase (GST) “pull-down” (Craig, Ciuffo *et al.*, 2004). Este ensaio tem sido usado na identificação de novas interações entre proteínas parceiras ou para confirmar interações descobertas por outros métodos como: Ensaio de dois híbridos em leveduras ou “phage display” (Wada, Kito *et al.*, 1998; Wang, Sugita *et al.*, 2000; Malloy, Zhu *et al.*, 2001; Ren, Chang *et al.*, 2003). A versão mais comum do ensaio de GST “pull-down” utiliza uma proteína “isca” fusionada ao GST, expressa em bactérias e imobilizada em partículas de Sepharose™, e uma proteína “presa” radiomarcada sintetizada em sistemas de transcrição e tradução *in vitro*. Após incubação entre “isca” e “presa”, precipitações (pull-downs), lavagens, e eluição (ou desnaturação por calor), as proteínas recuperadas são analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida com sódio dodecilsulfato (SDS-PAGE) seguido de autoradiografia ou análise em “phosphorimager” (Guan e Dixon, 1991; Goodson, Farhoud *et al.*, 2007). A presença da proteína radiomarcada (“presa”) no gel de SDS-PAGE, e conseqüentemente na autoradiografia, indica que “isca” e “presa” se interagiram. A ausência indica que não houve interação (**Figura 3.1**).

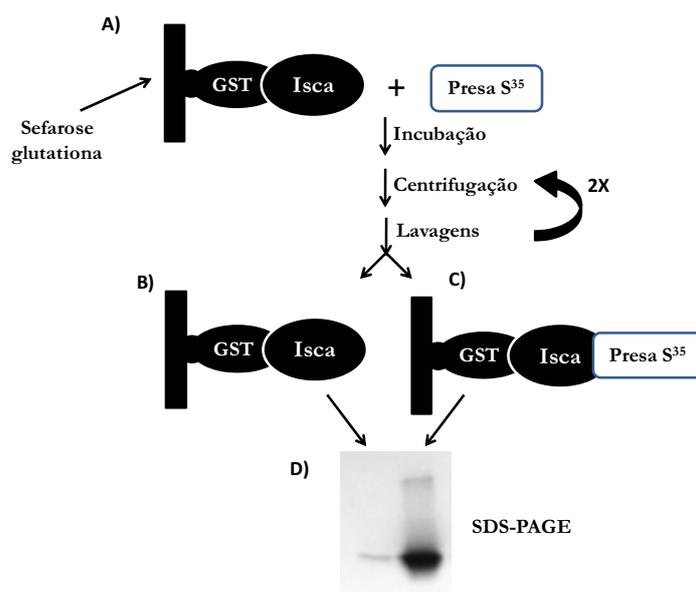


Figura 3.1, Ensaio de GST “pull down”. A) As proteínas “isca” e “presa” são sintetizadas em bactéria e *in vitro*, respectivamente, incubadas juntas em um tampão de ligação. A proteína “presa” (quadrado branco) esta marcada radioativamente. Após a incubação, a reação é precipitada e lavada 2-3X com tampão de ligação. B) Caso não haja interação a “presa” será eliminada pelas lavagens. C) Caso a isca se interaja com a presa esta ficará retida no precipitado D) Os precipitados são analisados em SDS-PAGE.

Este ensaio aproveita-se do método de purificação de proteínas fusionadas ao GST desenvolvido por Smith, D.S. e Johnson, K.S. em 1988 na Austrália (Smith e Johnson, 1988) para produção das proteínas “iscas”. Estes autores descrevem a construção dos primeiros plasmídeos da família pGEX onde seqüências de DNA poderiam ser clonadas “in frame” ao carboxi-terminal da proteína GST e expressas como proteína de fusão sob controle de um promotor induzível. Após cultura e indução das bactérias contendo as construções pGEX, as proteínas de fusão poderiam se rapidamente isoladas do lisado bacteriano pela adição de partículas de Sepharose™ conjugadas a glutationa (Smith e Johnson, 1988). Posteriormente, as proteínas de fusão ainda ligadas às partículas de Sepharose™ (“iscas”) foram misturadas a lisados de células ou tecidos para precipitar proteínas parceiras (“presas”). O uso desta metodologia para avaliações de interações protéicas foi consagrado pelos estudos do oncologista de Harvard Willian Kaelin que utilizou o sistema de GST “pull down” para indentificar os domínios de interação e proteínas parceiras da proteína supressora de tumor retinoblastoma (Eisenstein, 2005). Desde a publicação inicial de Smith, D.S. e Johnson, K.S em 1998 mais de 4000 artigos citaram o uso desta metodologia para purificação de proteínas (Eisenstein, 2005) e 757 citaram o uso para avaliações de interações protéicas.

Desde a sua consagração o GST “pull down” clássico foi modificado de várias maneiras: 1) A proteína “isca” pode ser expressa em outros sistemas (leveduras, células de insetos infectadas por baculovirus ou em células de mamíferos). 2) A proteína “presa” não precisa ser necessariamente radiomarcada, alternativamente, pode ser detectada por outras metodologias como “immunoblot” ou ELISA (Goodson, Farboud *et al.*, 2007). Entretanto, apesar das mudanças, todos esses métodos de detecção da interação entre a proteína “isca” e “presa” ainda continuam sendo laboriosos, demorados e caros. Além disso, o ensaio de GST “pull-down” é analisado por autoradiografia e para mensurar as diferenças de intensidade entre as bandas utiliza-se a

densitometria, um método que não tem boa acuracidade. Neste sentido, nós decidimos desenvolver uma nova metodologia relacionada ao ensaio de GST, mas mais eficiente no que se refere à rapidez, custo e confiabilidade. A idéia original foi de se fusionar a proteína “presa” a uma enzima que catalise uma reação enzimática rápida e de fácil detecção. Assim, a interação entre a proteína “presa” fusionada a enzima e a proteína “isca” fusionada ao GST poderia ser avaliada pela medida da atividade enzimática da “enzima-presas” precipitada pela “GST-isca”, pois nesse caso, a atividade enzimática é diretamente proporcional à interação.

A luciferase de vagalume (*Photinus pyralis*) foi escolhida como repórter enzimático da interação “isca”-“presa” devido a sua simples, rápida e sensível reação bioluminescente (Wood, 1990). A luciferase é uma proteína monomérica de 61kDa que catalisa a oxidação da luciferina em oxiluciferina e luz, utilizando ATP e Mg^{2+} como co-substratos (**Figura 3.2**). O mecanismo desta reação foi descrito pela primeira vez por em 1951 por William McElroy, (McElroy, 1951). A energia produzida nesta reação é liberada na forma de luz (Viviani, 2002; Day, Tisi *et al.*, 2004; Fraga, Esteves Da Silva *et al.*, 2004). Desta forma, quando o substrato estiver em excesso, quanto maior a concentração de luciferase presente na reação, maior será a emissão de luz pelo sistema.

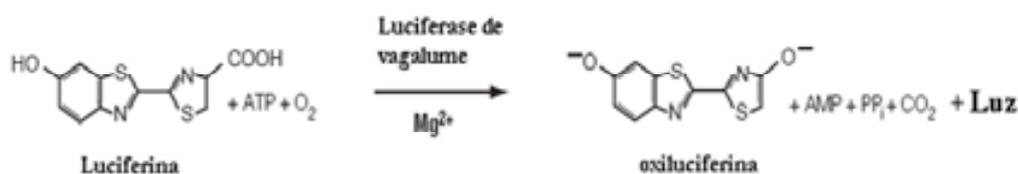


Figura 3.2, Reação catalizada pela luciferase.

A eficiência luminescente desta reação é inacreditavelmente próxima de 100%, ou seja, quase toda energia produzida é transformada em luz. Isto rendeu-lhe o nome de “luminescência fria”, nome que a distingue de outras fontes de luz como os bulbos das lâmpadas incandescentes e que possuem apenas 10% de eficiência luminescente (Babu, 2002). Esta eficiência torna a reação extremamente sensível, pois menos de 10^{-20} moles de luciferase,

menos de 10,000 moléculas por amostra, pode ser detectado em condições ótimas para a reação (Wood, 1991, 2007).

A primeira aplicação da reação catalisada pela luciferase foi na determinação da concentração de ATP em uma amostra biológica, pois a atividade enzimática é diretamente proporcional e dependente da concentração desta substância (Mcelroy e Deluca, 1983). Em 1985, o DNA complementar (cDNA) que codifica a luciferase foi clonado e primeiramente expresso em bactérias (De Wet, Wood *et al.*, 1985). Em 1987, o cDNA da luciferase foi utilizado como gene repórter em ensaios de transfecção em células de mamíferos. E observou-se que a luciferase é um gene reporter 1000 vezes mais sensível na monitoração da atividade transcricional de promotores gênicos que o gene repórter comumente utilizado na época, a cloranfenicol acetil transferase (De Wet, Wood *et al.*, 1987). Atualmente, esta é a principal aplicação da luciferase e de sua reação enzimática.

A luciferase foi utilizada também para monitorar a degradação de proteínas. Células de mamíferos foram transfectadas com um vetor codificando a uma proteína fusionada a luciferase, após 24 horas as células foram tratadas com um inibidor da síntese protéica, a ciclohexamida, e em seguida submetidas ao tratamento com diferentes substâncias. Pôde-se inferir o efeito dos tratamentos sobre a degradação da proteína medindo-se a atividade da luciferase na célula (Lonard, Tsai *et al.*, 2004).

Assim, no presente estudo nos avaliamos o uso da luciferase e sua reação enzimática para medir a interação entre proteínas. Para testar aplicabilidade da hipótese, utilizamos como ferramentas alguns membros da superfamília de receptores nucleares e suas conhecidas interações proteína-proteína. Os receptores nucleares são fatores de transcrição regulados por ligantes e participam de funções essenciais para homeostase, desenvolvimento e reprodução dos metazoários (Chambon, 1996; Apriletti, Ribeiro *et al.*, 1998; Beato e Klug, 2000; Zhang e Lazar, 2000). Em geral, os receptores nucleares possuem uma estrutura muito similar: um domínio amino-terminal, um domínio central de ligação ao DNA (DBD) e um domínio carboxi-terminal de ligação ao hormônio (LBD). O domínio amino-terminal é extremamente variável tanto no tamanho quanto na seqüência de aminoácidos e exibe uma função de ativação

transcricional independente do ligante (Warnmark, Treuter *et al.*, 2003). O DBD é o domínio mais conservado entre todos os receptores nucleares e tem como função principal a ligação ao DNA. O LBD é menos conservado que o DBD, refletindo a variedade de ligantes que atuam nesses receptores. Além da ligação ao hormônio, esse domínio é importante para a dimerização e para a interação dos receptores com complexos protéicos corretores necessários para sua atuação sobre a transcrição gênica (Wu, Xu *et al.*, 2001).

Para regular seus genes alvos, os receptores nucleares se ligam a seqüências específicas nos promotores modulando a expressão gênica. Ao ser ativado por seu ligante, o receptor nuclear muda sua conformação e através do domínio de ligação ao ligante (LBD) passa a se interagir com outras proteínas para iniciar o processo de regulação da transcrição. Uma das mais importantes famílias de proteínas que se interagem com os receptores nucleares são os coativadores de receptores esteróides p160 (SRC). Os Receptores nucleares recrutam os coativadores p160 quando são ativados pelos seus respectivos ligantes. Por sua vez, os coativadores se interagem com múltiplos complexos protéicos e ativam ou reprimem a transcrição gênica. (Glass e Rosenfeld, 2000; Leo e Chen, 2000; Lee, Lee *et al.*, 2001; Ordentlich, Downes *et al.*, 2001; Mckenna e O'malley, 2002; Lazar, 2003; Xu e Li, 2003).

Os coativadores p160 possuem vários domínios funcionais, como por exemplo, o domínio de interação com os receptores nucleares (NID) e dois domínios de ativação cuja função é recrutar outras proteínas auxiliares. Em um NID existem 3 motivos repetidos com a seqüência consenso LXXLL, chamado de NR box. Vários investigadores têm demonstrado que o motivo LXXLL é necessário e suficiente para interação dos coativadores p160 com os receptores nucleares (Moore, Galicia *et al.*, 2004).

No presente estudo nós utilizamos o receptor do hormônio tireoideano beta 1 (TR β 1) e o receptor X retinóide alfa (RXR α) como “iscas” fusionadas a GST e, como “presa”, o coativador de receptores esteróides-1a (SRC-1a) fusionado a luciferase, SRC-1-LUC. Nossos resultados demonstraram que a atividade enzimática da luciferase aumentou sistematicamente quando T3 foi adicionado à reação entre GST-TR β 1 e SRC-1-LUC. O mesmo resultado foi observado quando 9-cis RA foi adicionado ao GST-RXR α . Desta forma, a

medida da interação proteína-proteína em um ensaio de GST “pull-down” pode ser avaliada determinando-se a atividade da luciferase fusionada a “presa”. Além disso, esse padrão de resposta foi dose dependente.

3.2 OBJETIVO

Avaliar se a luciferase pode ser utilizada como repórter enzimático da interação proteína-proteína em um ensaio de GST “pull down”.

3.3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.3.1 – Plasmídeos

O vetores pCR3.1-SRC1a-LUC (Lonard, Tsai *et al.*, 2004) foi gentilmente doado por David M. Lonard e Bert W. O'Malley (Baylor College of Medicine, Houston, Tx). Este plasmídeo codifica o coativador SRC1a completo (“full length”) com a luciferase fusionada no C-terminal. pGEX-2T, pGEX-TR β 1 wild type, pGEX-RXR α e pGEX-TR β 1LBD (Feng, Ribeiro *et al.*, 1998), Pet28a e pGL3-basic foram doados pelo Dr. J. D. Baxter (University of California, San Francisco, CA).

3.3.2 - Produção da proteína “presa”

O vetor pCR3.1-SRC1a-LUC foi utilizado na Síntese “in vitro” das proteínas SRC1-LUC, através do kit “TNT T7 Quick Couple Transcription/Translation System” (Promega) seguindo as instruções do fabricante. Para confirmar se a proteína foi eficaz, utilizamos o ensaio de luciferase ou SDS-PAGE para o caso de proteínas radioativas.

3.3.3 - Produção da proteína “isca”

A proteína GST, e as proteínas de fusão GST-TR β 1 wild type, GST-TR β 1LBD e GST-RXR α foram sintetizadas utilizando-se protocolos convencionais (Amersham). Resumidamente, os plasmídeos foram transformados em *E. Coli* BL21, cultivada em meio 2xLB, recolhidas por centrifugação e ressuspendidas em tampão 1x TST (50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, and 0.05% Tween 20) com 1 mM DTT, 0.5 mM fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), e coquetel de inibidores de protease 1:1000 (Sigma, St. Louis, MO). Então, a solução foi incubada com lisozima e sonicada (três ciclos de 2.5-min, amplitude 70%, 1 pulso/s com intervalo de 5 min entre cada ciclo). O debris celular foi precipitado e o sobrenadante foi incubado por 2 h com 500 μ l de partículas de glutatione-agarose 4B equilibradas com 1 x TST.

As partículas com as proteínas de fusão foram lavadas com 1x TST adicionado de 0.05% Nonidet P-40 e ressuspensas em 1x TST com 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, coquetel de inibidores de protease 1:1000 (Sigma), 50% de glicerol, e então estocadas a -20°C. Todos os procedimentos descritos acima foram realizados a 4°C.

3.3.4 - Ensaio de GST “pull-down” (utilizando tubos de microcentrifuga)

Para os ensaios de interação proteína-proteína, a suspensão de partículas com glutathione contendo 4ug de GST ou GST-TR β 1/GST-RXR α foram incubadas com 3-5 ul da síntese “*in vitro*” de SRC1a-LUC em 150 ul de tampão de ligação [1x TST com 0.1% Nonidet P-40, 0.1% Triton X-100, 1 mM DTT, e 2 mg/ml Albumina soro bovina, pH 7.7, pH em que a atividade luciferase é máxima, (McElroy, 1951)], na presença de 1 μ M de T3, 1 μ M de GC-24, 1 μ M de GC-1, 1 μ M de TRIAC, 10 μ M de 9c-RA ou veículo (etanol). Após incubação a temperatura ambiente, as partículas da reação foram centrifugadas (500 rpm) e lavadas 3 vezes com 0,5 ml de tampão de ligação. Nas partículas, em 30ul de tampão de ligação deixados da última lavagem, a atividade da luciferase foi avaliada pela adição de 20ul de luciferina (luciferase assay system, Promega Corp.). A luz produzida foi quantificada em um luminômetro (TD 20/20, Turner) e os experimentos foram realizados em duplicatas ou triplicatas. Nos experimentos de comparação entre os diferentes métodos algumas reações foram analisadas em SDS-PAGE.

3.3.5 - Ensaio de GST “pull-down” (utilizando-se microplacas de 96 poços)

Para o ensaio de interação proteína-proteína em microplacas de 96 poços, as reações de “pull-down” foram preparadas de forma idêntica a descrita em (Ensaio de GST “pull-down” utilizando tubos de microcentrifuga). Após incubação em placas de 96 poços (wallac isoplateTM 1450-514), a temperatura ambiente, as partículas foram centrifugadas (500 rpm) e lavadas 6 vezes com 150 ul do tampão de ligação. O ensaio de luciferase foi realizado no

luminometro 1450 LSC e Luminescence counter (Perkin Elmer) com a injeção automática de 20ul de luciferina (luciferase assay system, Promega Corp.) antes de cada leitura. Neste caso, os experimentos foram realizados em quadruplicatas.

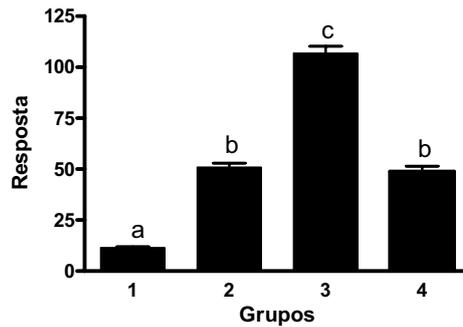
3.3.6 - Construção de um vetor para expressão de proteínas “presas” fusionadas a luciferase.

Com a finalidade de se expressar outras proteínas fusionadas a enzima luciferase foi construído o vetor de expressão Pet-LUCMCS. O gene que codifica a luciferase (LUC) do plasmídeo comercial pGL3 (promega) foi amplificado com os primers (LUC F 5'-ctgttgtaaagcttacatggaaga-3'e LUC R 5'-cgactctagaagcttcacggcgatct-3'). Na reação de amplificação foram utilizados 50ng do plasmídeo pGL3, 0,2 mM de cada desoxinucleotídeo (dNTP) , 50 ng de cada primer, 1,25 U da enzima Taq DNA polimerase (Fermentas), tampão de reação e sulfato de magnésio fornecido e usado de acordo com o sugerido pelo fabricante em um volume final de 50 µL. A amplificação foi realizada em um termociclador PTC-200 (MJ Research, Inc. Waltham, MA), nas condições: 30 ciclos de 60s a 94°C (desnaturação), 40 s a 55°C (anelamento) e 90s a 72°C (extensão). O produto de PCR foi digerido com Nco I e Hind III, e em seguida, clonado no vetor Pet28a (Novagen) preparado com as mesmas enzimas. As colônias de DH5α transformadas que cresceram em meio de cultura LB Agar com Kanamicina foram pesquisadas pela presença do gene LUC por PCR de colônia utilizando-se os mesmos primers LUC F e LUC R. Em seguida, um oligo dupla fita contendo múltiplos sítios de restrição, proveniente do anelamento dos primers (5'-AGCTTGGATCCGAATTCGAGCTCCGTCGACC-3' e 5'-TCGAGGTCGACGGAGCTCGAATTCGGATCCA-3'), foi clonado nos sítio Hind III e XHO I de um dos clones selecionados anteriormente pela PCR de colônia. A inserção do oligo foi confirmada pela digestão com as enzimas Bam HI e Eco RI, presentes apenas no oligo, e assim 6 clones foram selecionados. Os clones selecionados foram transformados em BL21SITM (Invitrogen) para se testar a capacidade de expressar a atividade luciferase. Bactérias BL21SITM

transformadas foram crescidas em 5ml de meio de cultura LBON com kanamicina de acordo com o recomendado pelo fabricante. Ao atingirem a OD⁶⁰⁰ de 0.5 as culturas foram divididas em duas alíquotas de 2,5ml. Um das alíquotas foi induzida com NaCl estéril (concentração final de 0,3M) e a outra com água estéril (veículo). Após duas horas de incubação a 30°C as bactérias foram coletadas e lisadas como descrito em produção da proteína “isca”, apenas o passo de sonicação foi alterado (dois ciclos de 15s, amplitude 70%, 1 pulso/s com intervalo de 5 min entre cada ciclo). Em seguida, 20ul de luciferina foi adicionado a 20ul do sobrenadante do lisado celular e a atividade luciferase foi avaliada em um luminômetro TD 20/20, Turner. As leituras da atividade luciferase foram corrigidas com a OD⁶⁰⁰ da cultura celular antes da lise. Dos 6 clones selecionados apenas 2 apresentaram atividade luciferase (**Figura 3.10**). O vetor que apresentou a maior leitura foi selecionado e seqüenciado com os primers “T7” (5'-GTAATACGACTCACTATAGGG-3') e “T7 terminator” (5'-TATGCTAGTTATTGCTCAG-3') do vetor.

3.3.7 - Apresentação dos dados e Análise estatística

As interações observadas foram representadas como média ± erro padrão da % da atividade precipitada ou da % precipitada (% do input) em cada reação. A análise estatística utilizada nos experimentos foi análise de variância seguida do teste de tukey. Os resultados foram considerados estatisticamente diferentes quando o valor de p foi < 0,05. E as diferenças ou semelhança estão representadas na forma de letras sobre as barras. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes e letras idênticas significam ausência de diferença estatística. O exemplo abaixo ilustra este tipo de representação:



As diferentes letras sobre as barras indicam que o grupo 1 é estatisticamente diferentes dos grupos 2, 3 e 4. O Grupo 2 é estatisticamente diferentes dos grupos 1 e 3, mas não é diferente do grupo 4. O grupo 3 é estatisticamente diferentes dos grupos 1, 2 e 4. E o grupo 4 é estatisticamente diferentes dos grupos 1 e 3 mas não é diferente do grupo 2.

3.4 RESULTADOS

3.4.1 - Detecção de interações proteína-proteína em ensaio de GST “pull-down” utilizando a enzima luciferase como reporter.

Para testar a hipótese de que a interação entre as proteínas “isca-presa” no ensaio de GST “pull-down” poderia ser avaliada detectando-se a atividade luciferase fusionada à proteína “presa”, testamos a capacidade do domínio de ligação ao hormônio do TR β 1 (TR β 1LBD) de se interagir e fazer a precipitação do SRC1a fusionado a luciferase. GST e GST-TR β 1LBD foram sintetizados em *E.coli*, SRC1a-LUC foi sintetizado “*in vitro*” e as reações de “pull-down” seguido pelo ensaio de luciferase foram executados de acordo com o descrito em materiais e métodos. Como podemos observar na **Figura 3.3**, GST isoladamente, sem TR β 1LBD, tanto na ausência quanto na presença de T3, precipitou uma atividade de luciferase muito baixa [$1,4\pm 0,4\%$ e $1,0\pm 0,1\%$ respectivamente, ($p>0,05$), demonstrando que GST isoladamente não é capaz de interagir com SRC1a-LUC. Ao acrescentarmos GST-TR β 1LBD, ainda na ausência de T3, observamos um aumento discreto para $6,8\pm 0,6\%$ ($P<0,05$), sugerindo uma atividade intrínseca, e T3 independente, do TR se interagir com

SRC1a-LUC. Porém, ao adicionarmos 1 μM de T3, observamos um aumento significativo da atividade da luciferase, valor arbitrariamente selecionado como 100% ($p < 0.001$).

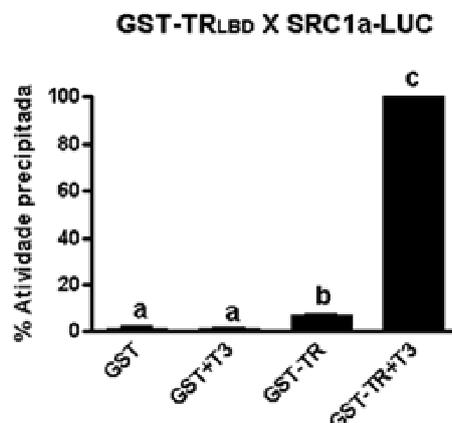


Figura 3.3, Experimentos de GST “pull-down” examinando a ligação do coativador SRC1a-LUC ao GST-TR β 1LBD (GST-TR). SRC1a-LUC foi incubado com GST (controle) ou com GST-TR β 1LBD, na ausência ou na presença de 1 μM de T3, a temperatura ambiente. A atividade da luciferase foi avaliada após incubação de 100 minutos. O resultado obtido foi uma maior produção de luz com GST-TR β 1LBD na presença de T3, o que sugere uma maior interação com SRC1a-LUC nestas condições. As letras diferentes sobre as barras indicam a diferença estatística ($p < 0.05$) de acordo com ANOVA e teste de Tukey.

Em seguida, testamos o ensaio com outro receptor nuclear. Apesar do GST-TR β 1LBD, o GST-RXR α foi usado como “isca” em ensaios de interação com SRC1a-LUC. Observamos novamente que GST isoladamente, tanto na ausência quanto na presença de 9c-RA, precipitou uma atividade de luciferase muito baixa [$2,3 \pm 0,6\%$ e $6,4 \pm 1,4\%$, respectivamente ($p > 0,05$)]. GST-RXR α , ainda na ausência de 9c-RA, apresentou um aumento discreto para $9,3 \pm 3\%$, não significativo, de se interagir com SRC1a-LUC. Porém, ao adicionarmos 10 μM de 9c-RA, observamos um aumento significativo da atividade da luciferase, valor arbitrariamente selecionado como 100% ($p < 0.001$) (**Figura 3.4**).

Juntos estes resultados sugerem que os receptores testados foram capazes de se interagir com SRC1a-LUC de forma ligante dependente e as interações puderam ser detectadas avaliando-se a atividade luciferase fusionada a este coativador. Estes resultados foram reproduzíveis, GST apresenta valores de fundo baixos, e resultados similares foram obtidos com GST-TR β 1 completo e também com os tireomiméticos TRIAC e GC-1 (dados não mostrados).

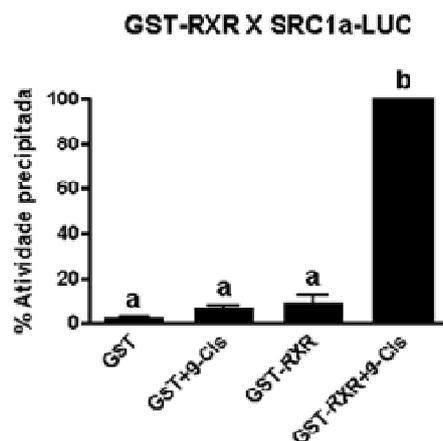


Figura 3.4- Experimentos de GST “pull-down” examinados a interação entre SRC1a- e GST-RXR α “full length”. SRC1a-LUC foi incubado com GST (controle) ou GST-RXR α na presença de veículo (-) ou 10 μ M de 9c-RA. A atividade enzimática da luciferase foi avaliada após 100 min de incubação entre as proteínas. Maiores valores de atividade luciferase foram precipitados pelo GST-RXR α na presença de 9c-RA. As diferentes letras sobre as barras indicam diferença estatística ($p < 0.05$) de acordo com ANOVA e teste de Tukey.

Em seguida, para melhorarmos o desempenho do novo método, decidimos avaliar qual seria o tempo de incubação ótimo para a melhor interação entre GST-TR β 1LBD e SRC1a-LUC na presença de 1 μ M de T3. Os tempos de incubação avaliados foram 0, 5, 10, 20, 40, 60, 80 e 100 minutos. Neste experimento, observamos que de 0 a 20 minutos a atividade luciferase precipitada aumentou gradativamente, entre 20 e 40 minutos permaneceu em um platô (atividade máxima), e a partir do minuto 60 até o minuto 100 diminuiu gradativamente. As atividades enzimáticas precipitadas foram: 0 min. [26,5 \pm 2% ($p < 0,05$ vs 20 e 40 min)], 5 min. [58,4 \pm 3% ($p < 0,05$ vs 20 e 40 min)], 10 min. [69,4 \pm 6% ($p < 0,05$ vs 20 e 40 min)], 20 min. [95,8 \pm 4% ($p > 0,05$ vs 40 min)], 40 min. [97,1 \pm 1% ($p > 0,05$ vs 20 min)], 60 min. [85,1 \pm 4% ($p > 0,05$ vs 20 e 40 min)], 80 min. [74,3 \pm 5% ($p < 0,05$ vs 20 e 40 min)], 100 min. [66,5 \pm 4% ($p < 0,05$ vs 20 e 40 min)] (**Figura 3.5**).

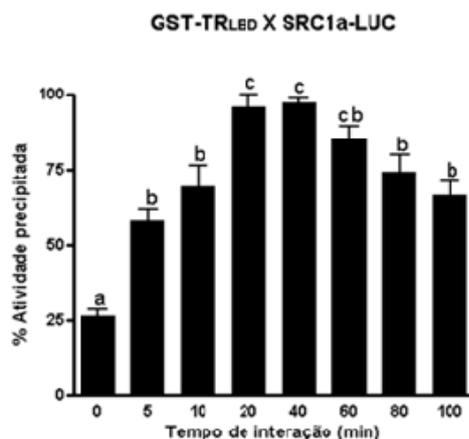


Figura 3.5, Experimento avaliando a influência do tempo de incubação sobre a interação do GST-TR β 1LBD com SRC1a-LUC. SRC1a-LUC foi incubado com GST-TR β 1LBD na presença de 1 μ M de T3 a temperatura ambiente. A atividade luciferase precipitada na reação foi avaliada após 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 minutos de incubação. As letras diferentes sobre as barras indicam a diferença estatística ($p < 0.05$) de acordo com ANOVA e teste de Tukey.

Diante deste resultado testamos a estabilidade da presa ao longo do tempo (meia-vida), para isto, preparamos diferentes reações contendo somente SRC1a-LUC e tampão de ligação, as incubamos por diferentes períodos de tempo e contamos as unidades relativas de luz produzida pela amostra. Observamos que atividade luciferase diminuía ao longo do tempo como pode ser observado na **Figura 3.6**. As leituras foram 0 min. (100%), 20 min. [98 \pm 2% ($p > 0,05$)], 30 min. [92 \pm 1% ($p > 0,05$)], 40 min. [77 \pm 0,01% ($p < 0,05$)], 60 min. [81 \pm 1 % ($p < 0,05$)], 100 min. [62 \pm 4% ($p < 0,05$)], 120 min. [52 \pm 1% ($p < 0,05$)] (**Figura 3.6**). Assim, após duas horas de incubação a atividade luciferase decaiu em aproximadamente 50% comparado com o valor inicial. Concluimos, então, que esta é a meia-vida da enzima neste tipo de experimento.

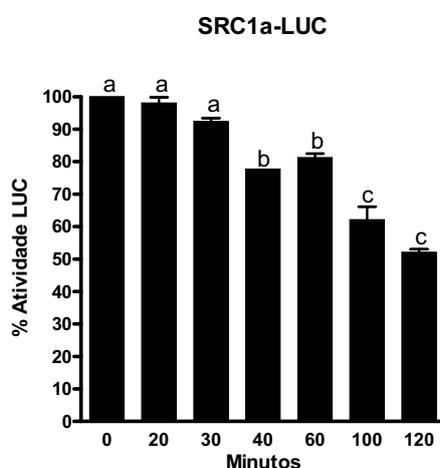


Figura 3.6, Experimento avaliando a influência do tempo de incubação sobre a atividade enzimática da presa. Diferentes reações contendo 3ul da síntese “in vitro” de SRC1a-LUC e 30ul de tampão de ligação foram incubados a temperatura ambiente. A atividade luciferase de cada reação foi avaliada após 0, 20, 30, 40, 60, 100 e 120 minutos de incubação. As letras diferentes sobre as barras indicam a diferença estatística ($p < 0.05$) de acordo com ANOVA e teste de Tukey.

Diante do resultado de que a interação máxima entre GST-TR β 1LBD e SRC1a-LUC ocorre entre 20-40 minutos (**Figura 3.5**) e que até 20 minutos a atividade enzimática da presa permanece estatisticamente semelhante a inicial, ou seja, praticamente inalterada (**Figura 3.6**) decidimos padronizar o tempo de incubação em 20 minutos para os experimentos subseqüentes, o que aumentou ainda mais a velocidade do processo denominado a partir de agora como GST “light pull-down”.

Em seguida, comparamos o ensaio de GST “light pull-down” com o ensaio GST “pull-down” clássico. Para isto GST e GST-TR β 1LBD foram sintetizados em *E.coli*, SRC1a-LUC foi sintetizado “in vitro” na presença de metionina marcada com S³⁵. Após as reações de “pull-down” o ensaio de luciferase foi executado e, em seguida, as mesmas amostras foram analisadas por SDS-PAGE seguido de autoradiografia. Neste experimento a representação gráfica corresponde a % da presa precipitada, ou seja, % do “input” precipitado, para facilitar comparações com o método clássico. A **Figura 3.7A** representa a quantidade de luz produzida pelas amostras e podemos observar que GST isoladamente, tanto na ausência quanto na presença de T3, precipitou apenas 0,16% e 0,12% do total de SRC1a-LUC, respectivamente. Por outro lado, GST-TR β 1LBD na ausência de T3 apresentou um aumento discreto na % precipitada (1,34%). No entanto, ao adicionarmos 1 μ M de T3, observamos que a % precipitada aumentou para 21,83% indicando uma maior interação. Após a leitura da atividade LUC as amostras foram analisadas em SDS-PAGE seguido de autoradiografia. A **Figura 3.7B** representa o resultado desta análise e podemos observar que existe uma correlação entre a intensidade das bandas e a atividade LUC das amostras, indicando que novo ensaio possui eficácia semelhante ao ensaio de GST “pull-down” clássico.

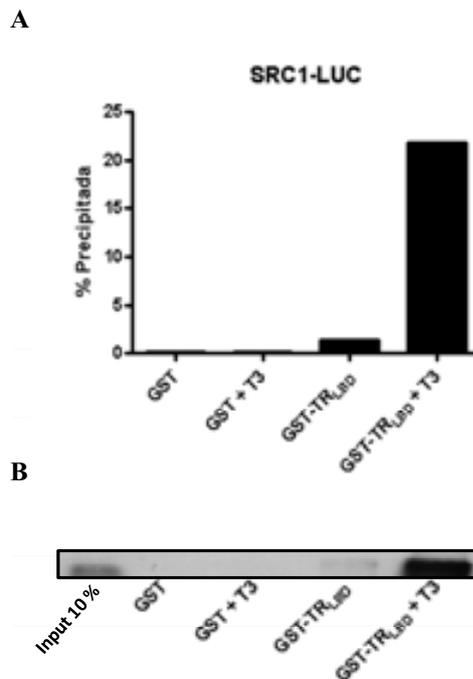


Figura 3.7- Experimentos comparando a metodologia de GST “light pull-down” com GST “pull-down” clássico. A Ensaio examinado a interação entre SRC1a e GST-TR β 1LBD. SRC1a-LUC (S^{35}) foi incubados com GST (controle) ou GST-TR β 1LBD na presença de veículo (-) ou $1\mu\text{M}$ de T3. A atividade enzimática da luciferase foi avaliada após 20 min de incubação entre as proteínas. **A)** Leitura da atividade luciferase observadas na interação representada com % da quantidade inicial precipitada (%input). **B)** As mesmas amostras foram analisadas em SDS-PAGE seguido de autoradiografia. Podemos observar que maiores valores tanto da atividade luciferase quanto a quantidade de proteína radiomarcada foram precipitadas pelo GST-TR β 1LBD na presença de T3.

Finalmente, para finalizar a validação do método, investigamos o efeito de concentrações crescentes dos ligantes sobre a interação de GST-TR β 1LBD/GST-RXR e SRC1a-LUC. Observamos que nas duas situações a titulação produziu um recrutamento do coativador de forma T3/9cis-RA dose dependente. Pois, doses crescentes dos ligantes promoveram um aumento gradual e progressivo das atividades enzimáticas precipitadas tanto por GST-TR β 1LBD quanto por GST-RXR (**Figura 3.8**). Nas curvas obtidas o EC50 para T3 e 9cis-RA foram $1,0 \times 10^{-7}\text{M}$ e $1,1 \times 10^{-6}\text{M}$, respectivamente.

Juntos, estes resultados confirmam que a interação entre as proteínas “isca” e “presa” nos experimentos de GST “light pull-down” pode ser detectada avaliando-se a atividade da luciferase fusionada a presa.

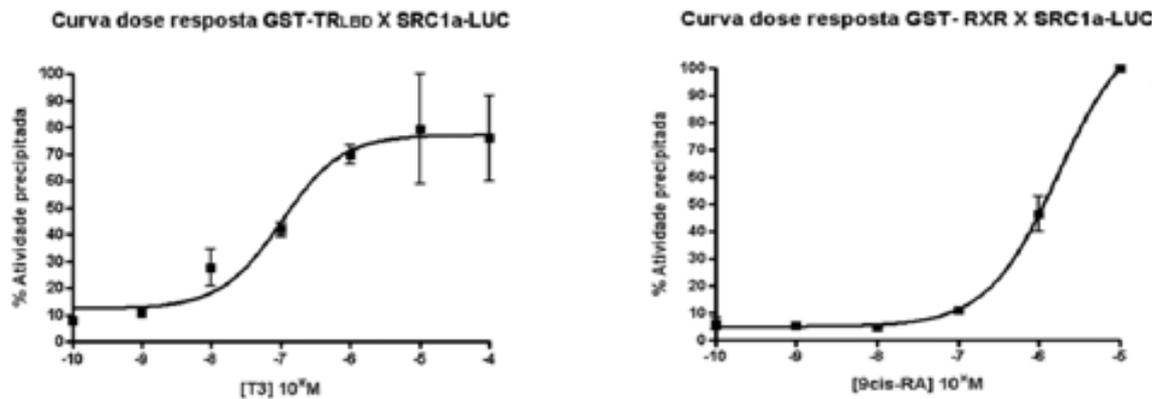


Figura 3.8, A) Experimentos de GST “light pull-down” examinando a interação de SRC1a-LUC com GST-TR β 1LBD em concentrações crescentes de T3. SRC1a-LUC foi incubado com GST-TR β 1LBD na presença de 0, 10⁻⁹, 10⁻⁸, 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵, 10⁻⁴ M de T3. A atividade luciferase foi avaliada após 20 minutos de incubação. Os resultados revelaram que a atividade luciferase aumentou de maneira T3 dose dependente e o EC50 foi de 1,0x10⁻⁷. **B)** Experimentos de GST “light pull-down” examinando a interação de SRC1a-LUC com GST-RXR em concentrações crescentes de 9cis-RA. SRC1a-LUC foi incubado com GST-RXR na presença de 0, 10⁻⁹, 10⁻⁸, 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵ M de 9cis-RA. A atividade luciferase foi avaliada após 20 minutos de incubação. Os resultados revelaram que a atividade luciferase aumentou de maneira 9cis-RA dose dependente e o EC50 foi de 1,1x10⁻⁶.

3.4.2 - GST light pull-down em microplacas de 96 poços.

Para aumentarmos a escala de interações protéicas estudadas simultaneamente pelo ensaio GST “light pull-down”, adaptamos sua execução para microplacas de 96 poços. Para validar este formato do ensaio, testamos a interação de GST-TR β 1LBD com SRC1a-LUC na presença de T3 e do tireomiético GC-24. O procedimento do ensaio de GST “light pull-down” em microplacas de 96 está descrito em materiais e métodos. Observamos que, GST isoladamente demonstrou uma interação com SRC1a-LUC muito baixa, pois a atividade enzimática da luciferase foi mínima tanto na presença quanto na ausência dos ligantes testados [GST (2,9±0,6%), GST+T3 (2,9±0,5%), GST+GC-24 (2,8±0,5%), (p>0,05)] (**Figura 3.9**). Para GST-TR β 1LBD, ainda na ausência de T3, a atividade intrínseca do TR se interagir com SRC1a-LUC foi novamente observada [12±2% (p<0,05)]. Entretanto, ao acrescentarmos 1 μ M, GST-TR β 1LBD a atividade luciferase precipitada foi significativamente maior [100% (p<0,001)]. O mesmo foi observado com a adição de 1 μ M de GC-24

[81±3% (p<0,001)], comparado com a ausência de ligantes (**Figura 3.9**). Comparando T3 com GC-24, observamos que o valor precipitado por GST-TRβ1LBD na presença de GC-24 (81±3%) foi estatisticamente menor que o observado na presença T3 (100%) (p<0,001). Estes resultados sugerem que o ensaio GST “light pull-down” executado em placas de 96 poços tem eficiência similar ao ensaio executado em tubos de microcentrifuga.

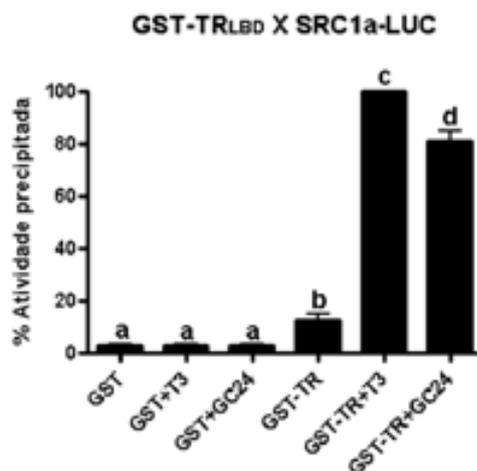


Figura 3.9, Experimentos de GST “Light pull-down” examinando a interação entre SRC1a-LUC ao GST-TRβ1LBD em microplacas de 96 poços. SRC1a-LUC foi incubado com GST (controle) ou GST-TRβ1LBD na presença de veículo ou 1 μM of T3 ou GC-24. A atividade enzimática da luciferase foi avaliada após 20 min de incubação entre as proteínas. Maiores valores de atividade luciferase foram precipitadas pelo GST-TRβ1LBD na presença de T3 ou GC-24, o que sugere uma maior interação com SRC1a-LUC nestas condições. As diferentes letras sobre as barras indicam diferença estatística (p<0.05) de acordo com ANOVA e teste de Tukey.

3.4.3 - Construção do vetor “Pet-28aLUC-MCS” para expressão de proteínas “presas” fusionadas a luciferase

Um vetor para expressão de proteínas fusionadas a luciferase para execução do ensaio GST “light pull-down” com outras proteínas tornou-se necessário. Escolhemos o vetor pet28a devido sua capacidade de expressar proteínas tanto em bactérias quanto em sistemas de transcrição e tradução *in vitro*. E se necessário, purificá-la através da cauda de histidina (6XHIS) presente no vetor. A clonagem do gene LUC e de um sítio múltiplo de clonagem (MCS) neste vetor está descrito em materiais e métodos. Os clones selecionados foram testados funcionalmente para expressão da enzima

luciferase (**Figura 3.10**) e em seguida um deles (o clone 5), que apresentou maior expressão da proteína, foi seqüenciado (**Figura 3.11**).

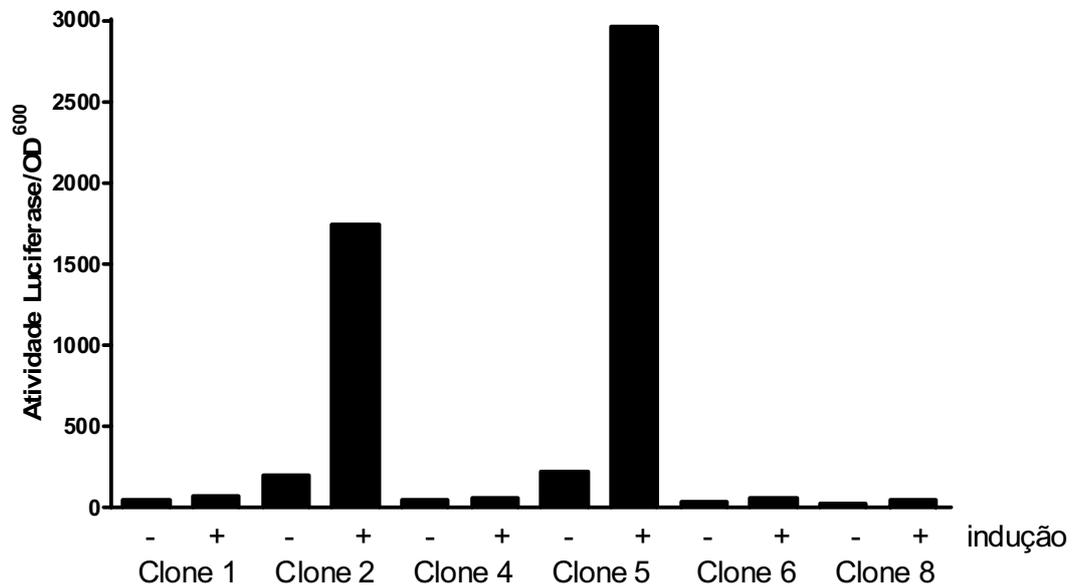


Figura 3.10, Seleção funcional dos clones para expressão de proteínas de fusão com a luciferase. A clonagem do gene LUC seguida da clonagem do MCS resultou em 8 clones sendo que apenas 6 (1,2,4,5,6 e 8) foram selecionados pela digestão com enzimas presentes no MCS (Bam HI e Eco RI). Dos 6 apenas o clone 2 e o clone 5 foram capazes de produzir a luciferase. O clone 5, que apresentou a maior capacidade de produção de atividade enzimática, foi seqüenciado.

A)

1 TGTGAGCGGA TACAATTCC CCTCTAGAAA TAATTTTGTT TAACTTTAAG

51 AAGGAGATAT ACCACATGGA AGACGCCAAA AACATAAAGA AAGGCCCGGC

M E D A K N I K K G P A Frame 1

101 GCCATTCTAT CCGCT

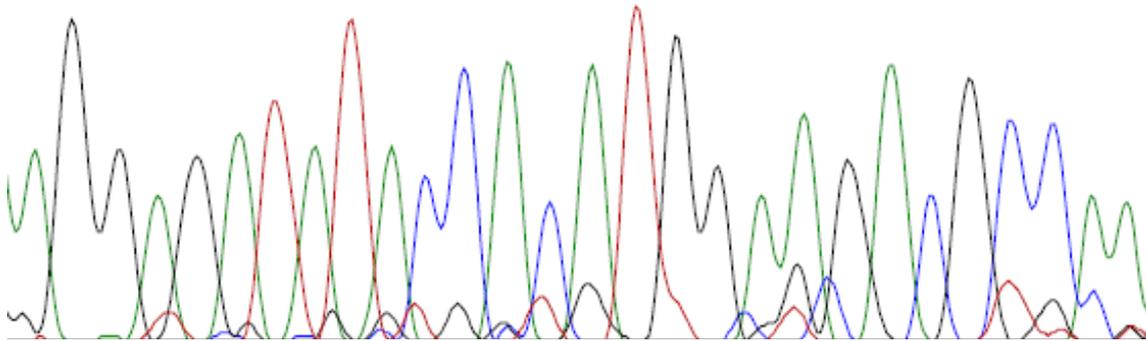
P F Y P

B)

Pet28a

LUC

A G G A G A T A T A C C A C A T G G A A G A C G C C A A



C)

```

1  GAACTTCCCG CCGCCGTTGT TGT TTTGGAG CACGGAAAGA CGATGACGGA
  E L P A A V V V L E H G K T M T E      Frame 1
  N F P P P L L F W S T E R R * R K      Frame 2

51 AAAAGAGATC GTGGATTACG TCGCCAGTCA AGTAACAACC GCGAAAAAGT
   K E I V D Y V A S Q V T T A K K L      Frame 1
   K R S W I T S P V K * Q P R K S      Frame 2

101 TGCGCGGAGG AGTTGTGTTT GTGGACGAAG TACCGAAAGG TCTTACCGGA
    R G G V V F V D E V P K G L T G      Frame 1
    C A E E L C L W T K Y R K V L P E      Frame 2

151 AAACTCGACG CAAGAAAAAT CAGAGAGATC CTCATAAAGG CCAAGAAGGG
   K L D A R K I R E I L I K A K K G      Frame 1
   N S T Q E K S E R S S * R P R R A      Frame 2

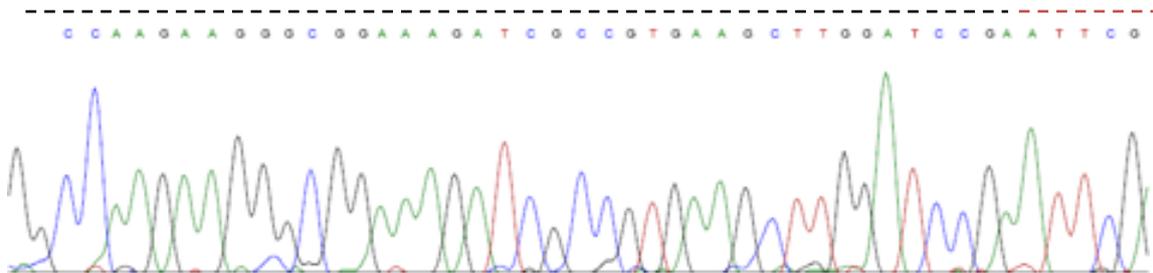
                                     XhoI
                                     SmlI
                                     SacI
                                     BmeT110I
                                     NlaIV Tsp509I Sali AvaI
                                     BamHI EcoRI EcoICRI HincII
                                     HindIII ApoI BanII AccI PspXI
201 CGGAAAGATC GCCGTGAAGC TTGGATCCGA ATTCGAGCTC CGTCGACCTC
   G K I A V K L G S E F E L R R P R      Frame 1
   E R S P * S L D P N S S S V D L      Frame 2

251 GAGCACCACC ACCACCACCA CTGAGATCCG GCTGCTAACA AAGCCCCGAAA
   A P P P P P L R S G C * Q S P K      Frame 1
   E H H H H H H * D P A A N K A R K      Frame 2

```

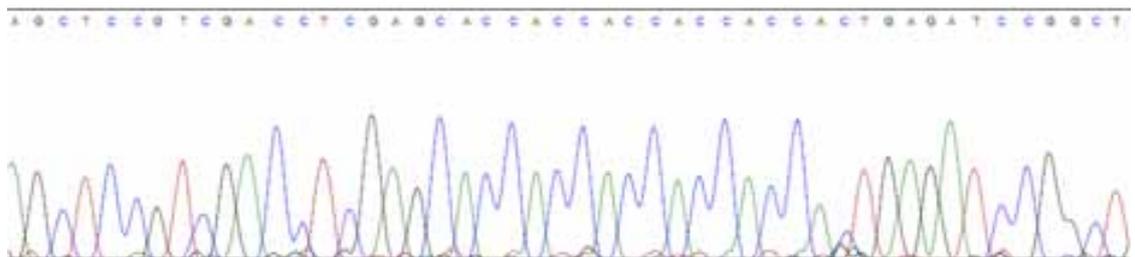
D)

LUC



MCS

Pet28a



E)

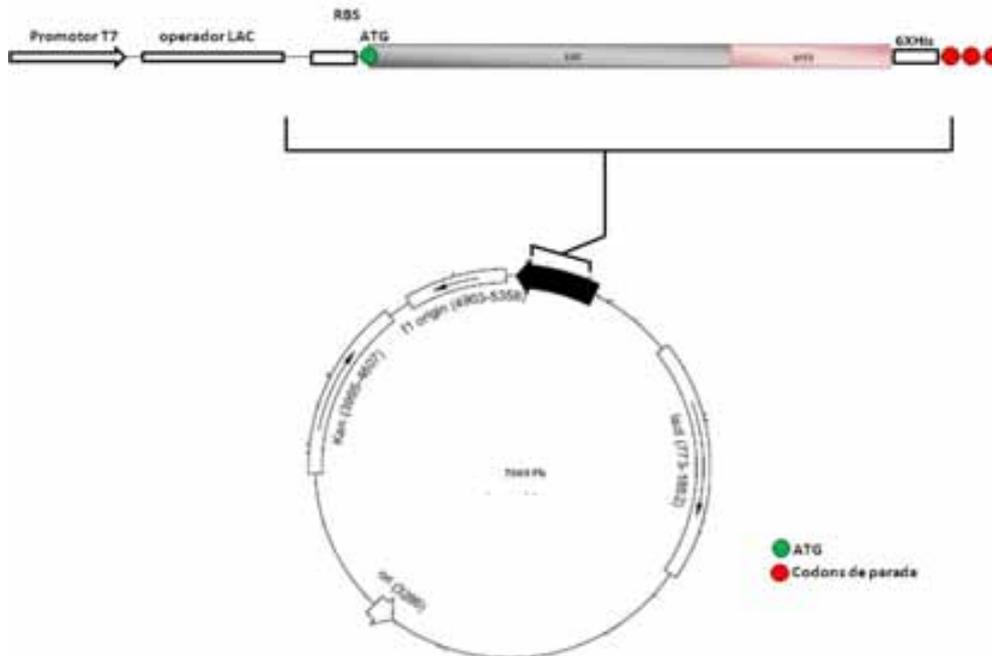


Figura 3.11, Sequenciamento das regiões onde foram clonados o gene LUC e um MCS no vetor Pet28a originando a plasmídeo Pet28a-LUCMCS para construção e expressão de proteínas “presas” fusionadas a enzima luciferase, e subsequente uso em ensaios de GST “light pull-down”. A) Sequenciamento da região vetor-inserto 5’ onde pode-se observar a seqüência do vetor Pet28a (laranja) seguido da seqüência do cDNA do gene LUC (preto) amplificada a partir do vetor pGL3-basic (promega). Abaixo da seqüência de nucleotídeos estão representadas os aminoácidos codificados pelo cDNA do gene LUC e as regiões sublinhadas correspondem a seqüências do operador LAC (nucleotídeos 1-18) e do sítio de ligação do ribossomo (nucleotídeos 51-56) do vetor, respectivamente. B) Eletroferograma parcial da região descrita em (A) que contém exatamente a junção vetor-inserto 5’. C) Sequenciamento da região vetor-inserto 3’ onde pode-se observar seqüências do cDNA do gene LUC (preto), do sítio múltiplo de clonagem [MCS (vermelho)], e em seguida, do vetor Pet28a (laranja). Abaixo da seqüência de nucleotídeos estão representadas os aminoácidos codificados pelos quadros de leitura 1 e 2 do cDNA do gene LUC, acima estão representados os sítios de restrição do MCS. Os códons de parada da tradução estão representados por um asterisco (*). É importante ressaltar que o gene LUC e a cauda de histidina do vetor (6XHis) não estão no mesmo quadro de leitura. Caso pretenda-se purificar a proteína fusionada à luciferase é imprescindível colocá-los no mesmo quadro de leitura no momento da clonagem da seqüência que codifica proteínas de interesse neste vetor. D) Eletroferograma parcial da região descrita em (C) que contém exatamente a junção vetor-inserto 5’. E) Mapa completo do vetor Pet28a-LUCMCS.

3.5 DISCUSSÃO

Neste estudo descrevemos um ensaio modificado de GST “pull-down” que tem como objetivo identificar e medir a interação entre duas proteínas. Nesse novo método, uma proteína “isca” fusionada ao GST (GST-isca) é incubada com uma proteína “presa” fusionada a luciferase (LUC-presas). Se houver interação entre as duas proteínas, a simples centrifugação da proteína GST-isca, imobilizada por partículas pesadas de Sepharose™, precipitará junto a proteína presa (LUC-presas). Em seguida, para se detectar a presença da LUC-presas no precipitado, adicionamos luciferina (substrato da luciferase) e quantificamos luz produzida pela reação em um luminômetro. A atividade luciferase retida pela isca é diretamente proporcional a quantidade de LUC-presas no precipitado.

A aplicabilidade do método foi validada através da medida da interação já bem estabelecida entre os receptores nucleares com os coativadores da família p160. As proteínas utilizadas foram os receptores nucleares TR β 1 e RXR α e o coativador p160, SRC-1A. O novo método reproduziu os dados já descritos na literatura, ou seja, a interação do TR β 1 com SRC-1a ocorreu principalmente na presença de T3, ou de outros tiromiméticos, e a interação do RXR α com SRC-1a ocorreu somente na presença de 9-cis RA.

O uso da enzima luciferase nessa nova metodologia de mensuração de interação entre duas proteínas traz grandes vantagens como: redução do tempo de reação, diminuição do custo, não utilização radioisótopos e facilidade na execução do ensaio. A versão clássica do ensaio de GST “pull-down” compreende incubar a “isca” ligada ao GST com a “presa” radiomarcada por aproximadamente 100 minutos, seguido de precipitações, lavagens, desnaturação (ou eluição), análise em SDS-PAGE e autoradiografia. O tempo utilizado neste procedimento é de aproximadamente 16 a 52 horas. O uso da “Presas” ligada a luciferase diminui o tempo total utilizado no ensaio para 50 a 70 minutos. Isso ocorre devido a redução do tempo de incubação para 20 minutos e, principalmente porque o novo método substitui a análise em SDS-

PAGE e a autoradiografia pelo ensaio de luciferase (**Figura 3.12**). A principal motivação para redução do tempo de incubação para 20 minutos foi que as maiores interações entre isca e presa são observadas entre 20-40 minutos e que até 20 minutos praticamente não há decaimento da atividade luciferase da presa (**Figura 3.5 e 3.6**).

Ademais, o novo ensaio foi comparado com o ensaio clássico e observamos que apresentaram resultados semelhantes, demonstrando que o GST “light pull-down” é tão eficiente quanto o GST “pull-down” para avaliar qualitativamente interações protéicas, pois existe uma correlação entre a atividade enzimática e SRC1A-LUC(S³⁵) precipitadas (**Figura 3.7 A e B**).

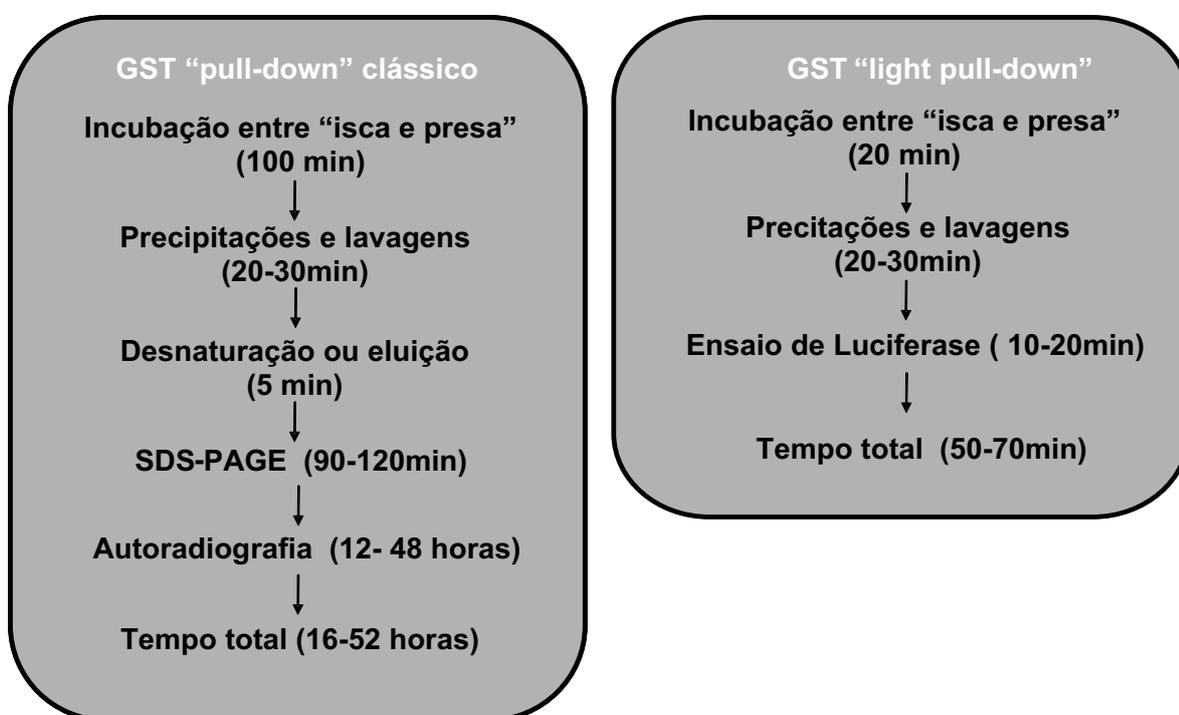


Figura 3.12, Fluxograma representando os passos e o tempo gasto no ensaio de GST “pull-down” clássico e GST “light pull-down”. No ensaio GST “pull-down” clássico gasta-se aproximadamente 15,4 a 52 horas na sua execução, já no ensaio de GST “light pull-down” gasta-se aproximadamente 50-70 min.

Outra vantagem do método é a possibilidade de fazer inferências quantitativas dos resultados, pois o recrutamento de SRC1a pelo TR β 1 e pelo RXR α foi claramente dose dependente, produziram curvas de aspecto sigmóide, indicando uma relação entre dose e proporção da resposta (interação entre as proteínas) e, conseqüentemente, que análises quantitativas

e/ou cinéticas podem ser feitas a partir da atividade da luciferase observada. Por exemplo, nos ensaios de curva dose resposta observamos que a afinidade do T3 pelo TR β 1 é 10 vezes maior que o 9c-RA pelo RXR α ($EC_{50}^{T3}=1,0 \times 10^{-7}M$ versus $EC_{50}^{9c-RA}=1,1 \times 10^{-6}M$). Dados da literatura que indicam que a afinidade do TR β pelo T3 é realmente 10 vezes maior do que a do RXR α pelo o 9-cis RA, $K_d^{RXR^{9c-RA}} = 1.5 \text{ nM}$ (Egea, Mitschler *et al.*, 2000) versus $K_d^{TR\beta T3} = 0,16 \text{ nM}$ (Togashi, Nguyen *et al.*, 2005). Este tipo de análise pode ser feita devido ao fato de que os ensaio utilizam a mesma presa (SRC1a-LUC) proveniente da mesma síntese “in vitro”, ou seja, na mesma quantidade. As iscas são diferente, mas se encontram em excesso em relação as presas (quantidades em μg versus fg). Assim, as diferenças observadas nas respostas são dependentes da afinidade do ligante pelo receptor. Entretanto, mesmo nos ensaios de dose-resposta utilizando GST-RXR α como “isca” a maior concentração de 9c-RA utilizada não foi suficiente para atingir a resposta máxima a diferença observada entre os EC50 pode ser maior uma vez que o platô na curva dose-resposta para 9c-RA não foi alcançado.

Ademais, uma das aplicações do GST “light pull-down” é o a possibilidade de se realizar pesquisas rápidas de ligantes para receptores nucleares. Com este intuito validamos o ensaio de GST “light pull-down” para microplacas de 96 poços. Assim, uma maior quantidade de ensaios podem ser realizados simultaneamente, principalmente, os que envolvem diferentes ligantes sintéticos ou extratos de plantas. Análogos de hormônios sintéticos possuem um potencial terapêutico por modularem a função de muitos destes receptores. Além disso, disfunções associadas a receptores nucleares contribuem para males importantes com diabetes, obesidade, doenças cardiovasculares, e cânceres (Mangelsdorf, Thummel *et al.*, 1995). Agonistas do receptor de proliferadores peroxisomais ativado γ (PPAR γ) são atualmente utilizados no tratamento do diabetes tipo II (Spiegelman, 1998; Moore, Rosen *et al.*, 2001; Xu, Lambert *et al.*, 2001). Análogos de estrogênios chamados de moduladores seletivos de receptores estrogênicos que seletivamente bloqueiam ou ativam isoformas específicas deste receptor são utilizados na terapia contra câncer de mama e osteoporose (Brzozowski, Pike *et al.*, 1997; Gustafsson, 1998; Borngraerber, Budny *et al.*, 2003). Ademais, a ativação

seletiva do TR β pode ter importantes aplicações clínicas no tratamento de condições como hipercolesterolemia, hipertrigliciremia e obesidade com reduzida labilidade cardiovascular (Grover, Mellstrom *et al.*, 2003), uma vez que o TR β está envolvido na diminuição do colesterol e aumento da taxa metabólica, enquanto que o TR α parece ser mais importante para o controle da frequência cardíaca. Os compostos GC-1 (Chiellini, Apriletti *et al.*, 1998), GC-24 (Borngraeber, Budny *et al.*, 2003), e KB141 (Grover, Mellstrom *et al.*, 2003) são alguns dos ligantes TR β seletivos descritos. Outrossim, ligantes de receptores nucleares com ações terapêuticas tem sido isolados de plantas. Isoflavonas da soja interage com receptores de estrogênios ocasionando efeitos preventivos para o câncer de mama, câncer de ovário e doenças cardiovasculares. O esteróide guggulsterona isolado da *Commiphora mukul* (“guggul tree”) diminui o colesterol por antagonizar o receptor de farnesóides X (FXR) (Urizar, Liverman *et al.*, 2002). A nova metodologia GST “light pull-down”, descrita aqui, pode ser usada para a pesquisa rápida de várias moléculas sintéticas ou derivadas de plantas capazes de modular a ação de receptores nucleares, tais moléculas podem apresentar utilidade terapêutica.

Ademais, o plasmídeo Pet28a-LUCMCS permitirá a construção de outras proteínas “presas” fusionadas à luciferase o que pode facilitar a avaliação de outras interações proteína-proteínas envolvendo receptores nucleares ou não.

Assim, conclui-se que a nova metodologia de GST descrita facilita significativamente o estudo de interações proteína-proteína.

3.6 CONCLUSÕES

- 1- Luciferase pode ser utilizada como repórter enzimático da interação proteína-proteína em um ensaio de GST “pull down”
- 2- O novo método GST “light pull-down” apresenta resultados semelhantes aos do GST “pull-down” classico.
- 3- Inferências quantitativas podem ser feitas comparando-se a atividade da enzima luciferase precipitada no ensaio de GST “light pull down”.
- 4- O ensaio pode ser adaptado para microplacas de 96 poços.
- 5- O novo método é vantajoso por ser de menor custo, maior rapidez e não utilização de material radioativo.

REFERÊNCIAS

- Apriletti, J. W., R. C. Ribeiro, *et al.* Molecular and structural biology of thyroid hormone receptors. Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl, v.25, Nov, p.S2-11. 1998.
- Babu, B. G. E. K., M. lightning Bugs. Resonance, v.7, n.9, p.49-55. 2002.
- Beato, M. e J. Klug. Steroid hormone receptors: an update. Hum Reprod Update, v.6, n.3, May-Jun, p.225-36. 2000.
- Borngraeber, S., M. J. Budny, *et al.* Ligand selectivity by seeking hydrophobicity in thyroid hormone receptor. Proc Natl Acad Sci U S A, v.100, n.26, Dec 23, p.15358-63. 2003.
- Brzozowski, A. M., A. C. Pike, *et al.* Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. Nature, v.389, n.6652, Oct 16, p.753-8. 1997.
- Chambon, P. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. Faseb J, v.10, n.9, Jul, p.940-54. 1996.
- Chiellini, G., J. W. Apriletti, *et al.* A high-affinity subtype-selective agonist ligand for the thyroid hormone receptor. Chem Biol, v.5, n.6, Jun, p.299-306. 1998.
- Craig, T. J., L. F. Ciufu, *et al.* A protein-protein binding assay using coated microtitre plates: increased throughput, reproducibility and speed compared to bead-based assays. J Biochem Biophys Methods, v.60, n.1, Jul 30, p.49-60. 2004.
- Day, J. C., L. C. Tisi, *et al.* Evolution of beetle bioluminescence: the origin of beetle luciferin. Luminescence, v.19, n.1, Jan-Feb, p.8-20. 2004.
- De Wet, J. R., K. V. Wood, *et al.* Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. Mol Cell Biol, v.7, n.2, Feb, p.725-37. 1987.
- De Wet, J. R., K. V. Wood, *et al.* Cloning of firefly luciferase cDNA and the expression of active luciferase in *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A, v.82, n.23, Dec, p.7870-3. 1985.
- Egea, P. F., A. Mitschler, *et al.* Crystal structure of the human RXRalpha ligand-binding domain bound to its natural ligand: 9-cis retinoic acid. Embo J, v.19, n.11, Jun 1, p.2592-601. 2000.
- Eisenstein, M. A look back: providing means to an end. Nat Methods, v.2, n.8, Aug, p.628. 2005.
- Feng, W., R. C. Ribeiro, *et al.* Hormone-dependent coactivator binding to a hydrophobic cleft on nuclear receptors. Science, v.280, n.5370, Jun 12, p.1747-9. 1998.

Fraga, H., J. C. Esteves Da Silva, *et al.* Identification of luciferyl adenylate and luciferyl coenzyme a synthesized by firefly luciferase. Chembiochem, v.5, n.1, Jan 3, p.110-5. 2004.

Glass, C. K. e M. G. Rosenfeld. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. Genes Dev, v.14, n.2, Jan 15, p.121-41. 2000.

Goodson, M. L., B. Farboud, *et al.* An improved high throughput protein-protein interaction assay for nuclear hormone receptors. Nucl Recept Signal, v.5, p.e002. 2007.

Grover, G. J., K. Mellstrom, *et al.* Selective thyroid hormone receptor-beta activation: a strategy for reduction of weight, cholesterol, and lipoprotein (a) with reduced cardiovascular liability. Proc Natl Acad Sci U S A, v.100, n.17, Aug 19, p.10067-72. 2003.

Guan, K. L. e J. E. Dixon. Eukaryotic proteins expressed in Escherichia coli: an improved thrombin cleavage and purification procedure of fusion proteins with glutathione S-transferase. Anal Biochem, v.192, n.2, Feb 1, p.262-7. 1991.

Gustafsson, J. A. Therapeutic potential of selective estrogen receptor modulators. Curr Opin Chem Biol, v.2, n.4, Aug, p.508-11. 1998.

Lazar, M. A. Nuclear receptor corepressors. Nucl Recept Signal, v.1, p.e001. 2003.

Lee, J. W., Y. C. Lee, *et al.* Transcriptional coregulators of the nuclear receptor superfamily: coactivators and corepressors. Cell Mol Life Sci, v.58, n.2, Feb, p.289-97. 2001.

Leo, C. e J. D. Chen. The SRC family of nuclear receptor coactivators. Gene, v.245, n.1, Mar 7, p.1-11. 2000.

Lonard, D. M., S. Y. Tsai, *et al.* Selective estrogen receptor modulators 4-hydroxytamoxifen and raloxifene impact the stability and function of SRC-1 and SRC-3 coactivator proteins. Mol Cell Biol, v.24, n.1, Jan, p.14-24. 2004.

Malloy, P. J., W. Zhu, *et al.* A novel inborn error in the ligand-binding domain of the vitamin D receptor causes hereditary vitamin D-resistant rickets. Mol Genet Metab, v.73, n.2, Jun, p.138-48. 2001.

Mangelsdorf, D. J., C. Thummel, *et al.* The nuclear receptor superfamily: the second decade. Cell, v.83, n.6, Dec 15, p.835-9. 1995.

Mc, E. W. Properties of the reaction utilizing adenosinetriphosphate for bioluminescence. J Biol Chem, v.191, n.2, Aug, p.547-57. 1951.

Mcelroy, W. D. e M. A. Deluca. Firefly and bacterial luminescence: basic science and applications. J Appl Biochem, v.5, n.3, Jun, p.197-209. 1983.

- Mckenna, N. J. e B. W. O'malley. Minireview: nuclear receptor coactivators--an update. Endocrinology, v.143, n.7, Jul, p.2461-5. 2002.
- Moore, J. M., S. J. Galicia, *et al.* Quantitative proteomics of the thyroid hormone receptor-coregulator interactions. J Biol Chem, v.279, n.26, Jun 25, p.27584-90. 2004.
- Moore, K. J., E. D. Rosen, *et al.* The role of PPAR-gamma in macrophage differentiation and cholesterol uptake. Nat Med, v.7, n.1, Jan, p.41-7. 2001.
- Ordentlich, P., M. Downes, *et al.* Corepressors and nuclear hormone receptor function. Curr Top Microbiol Immunol, v.254, p.101-16. 2001.
- Ren, L., E. Chang, *et al.* Glutathione S-transferase pull-down assays using dehydrated immobilized glutathione resin. Anal Biochem, v.322, n.2, Nov 15, p.164-9. 2003.
- Smith, D. B. e K. S. Johnson. Single-step purification of polypeptides expressed in Escherichia coli as fusions with glutathione S-transferase. Gene, v.67, n.1, Jul 15, p.31-40. 1988.
- Spiegelman, B. M. PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. Diabetes, v.47, n.4, Apr, p.507-14. 1998.
- Takeshita, A., G. R. Cardona, *et al.* TRAM-1, A novel 160-kDa thyroid hormone receptor activator molecule, exhibits distinct properties from steroid receptor coactivator-1. J Biol Chem, v.272, n.44, Oct 31, p.27629-34. 1997.
- Togashi, M., P. Nguyen, *et al.* Rearrangements in thyroid hormone receptor charge clusters that stabilize bound 3,5',5-triiodo-L-thyronine and inhibit homodimer formation. J Biol Chem, v.280, n.27, Jul 8, p.25665-73. 2005.
- Urizar, N. L., A. B. Liverman, *et al.* A natural product that lowers cholesterol as an antagonist ligand for FXR. Science, v.296, n.5573, May 31, p.1703-6. 2002.
- Viviani, V. R. The origin, diversity, and structure function relationships of insect luciferases. Cell Mol Life Sci, v.59, n.11, Nov, p.1833-50. 2002.
- Wada, H., K. Kito, *et al.* Cleavage of the C-terminus of NEDD8 by UCH-L3. Biochem Biophys Res Commun, v.251, n.3, Oct 29, p.688-92. 1998.
- Wang, Y., S. Sugita, *et al.* The RIM/NIM family of neuronal C2 domain proteins. Interactions with Rab3 and a new class of Src homology 3 domain proteins. J Biol Chem, v.275, n.26, Jun 30, p.20033-44. 2000.
- Warnmark, A., E. Treuter, *et al.* Activation functions 1 and 2 of nuclear receptors: molecular strategies for transcriptional activation. Mol Endocrinol, v.17, n.10, Oct, p.1901-9. 2003.

Wood, K. V. Firefly luciferase: A new tool for molecular biologists. Promega Notes, v.28, p.1-3. 1990.

Wood, K. V. In: Bioluminescence and Chemiluminescence: Current Status. Chichester: John Wiley & Sons. 1991. 543 p.

Wood, K. V. The Bioluminescence Advantage. PROMEGA NOTES, v.may, n.96, p.1-5. 2007.

Wu, Y., B. Xu, *et al.* Thyroid hormone response element sequence and the recruitment of retinoid X receptors for thyroid hormone responsiveness. J Biol Chem, v.276, n.6, Feb 9, p.3929-36. 2001.

Xu, H. E., M. H. Lambert, *et al.* Structural determinants of ligand binding selectivity between the peroxisome proliferator-activated receptors. Proc Natl Acad Sci U S A, v.98, n.24, Nov 20, p.13919-24. 2001.

Xu, J. e Q. Li. Review of the in vivo functions of the p160 steroid receptor coactivator family. Mol Endocrinol, v.17, n.9, Sep, p.1681-92. 2003.

Zhang, J. e M. A. Lazar. The mechanism of action of thyroid hormones. Annu Rev Physiol, v.62, p.439-66. 2000.

Anexo I

Artigo relacionado ao estudo 1

**Negative Regulation of Superoxide Dismutase-1
Promoter by Thyroid Hormone**

Guilherme M. Santos, Vale´ ry Afonso, Gustavo B. Barra, Marie Togashi, Paul
Webb,
Francisco A. R. Neves, Nouredine Lomri, and Abderrahim Lomri

MOLECULAR PHARMACOLOGY Vol. 70, No. 3 793–800, 2006

ACCELERATED COMMUNICATION

Negative Regulation of Superoxide Dismutase-1 Promoter by Thyroid Hormone

Guilherme M. Santos, Valéry Afonso, Gustavo B. Barra, Marie Togashi, Paul Webb, Francisco A. R. Neves, Nouredine Lomri, and Abderrahim Lomri

Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) Unité 606, Lariboisière Hospital, and University of Paris, Paris, France (G.M.S., V.A., A.L.); Medical Research Council, Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, United Kingdom (G.M.S.); Molecular Pharmacology Laboratory, Department of Pharmaceutical Sciences, School of Health Sciences, University of Brasília, Brasília, Brazil (G.B.B., M.T., F.A.R.N.); Diabetes Center and Department of Medicine, University of California School of Medicine, San Francisco, California (M.T., P.W.); and University of Cergy-Pontoise, Unité de Formation et de Recherche des Sciences et Techniques, GRP2H-INSERM Unité 680, Département de Biologie, Cergy-Pontoise, France (G.M.S., N.L.)

Received April 12, 2006; accepted May 30, 2006

ABSTRACT

The role of thyroid hormone [L-3,5,3'-triiodothyronine (T_3)] and the thyroid hormone receptor (TR) in regulating growth, development, and metabolic homeostasis is well established. It is also emerging that T_3 is associated with oxidative stress through the regulation of the activity of superoxide dismutase-1 (SOD-1), a key enzyme in the metabolism of oxygen free radicals. We found that T_3 reverses the activation of the SOD-1 promoter caused by the free radical generators paraquat and phorbol 12-myristate 13-acetate through the direct repression of the SOD-1 promoter by liganded TR. Conversely, the SOD-1 promoter is significantly stimulated by unliganded TRs. This

regulation requires the DNA-binding domain of the TR, which is recruited to an inhibitory element between -157 and +17 of the SOD-1 promoter. TR mutations, which abolish recruitment of coactivator proteins, block repression of the SOD-1 promoter. Conversely, a mutation that inhibits corepressor binding to the TR prevents activation. Together, our findings suggest a mechanism of negative regulation in which TR binds to the SOD-1 promoter but coactivator and corepressor binding surfaces have an inverted function. This effect may be important in T_3 induction of oxidative stress in thyroid hormone excess.

Thyroid hormones control growth, development, and metabolism in virtually all mammalian tissues. Indeed, a pri-

mary role of L-3,5,3'-triiodothyronine (T_3) is to regulate oxygen consumption and metabolic rate (Yen, 2001; Baxter and Webb, 2006). More recently it has emerged that thyroid hormones are associated with the induction of oxidative stress in certain tissues. In fact, the hypermetabolic state in hyperthyroidism is associated with oxidative tissue injury, including alterations of heart electrical activity, muscle weakness, and liver injury (Venditti and Moa, 2006).

Oxidative injury is normally limited through the activity of the superoxide dismutase (SOD) enzymes, which serve as the first line of defense against the damaging effects of superoxide radicals (O_2^-) by convert O_2^- to hydrogen peroxide. Of the

This work was supported in part by Ministry of Education of Brazil, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)-Comite Francaise d'Evaluation de la Coopération Universitaire avec le Brésil program grant 43493 (to F.A.R.N., N.L., and A.L.) and by Brazilian Research Council (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)/Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico Subprograma de Biotecnologia (20003/02-2 and CNPq 40.004/02-5). G.M.S. was supported by a CAPES postdoctoral fellowship.

F.A.R.N., N.L., and A.L. share senior authorship.
Article, publication date, and citation information can be found at <http://molpharm.aspetjournals.org>
doi:10.1124/mol.106.025627

ABBREVIATIONS: T_3 , L-3,5,3'-triiodothyronine; SOD, superoxide dismutase; TR, thyroid hormone receptor; TRE, thyroid hormone response element; GRP, glucocorticoid receptor-interacting protein; SRC-1, steroid receptor coactivator-1; PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate; GST, glutathione S-transferase; HTC, hepatoma tissue culture; DTT, dithiothreitol; SMRT, silencing mediator for retinoid and thyroid receptors; TST, Tria/salina/Tween 20; TRH, thyrotropin-releasing hormone; TSH, pituitary thyroid-stimulating hormone; DBD, DNA binding domain; wt, wild-type; RTH, resistance to thyroid hormone; F451X, deletion of helix 12; G345R, mutation in the ligand binding domain; GS125, mutation in the DBD; I280K, mutation in the corepressor binding site; GAL-4 TR β 1, chimerical TR consisting of the TR β 1LBD fused to GAL-4 DBD.

different SOD enzymes, SOD-1 is the most abundant (90%) and is widely distributed (Johnson and Giulivi, 2005). *Drosophila melanogaster* that lack SOD-1 shows a reduced life span (Phillips et al., 1989). Moreover, perturbations in SOD-1 activity have been associated with several diseases (Peled-Kamar et al., 1995; Stathopoulos et al., 2003).

The antioxidant defense system is influenced by the thyroid hormone status. For example, thyroxine treatment decreases Cu/Zn SOD (SOD-1) activity in the liver of old rats (Saucic et al., 2006). Conversely, progressive hypothyroidism leads to an increase of superoxide dismutase activity in the brain of rats (Rahaman et al., 2001). cDNA microarray experiments to identify genes perturbed in hyperthyroid rat hearts revealed a number of genes, including SOD-1, that were down-regulated by T_3 (De et al., 2004). Although the inverse association between SOD-1 and T_3 in several tissues was clear, the mechanism involved in this regulation remained poorly understood.

The genomic actions of thyroid hormone are mediated by TRs, which are ligand-regulated transcription factors belonging to the nuclear receptor superfamily (McKenna and O'Malley, 2002; Nettles and Greene, 2005). The molecular mechanism of positive transcriptional regulation by TR is well established. TRs interact directly with specific DNA sequences, known as thyroid hormone response elements (TREs) (Yen et al., 2006). Unliganded TRs recruit specific corepressor proteins that, in turn, form part of a large corepressor complex that contains histone deacetylases and represses transcription of nearby genes by condensing chromatin (Li et al., 2000; McKenna and O'Malley, 2002; Codina et al., 2005). Ligand binding induces changes in receptor conformation and dynamics (Nagy and Schwabe, 2004) that lead to the release of corepressors and subsequent recruitment of p160 coactivators, such as glucocorticoid receptor-interacting protein (GRIP1) and steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) (Ribeiro et al., 1998).

In contrast to positive regulation, the molecular mechanism of negative regulation by nuclear receptors is less well understood. Several hypotheses have been proposed to explain the action of TR on negative TREs (Lazar, 2003). One hypothesis is that the TR directly regulates transcription through direct binding to target promoters, either to unusual DNA response elements or via protein-protein interactions with other transcription factors associated with cognate response elements. Another hypothesis suggests that the role of TR is indirect through the sequestration of corepressors from other transcription factors.

In this study, we sought to understand the mechanism through which T_3 regulates the proximal region of the SOD-1 gene promoter. We showed that T_3 could reverse the activation of the SOD-1 promoter caused by free radical generators, such as paraquat and PMA. We observed that TR β 1 (and also TR α 1) activates SOD-1 promoter in the absence of ligand, and T_3 reversed this activation in a dose-dependent manner. We found that the region of the SOD-1 promoter between -157 and the +17 was essential for TR β 1 regulation, and this regulation requires the TR DNA binding domain for binding to the proximal region of the SOD-1 promoter. TR mutants that were defective in corepressor recruitment no longer activated the SOD-1 promoter. Conversely, a receptor that was defective in coactivator recruitment, but was still able to interact with corepressor, showed impaired down-

regulation in response to T_3 . We therefore suggest that TR may play a role in oxidative stress by directly binding to the SOD-1 promoter, but TR coregulator binding surfaces have an inverted function. This effect may be important in production of intracellular superoxide radicals in conditions of thyroid hormone excess.

Materials and Methods

Plasmids. The TR mutants F451X, G345R, and G812S TR β 1 were created with the use of QuikChange site-directed mutagenesis kits (Stratagene, La Jolla, CA) into the pCMX vector that encodes 461 amino acids of hTR β 1 sequence. The mutated sequence was verified by DNA sequencing using Sequenase kits (Stratagene). The five deletions of SOD-1 promoter cloned upstream of the luciferase gene (Mine et al., 1999) were kindly provided by Dr. Christian Jaulin (Centre de Recherche en Cancérologie (E229), Montpellier, France). Plasmids encoding hTR β 1 (Ribeiro et al., 2001) Gal-4 hTR β 1, GAL-responsive element-5 Luciferase, GST-GRIP1 (563-767) (Darimont et al., 1998), GST-SRC1a (381-882) (Feng et al., 1998), GST-SMRT (987-1491) (Wohb et al., 2003), and TR mutant I288K (Marimuthu et al., 2002) were gifts from Dr. J. D. Baxter (University of California, San Francisco, CA).

Cell Culture and Transfection. U937, MG63, and rat hepatoma tissue culture (HTC) cells were maintained and subcultured in RPMI-1640 medium or Dulbecco's modified Eagle medium, containing 5% fetal calf serum, 50 units/ml penicillin, 50 μ g/ml streptomycin, at 37°C and 5% CO₂. Transfection procedures were described previously (Ribeiro et al., 2001), with some modifications. In brief, MG63 and HTC cells were divided 48h before transfection to generate 40 to 60% confluence in 150-mm plates at the time of transfection. Cells were collected by centrifugation and then resuspended in transfection solution (1.5 \times 10⁷ cells/0.5 ml) containing DMEM without phenol red (Invitrogen, Carlsbad, CA) and 250 mM sucrose, and then cotransfected with 3 μ g of SOD-1 luciferase reporter gene, 500 ng of control β -galactosidase vector and 1.5 to 4.5 μ g of wtTR β 1 expression vector or its mutants. Cells were transferred to a cuvette and then electroporated by using a Bio-Rad gene pulser under 290 mV and 960 μ F. After electroporation, cells were transferred to fresh media and then plated in 12-well multiplates and treated with T_3 (10⁻⁷ M or different concentrations) or ethanol (control). After 24 h, cells were collected by centrifugation, lysed by the addition of 150 μ l of 1 \times lysis buffer (Promega), and assayed for luciferase and β -galactosidase activity (kit from Promega Corp.). Transfection data are mean \pm S.E.M. of a minimum of triplicate samples that were repeated three to five times. The empty vector pCMX was used as a control for the transfections without TR (Fig. 1B). Because we noticed no difference between transfections with SOD-1 promoter alone and cotransfections with empty pCMX vector (data not shown), some assays were performed in absence of pCMX.

Gel Shift Assay. Binding of TR to DNA was assayed by mixing 20 fmol of ³²S-labeled TR β 1 or G812S TR β 1 produced in a reticulocyte lysate system, TnT T7 (Promega, Madison, WI), in the presence or absence of 10⁻⁶ M T_3 , with 600 fmol of unlabeled different SOD-1, DR-4 (5'-AGTTC AGGTCA CAGG AGGTCA GAG-3') and inverted palindrome P2 (5'-TTC TGACCC CATTGG AGGTCA-3') oligonucleotides, and 1 μ g of poly(dI-dC) (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) in a 20- μ l reaction mixture. The binding buffer contained 25 mM HEPES, 50 mM KCl, 1 mM DTT, 10 μ M ZnSO₄, 0.1% Nonidet P-40, and 5% glycerol. After 30 min at room temperature, the mixture was loaded onto a 5% nondenaturing polyacrylamide gel that was previously run for 30 min at 200 V. To visualize the TR-DNA complexes, the gel was run at 4°C for 120 min at 240 V, in a running buffer containing 6.7 mM Tris, pH 7.5, 1 mM EDTA, and 3.3 mM sodium acetate. The gel was then fixed, treated with Amplify (GE Healthcare), dried and exposed for autoradiography. TRs used in this assay were quantified through [¹²⁵I] T_3 binding

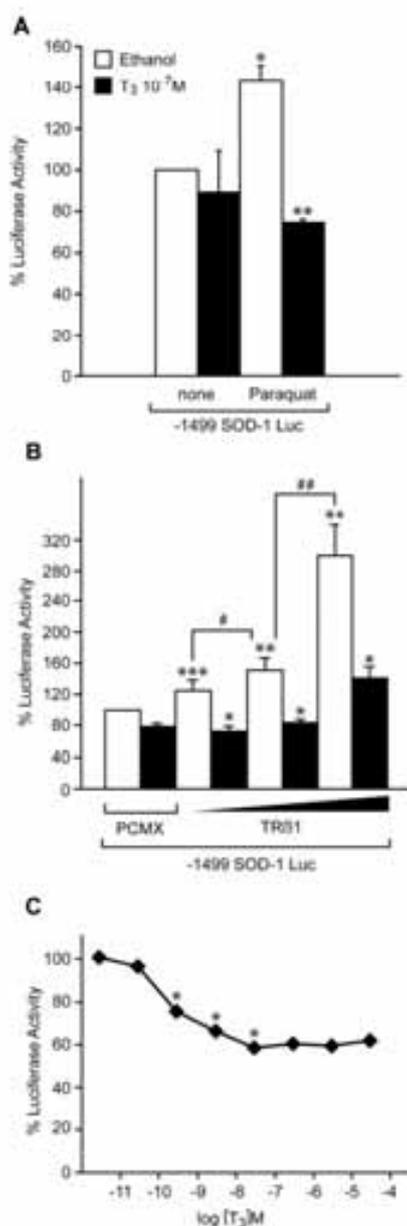


Fig. 1. Regulation of SOD-1 by thyroid hormone receptor. **A**, human promonocytic U937 cells were cotransfected with 3 μ g of a reporter gene containing a construction pGLS -1499 SOD-1 promoter encoding luciferase (SOD-1 Luc) and treated or not with 50 μ M paraquat; *, $P < 0.001$ versus no TR; **, $P < 0.001$ versus no T₃. **B**, U937 cells were cotransfected with 1.5, 3.0, and 4.5 μ g of expression vector encoding wt hTR β 1 and 3 μ g of -1499 SOD-1 Luc; *, $P < 0.001$ versus TR no T₃; **, $P < 0.001$ versus no TR/no T₃; ***, $P < 0.01$ versus no TR/no T₃; #, $P < 0.01$; ##, $P < 0.001$. **C**, U937 cells were cotransfected with 1.5 μ g of wt hTR β 1 and 3 μ g of -1499 SOD-1 Luc and then treated with increasing amounts of T₃; *, $P < 0.001$ versus no T₃. Luciferase activity was expressed as percentage of -1499 SOD-1 Luc in the absence of T₃ and without or with cotransfected wt hTR β 1.

assay. Amounts used for gel shift assay were also confirmed through SDS-PAGE run of ³⁵S-labeled TRs, where gels were fixed, dried, and exposed for autoradiography. Bands visualized in X-ray films were quantified with a Kodak imager (Eastman Kodak, Rochester, NY). SOD-1 oligonucleotides (Fig. 4A): Seq1 (-87 to -46), GAGCGCGT-GCGAGGGCGATTGGTTTGGGGCCAGAGTGGGCGAG; Seq1mut (in bold: -87 to -46), GAGCGCGTGGCGAGGGCGATTGGATGCATGCC-AGAGTGGGCGAG; Seq 2 (-51 to -7), GCGAGGGCGCGGAGGTC-TGGCCTATAAAGTAGTCGCGGAGACGGG; Seq 3 (-12 to +29), GACGGGGTGCTGGTTTGGCGTCGTAGTCTCTCTGCAGCGTCTGG; Seq 4 (+23 to +69), TCTGGGGTTTCCGTTGCAGTCTCTCGGAACC-AGGACCTCGGCGTG; and Seq 5 (+64 to +104), GCGGTGGCCCTA-GCGAGTTATGGCGACGAAGGCCGTGTGCG.

GST Pull-Down Assay. pCMX-TR β 1wt or pCMX-mutants vectors were used to produce radiolabeled full-length receptor in vitro, using the TNT-Coupled Reticulocyte Lysate System (Promega) and [³⁵S]methionine. GST SRC1 α (381-882), GST-GRIP1 (563-767), and GST-SMRT (987-1491) fusion proteins were prepared using conventional protocols (Pfizer, New York, NY). In brief, the plasmids were transformed into BL21, cultured into 2xLB medium, pelleted and resuspended in 1 \times TST buffer (50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, and 0.05% Tween 20) with 1 mM DTT, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and protease inhibitor cocktail 1:1000 (Sigma, St. Louis, MO). Then, the solution was incubated with lysozyme and sonicated (three 2.5-min cycles, amplitude 70%, 1 pulse/s with a break of 5 min between each cycle).

The debris were pelleted and the supernatant was incubated for 2 h with 500 μ l of glutathione-Sepharose 4B beads equilibrated with 1 \times TST. GST fusion protein beads were washed with 1 \times TST containing 0.05% Nonidet P-40 and resuspended in 1 \times TST with 1 mM DTT, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, protease inhibitor cocktail 1:1000 (Sigma), and 50% glycerol, and then stored at -20°C. All procedures above were carried out at 4°C. For the binding assay, the glutathione bead suspension containing 4 μ g of GST fusion protein was incubated with 3 μ l of ³⁵S-labeled protein in 150 μ l of 1 \times TST buffer with 0.1% Nonidet P-40, 0.1% Triton X-100, 1 mM DTT, and 2 μ g/ml bovine serum albumin, in the presence of 10⁻⁶ M T₃ or vehicle. After a 2-h incubation at 4°C, the beads were washed with the same incubation buffer. The beads with associated proteins were analyzed on 10% SDS-polyacrylamide gels and visualized by autoradiography.

Statistical Analysis. One-way analysis of variance followed by Student-Newman-Keuls multiple comparison test was employed for assessment of significance (Prism version 4.0a; GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Differences were considered to be significant at $P < 0.05$.

Results and Discussion

The SOD-1 Promoter Is Negatively Regulated by TR β 1/T₃. To explore the regulation of the proximal SOD-1 gene, we used a reporter plasmid with the proximal promoter region -1499 to +17 of the SOD-1 fused to the luciferase gene (SOD-luc). Here, we observe that treatment with T₃, the active thyroid hormone, reversed the effect of the paraquat through a direct or indirect repression of the SOD-1 promoter activity (Fig. 1A).

To determine whether the effect of T₃ on the SOD-1 promoter was mediated by the TR, we examined the effect of transfected TR β 1 on the SOD-1 promoter activity in U937 cells (Fig. 1, B and C), human osteosarcoma MG63 cells (data not shown) and rat HTC cells (Fig. 3B) in the presence or absence of T₃. We observed that unliganded TR β 1, also TR α 1 (data not shown), activated the SOD-1 promoter and that T₃ reversed this effect. TR β 1 activated the SOD-1 promoter in U937 cells by 2- to 3-fold in a concentration-dependent man-

ner, and T₃ treatment reversed this activation by 50 to 60% (Fig. 1B). T₃ repression was dose-dependent (Fig. 1C), with maximum inhibitory effect at 0.5 nM, typical for thyroid hormone responses.

The SOD-1 promoter behaved similarly to those of thyrotropin-releasing hormone (TRH) (Feng et al., 1994) and the pituitary thyroid-stimulating hormone (TSH) α - and β -subunit genes (Chatterjee et al., 1989; Bodenner et al., 1991), which all contain nTREs.

A T₃-Responsive Sequence in SOD-1 Promoter. To characterize the element responsible for unliganded TR β 1

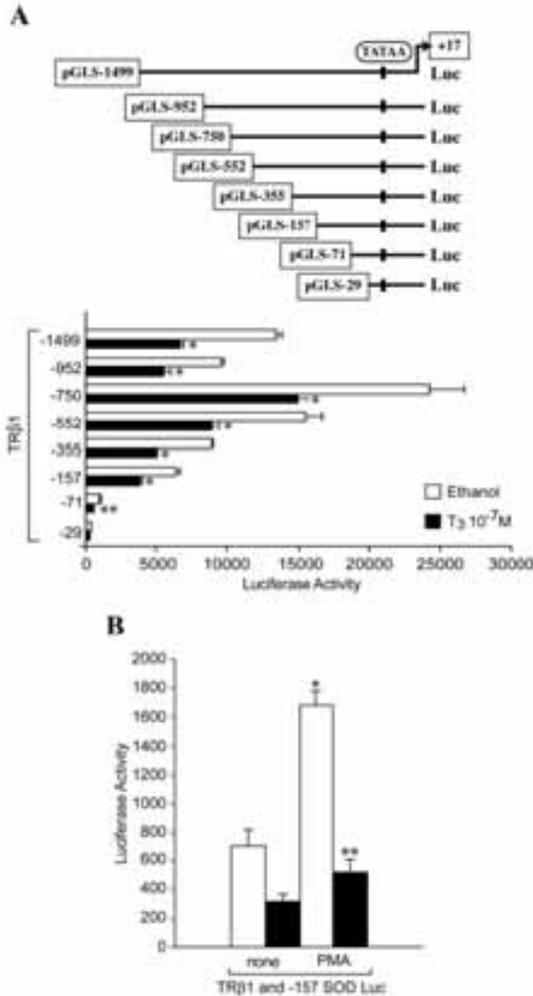


Fig. 2. TR β 1 activation and T₃ inhibition in different 5' deletions of the SOD-1 promoter linked to the luciferase gene. U937 cells were cotransfected with 1.5 μ g of expression vector encoding hTR β 1wt and 3 μ g of different pGLS constructs of SOD-1 promoter encoding luciferase. * $P < 0.001$ versus no T₃, ** $P < 0.05$ versus no T₃ (A) or with -157 SOD1 Luc, treated or not with 100 ng/ml PMA; * $P < 0.001$ versus no PMA/no T₃, ** $P < 0.001$ versus PMA/no T₃ (B). The data show a representative experiment, which was repeated 3–4 times.

activation and T₃ inhibition in the SOD-1 proximal promoter, we examined effects of T₃ upon different 5' deletions of the SOD-1 promoter. Constructs with a 5' boundary of pGLS -157 or longer were repressed by T₃ (Fig. 2A). The shorter construct pGLS -71/+17 also showed a significant response to T₃ treatment but the constitutive activity of the promoter was so much lower that one could not be fully confident that the full T₃ response was preserved. Together, these results suggest that a T₃ response element is located in the nucleotide -157 to +17 region.

To confirm the opposing activities of free radical generator and T₃ on the -157/+17 SOD-1 promoter, we tested the effect of PMA on SOD-1 Luc construct cotransfected with TR β 1. As expected, PMA activated this promoter and T₃ antagonized this effect (Fig. 2B).

The DBD of TR Was Required to Regulate the SOD-1 Promoter. To understand whether the regulatory effect of the TR on the activity of the SOD-1 promoter required TR β 1 DNA-binding domain, we examined the activity of a chimeric TR lacking the DNA binding domain (DBD) but fused to the heterologous GAL-4 DBD (GAL-4 TR β 1) (Fig. 3A). This chimeric protein showed a lower activation of the SOD-1 pro-

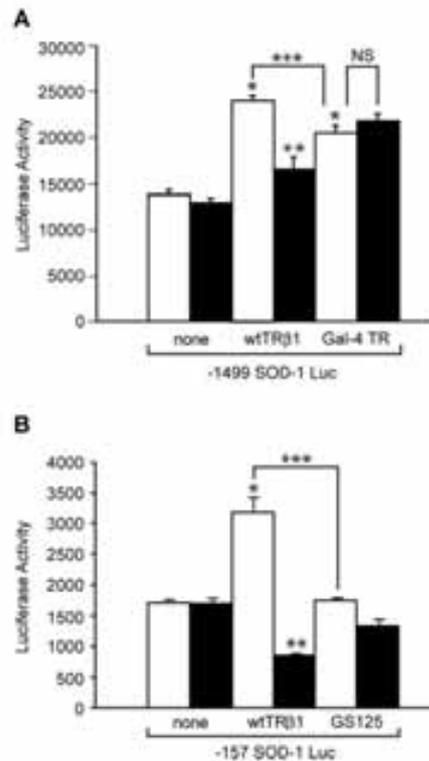


Fig. 3. DBD is required to regulate SOD-1 promoter. A. U937 cells were cotransfected with 3 μ g of -1499 SOD-1 Luc and 1.5 μ g of GAL-4 TR β 1 or wt hTR β 1; * $P < 0.001$ versus no TR/no T₃, ** $P < 0.001$ versus TR/no T₃, *** $P < 0.001$ versus no PMA/no T₃. B. HTC cells were cotransfected with 3 μ g of pGLS -157 SOD-1 Luc and 1.5 μ g of TR β 1 or GS125 hTR β 1; * $P < 0.001$ versus no TR/no T₃, ** $P < 0.001$ versus TR/no T₃, *** $P < 0.001$. The data show a representative experiment that was repeated three or four times.

motor compared with wtTR and did not repress SOD-1 promoter in the presence of T₃. GAL-4 TRβ1 did activate GAL luciferase reporter gene in presence of T₃ (data not shown), indicating that this protein was functionally active. In addition, we prepared and analyzed the activity of a TRβ1 mutant, GS125, as described previously for TRβ2 (Shibusawa et al., 2003b). This mutant did not regulate the -157 SOD-1 promoter (Fig. 3B) but showed the same binding affinity to T₃ as wt TRβ1/T₃, confirming that it was functional (data not shown).

Nuclear receptors regulate transcription by binding to specific DNA sequences in target genes but can also modulate gene expression by mechanisms independent of DNA binding. Analysis of the "knock-in" mouse that harbors a TRβ mutant defective in DNA binding described by Shibusawa et al. (2003a) revealed that thyroid hormone failed to suppress

TSH gene transcription in these mice, supporting the conclusion that negative regulation of the TSH gene required DNA binding by TR. Our data indicate that two TR mutants that cannot bind to canonical TREs, GAL-4 TRβ1 and GS125 TRβ1, both failed to repress SOD-1 promoter activity. The GS125 TRβ2 mutant, which binds to a TRE/glucocorticoid response element promoter but showed low affinity for positive and negative TREs, abolishes transactivation on three classic pTREs (DR4, LAP, and PAL) and all negatively regulated promoters in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis (TRH, TSHβ, and TSHα) (Shibusawa et al., 2003b). Thus, our results suggest that TR DNA binding activity is required for regulation of the SOD-1 promoter.

TRβ1 Bound to SOD-1 Promoter. To test the hypothesis that TR binds to the SOD-1 promoter, we performed gel-shift assays with radiolabeled TRβ1 and different sequences from

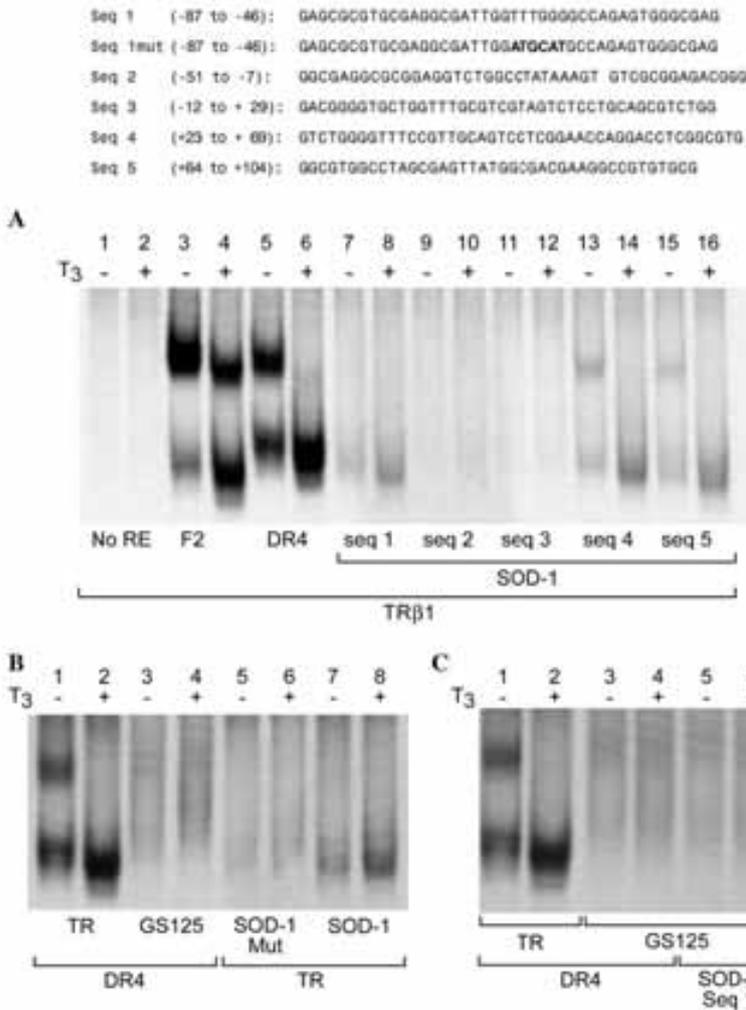
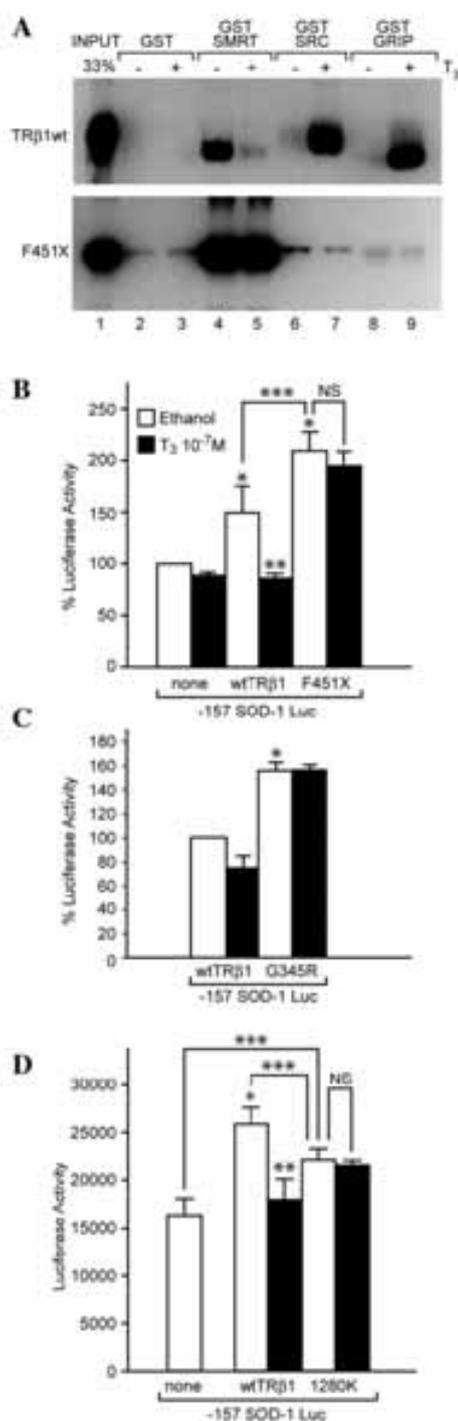


Fig. 4. TRβ1 binds to different sequence of SOD-1 promoter. Gel-shift assays contained 20 fmol of the in vitro-translated ³²S-labeled hTRβ1 (A-C), ³²S-labeled GS125 TR mutant (B and C) and 600 fmol of DR4 (A, lanes 5 and 6; B, lanes 1-4; C, lanes 1 and 2), F2 (A, lanes 3 and 4), different sequences of SOD-1 (A, lanes 7-16), or only the sequence 1 of SOD-1, mutated (B, lanes 5 and 6) or not mutated (B, lanes 7 and 8; C, lanes 5-6).



the SOD-1 promoter and the first exon of SOD-1 gene (Fig. 4A). As expected, the TRβ1 bound as a homodimer to two canonical positive TREs (F2 and DR4) in the absence of ligand, and T₃ shifted the balance toward monomer binding (Fig. 4A, lanes 3–6). Three regions of the SOD-1 sequence supported weak TRβ1 binding. The sequence 1 of SOD-1 promoter (–87 to –46) binds monomeric TR, and this binding was slightly increased in the presence of T₃ (Fig. 4A, lanes 7 and 8). Sequences from the first exon of SOD-1 transcript (+23 to +69 and +64 to +104) support weak homodimer and monomer binding (Fig. 4A, lanes 13–16); T₃ favored TR monomer formation (Fig. 4A, lanes 14 and 16). Interestingly we noticed that TRβ1 bound rather weakly to the SOD-1 promoter compared with DR4 or F2 elements.

The sequence –87 to –46 of SOD-1 promoter is close to the TATA box region and contains the sequence PTTGGG, which is also present in other negatively regulated genes characterized previously (Kim et al., 2005). Mutation of this sequence (ATGCAT) abolished TR monomer binding (Fig. 4B, lanes 5–8). Moreover, the GS125 TRβ1 mutant, which cannot regulate SOD-1 activity, was also unable to bind to the DR-4 element or SOD-1 sequences (Fig. 4, B, lanes 3 and 4, and C). Both lines of evidence suggest that TR regulated SOD-1 activity by binding to the sequence 1 negative TRE.

These results are in accordance with other studies, which showed the presence of nTREs in the promoters very close to the TATA box (Belandia et al., 1998; Perez-Juste et al., 2000). It is noteworthy that TR also binds weakly to two different sequences in the first exon of SOD-1 gene; here, unliganded TR bound as homodimers and liganded TR as monomer units. Belandia et al. proposed that T₃ represses β-amyloid precursor protein promoter activity by a mechanism that requires binding of TR to a specific sequence located in the first exon (Belandia et al., 1998).

The TR-DNA interaction observed in our study is weak compared with other positive TREs, F2 and DR4. Nevertheless, nTREs are generally composed of weak TR binding sites. Kim et al. (2005) demonstrated that nuclear receptor corepressor activates CD44 promoter by a weak unliganded TR-DNA interaction, 100-fold less than DR4. This weak TR-DNA binding was essential for CD44 regulation by T₃. Our results are in agreement with this finding, in that they showed a weak TR-SOD-1 promoter interaction.

Although our data indicate that TR monomer units were important for the repression mechanism of SOD-1 promoter by T₃, we cannot exclude the idea that squelching of corepressors might have played a part in this regulation. Our results reveal that GAL-4 TR did activate the SOD-1 promoter in the absence of hormone to a significant degree. Because the ligand binding domain of Gal-4 TR can bind to coregula-

Fig. 3. TRβ1 mutations in activator and corepressor binding surfaces. **A**, pull-down experiments examining the binding of labeled receptors to SMRT, GRIP, and SRC protein fragment. Binding is expressed as the percentage of input labeled receptor. Binding of ³⁵S-labeled wt hTRβ1 or F451X to GST-SMRT, GST-SRC, and GST-GRIP in presence or absence of 10⁻⁷ M T₃. U937 cells were cotransfected with 3 μg of pGLS –157 SOD-1 Luc and 1.5 μg of wt hTRβ1 or F451X (**B**), *P < 0.001 versus no TR/no T₃, **P < 0.001 versus TR/no T₃, ***P < 0.001; G345R (**C**), *P < 0.001 versus TR/no T₃ or I280K (**D**), *P < 0.001 versus no TR, **P < 0.001 versus TR/no T₃, ***P < 0.01. **B** and **C**, luciferase activity was expressed as percentage of –157 SOD-1 Luc in the absence of T₃ and without (**B**) or with (**C**) cotransfected wt hTRβ1. **D**, the data show a representative experiment that was repeated three to five times.

tors, it is possible that the squelching mechanism could contribute to activation by unliganded TRs. Furthermore, indirect regulation through other transcription factors may cooperate with liganded TR to negatively regulate the SOD-1 promoter, because the -157 to +17 region in this promoter shows binding sites for the transcription factors: simian virus 40 promoter factor 1, activator protein-1, early growth response protein, nuclear factor- κ B, and aryl hydrocarbon receptor. Of these, it has been well established that AP-1 can be subject to "trans-repression" by nuclear receptors. Therefore, we tested whether a mutation to the AP-1 site might reduce the activity of TR on this promoter (data not shown). Our results clearly showed that this was not the case.

Activation of the SOD-1 Promoter by Unliganded TR Requires the Corepressor Binding Surface. To explore the role of TR coregulator binding surfaces in SOD-1 promoter regulation, we made use of mutations that have been characterized previously. We first confirmed that a natural mutation of the TR (F451X) in which helix 12 is absent, from patients with resistance to thyroid hormone (RTH), increases TR binding to corepressor nuclear receptor corepressor (Marimuthu et al., 2002) in GST pull-down assays. In this study, we showed that T_3 decreases the binding of TR to the corepressor SMRT (Fig. 5A, wtTR lane 5) and increases binding to the coactivators GRIP and SRC (Fig. 5A, wtTR lanes 7 and 9). Furthermore, F451X shows an enhanced constitutive binding to SMRT (Fig. 5A, F451X lanes 4 and 5) and decreased binding to both coactivators (Fig. 5A, F451X lanes 6–9). In transfection assays, F451X increased Luc expression from the SOD-1 promoter by 2.2-fold and T_3 could not reverse this activation (Fig. 5B).

We also analyzed the actions of another RTH mutant (G345R), which binds corepressor (Liu et al., 1998) but cannot bind ligand (Yen et al., 1995; Takahita et al., 1996), on SOD-1 promoter activity. Like F451X, G345R activated the -157 SOD-1 promoter but failed to repress the SOD-1 promoter in presence of T_3 (Fig. 5C). Together, these results indicate that two TR β 1 mutants that bind corepressors but not coactivators can enhance SOD-1 promoter activity.

Previous studies indicate that corepressors may be involved in activation of genes negatively regulated by thyroid hormone, such as TSH β , TSH α , and TRH (Tagami et al., 1999; Berghagen et al., 2002). Our results are in agreement with these findings. The natural mutant F451X, where the helix 12 of wtTR was deleted and the corepressor-binding surface was exposed, enhances corepressor and inhibits coactivator binding and stimulates the SOD-1 promoter more strongly than wtTR β 1, and T_3 did not reverse this effect. Likewise, another RTH mutant that binds corepressor but not ligand or coactivator activated the SOD-1 promoter better than wtTR β 1 and, as expected, failed to repress transcription in response to T_3 .

To investigate the role of the corepressor binding surface in SOD-1 promoter regulation, we used a previously characterized TR mutant that inhibit corepressor binding (Marimuthu et al., 2002). One of the residues that forms the corepressor-binding surface, Ile280, lies mostly underneath helix 12 and is solvent-inaccessible in the liganded TR-ligand binding domain structure. The mutant I280K (G. B. Barra, L. F. Ribeiro-Velasco, R. Pessanha, I. C. Ribeiro, L. A. Simoni, R. C. J. Ribeiro, F. A. R. Neves, manuscript in preparation) showed a decreased SMRT binding and also a weak binding

to GRIP and SRC in presence of T_3 . The unliganded TR I280K mutant activated neither the SOD-1 promoter nor wtTR β 1 in transfections (Fig. 5D) and did not repress SOD-1 promoter activity in the presence of T_3 . Together, our data indicate that the corepressor binding surface was required for activation of the SOD-1 promoter by unliganded TRs and that the coactivator binding surface was required for T_3 -dependent repression. These results indicate that the role of TR corepressor and coactivator binding surfaces was reversed at the SOD-1 promoter.

It is presently believed that nuclear hormone receptors promote dynamic recruitment of different coregulator complexes to target promoters and that these effects are associated with an equally dynamic binding of the nuclear receptor itself to the promoter (Perissi and Rosenfeld, 2005). In this context, further studies will be important to elucidate the dynamic mechanism of the recruitment of multiple complexes, such as histone deacetylases/corepressors/TR, to alter the chromatin structure surrounding the promoter of SOD-1 gene. Nevertheless, our data support the hypothesis of an inverted role of coregulators on negative TREs.

In conclusion, we have revealed the SOD-1 promoter as a novel target for TR action. Given that SOD-1 is a key enzyme against the damaging effects of superoxide radicals, this closely associates the thyroid hormone and the formation of oxygen radicals and other reactive species, which lead to oxidative stress. In addition, this study highlights the SOD-1 promoter as a useful tool for studying genes that are negatively regulated by thyroid hormone, providing new insights into the negative regulation by nuclear hormone receptors.

Acknowledgments

We are grateful to John Schwabe for helpful discussions and reviewing the manuscript. We thank John D. Baxter for providing clones of TR β 1 and mutants and Christian Jaulin for clones of SOD-1-Luciferase.

References

- Baxter JD and Webb P (2006) Metabolism: bile acids heat things up. *Nature (Lond)* 438:402–403.
- Belandier B, Latasa MJ, Vila A, and Pascual A (1998) Thyroid hormone negatively regulates the transcriptional activity of the β -angiotensin precursor protein gene. *J Biol Chem* 273:30366–30371.
- Berghagen H, Egnaldskov E, Krugerud K, Thomsen G, Apriletti J, and Nantwich F (2002) Corepressor SMRT functions as a coactivator for thyroid hormone receptor TRH from a negative hormone response element. *J Biol Chem* 277:49511–49522.
- Bodenner DL, Mroczynski MA, Weitzman BD, Radovick S, and Woodhull FE (1991) A detailed functional and structural analysis of a major thyroid hormone regulatory element in the human thyrotropin beta-subunit gene. *J Biol Chem* 266:21666–21673.
- Chatterjee YK, Lee JK, Bastoune A, and Jansone JL (1996) Negative regulation of the thyroid-stimulating hormone alpha gene by thyroid hormone: receptor interaction adjacent to the TATA box. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:9114–9118.
- Codina A, Lovo JD, Li Y, Latasa MA, Nishino D, and Schwabe JW (2005) Structural insights into the interaction and activation of histone deacetylase 3 by nuclear receptor corepressors. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:6009–6014.
- Darimont BD, Wagner RL, Apriletti JW, Stallcup MR, Kushner PJ, Baxter JD, Fletcher RJ, and Yamamoto KR (1999) Structure and specificity of nuclear receptor-coactivator interactions. *Genes Dev* 13:3343–3356.
- De R, Ghosh G, Datta M, Kumar A, Bandhyopadhyay J, Bandhyopadhyay D, Bhattacharya S, and Bandhyopadhyay A (2004) Analysis of differentially expressed genes in hyperthyroid-induced hypertrophied heart by cDNA microarray. *J Endocrinol* 182:309–314.
- Feng P, Li QF, Sudo T, and Willet JF (1994) Ligand (T_3) dependent and independent effects of thyroid hormone receptors upon human TRH gene transcription in nonclonal rat cells. *Biochem Biophys Res Commun* 200:171–177.
- Feng W, Ribeiro EC, Wagner RL, Nyrion H, Apriletti JW, Fletcher RJ, Baxter JD, Kushner PJ, and West HL (1998) Hormone-dependent coactivator binding to a hydrophobic cleft on nuclear receptors. *Science (Wash DC)* 280:1747–1749.
- Johnson F and Giudizi C (2005) Superoxide dismutase and their impact upon human health. *Mol Aspects Med* 26:349–353.
- Kim SW, Ho SC, Hong SJ, Kim KM, Se EC, Christofilidis M, and Harney JW (2005)

- A novel mechanism of thyroid hormone-dependent negative regulation by thyroid hormone receptor, nuclear receptor corepressor (NCoR), and GAGA-binding factor on the rat cDNA promoter. *J Biol Chem* 269:14545-14555.
- Lazar MA (2002) Thyroid hormone action: a binding contract. *J Clin Invest* 112: 497-499.
- Li J, Wang J, Nawaz Z, Liu JM, Qin J, and Wang J (2000) Both corepressor proteins SMRT and N-CoR exist in large protein complexes containing HDAC3. *EMBO (Eur Mol Biol Organ) J* 19:4342-4350.
- Liu Y, Takahata A, Mizui S, Chin WW, and Yen PM (1999) Lack of corepressor interaction can be a mechanism for dominant negative activity by mutant thyroid hormone receptors. *Endocrinology* 129:4197-4204.
- Marmuth A, Feng W, Tagami T, Nguyen H, Jamason JL, Fletcher RJ, Baxter JD, and West BL (2002) TB surfaces and conformations required to bind nuclear receptor corepressor. *Mol Endocrinol* 16:271-286.
- McKenna NJ and O'Malley BW (2002) Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and corepressors. *Cell* 106:465-474.
- Mize E, de Coppet P, Masson P, Thiery L, Dutertré S, Amor-Gaoret M, and Jaquin C (1999) The human copper-zinc superoxide dismutase gene (SOD1) proximal promoter is regulated by Sp1, Egr-1, and WT1 via non-canonical binding sites. *J Biol Chem* 274:503-509.
- Nagy L and Schwabe JW (2004) Mechanism of the nuclear receptor molecular switch. *Trends Biochem Sci* 29:317-324.
- Nettel KW and Greene GL (2005) Ligand control of corepressor recruitment to nuclear receptors. *Annu Rev Physiol* 67:309-332.
- Patel-Kumar M, Lobos J, Olson K, Sachs L, and Grosser Y (1995) Thyroid abnormalities and enhanced apoptosis of thymocytes and bone marrow cells in transgenic mice overexpressing CuZn-superoxide dismutase: implications for Down syndrome. *EMBO (Eur Mol Biol Organ) J* 14:4092-4093.
- Perez-Juste G, Garcia-Silva S, and Aranda A (2000) An element in the region responsible for premature termination of transcription mediates repression of *c-myc* gene expression by thyroid hormone in neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 275:1307-1314.
- Peroni V and Rosenfeld MG (2003) Controlling nuclear receptors: the circular logic of cofactor cycles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:542-554.
- Phillips JP, Campbell SD, Michael D, Charbanow M, and Hilliker AJ (1999) Null mutation of copper/zinc superoxide dismutase in *Drosophila* confers hypersensitivity to paraquat and reduced longevity. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:2701-2705.
- Rahman SO, Ghosh S, Mohanakumar KP, Das S, and Sarkar PK (2001) Hypothyroidism in the developing rat brain is associated with marked oxidative stress and aberrant intraneuronal accumulation of neurofilaments. *Neurosci Res* 49:273-279.
- Ribeiro BC, Aprilitti JW, Wagner BL, West BL, Feng W, Haber B, Kushner PJ, Nilsson S, Scanlan T, Fletcher RJ, et al. (1998) Mechanisms of thyroid hormone action: insights from X-ray crystallographic and functional studies. *Bioess Prog Biom Res* 23:351-392; discussion 392-394.
- Ribeiro BC, Feng W, Wagner BL, Costa CH, Pereira AC, Aprilitti JW, Fletcher RJ, and Baxter JD (2001) Definition of the surface in the thyroid hormone receptor ligand binding domain for association of homodimers and heterodimers with retinoid X receptor. *J Biol Chem* 276:14967-14965.
- Sacic ZS, Mijaljevic DN, Nikolic AL, Blagjevic DP, Spasic MB, and Petricic VM (2006) Effect of thyroxine on antioxidant defense system in the liver of different aged rats. *Physiol Res*, in press.
- Shibusawa N, Hashimoto K, Nikrodjanzad AA, Liberman MC, Applebury ML, Liao XR, Robbins JT, Behlhoff S, Colson RN, and Woodlford FE (2003a) Thyroid hormone action in the absence of thyroid hormone receptor DNA-binding in vivo. *J Clin Invest* 112:698-697.
- Shibusawa N, Hildesberg AN, and Woodlford FE (2003b) Thyroid hormone receptor DNA binding is required for both positive and negative gene regulation. *J Biol Chem* 278:722-728.
- Stathopoulou PB, Rumbold JA, Scholtz GA, Izumi EA, Frey HE, Hollowell SA, Lepock JH, and Meisring EM (2003) CuZn superoxide dismutase mutants associated with amyotrophic lateral sclerosis show enhanced formation of aggregates in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:7021-7026.
- Tagami T, Park Y, and Jamason JL (1999) Mechanisms that mediate negative regulation of the thyroid-stimulating hormone alpha gene by the thyroid hormone receptor. *J Biol Chem* 274:22345-22353.
- Takahata A, Yen PM, Mizui S, Cardoso GR, Liu Y, and Chin WW (1996) Molecular cloning and properties of a full-length putative thyroid hormone receptor corepressor. *Endocrinology* 137:3304-3307.
- Venditti P and Moo HD (2006) Thyroid hormone-induced oxidative stress. *Cell Mol Life Sci*.
- Walt P, Nguyen P, and Koehler PJ (2003) Differential SERM effects on corepressor binding dictate ERα activity in vivo. *J Biol Chem* 278:4912-4920.
- Yen PM (2001) Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Rev* 81:1097-1142.
- Yen PM, Ando S, Feng X, Liu Y, Marzavola F, and Xia X (2006) Thyroid hormone action at the cellular, genomic and target gene levels. *Mol Cell Endocrinol* 246: 121-127.
- Yen PM, Wilson EC, Hayashi Y, Behlhoff S, and Chin WW (1995) Studies on the repression of basal transcription (silencing) by artificial and natural human thyroid hormone receptor-beta mutants. *Endocrinology* 136:2845-2851.

Address correspondence to Abderrahim Loucif, INSERM Unite 606, Lariboisiere Hospital, 2, rue Ambroise Paré, 75475 Paris Cedex 10, France. E-mail: loucif@larib.inserm.fr

Anexo II

Artigo relacionado ao estudo 2

**Luteinizing Hormone Beta Mutation and
Hypogonadism in Men and Women**

Adriana Lofrano-Porto, M.D., Gustavo Barcelos Barra, Pharm.D., Leonardo Abdala Giacomini, Paula Pires Nascimento, Ana Claudia Latronico, M.D., Luiz Augusto Casulari, M.D., e Francisco de Assis da Rocha Neves, M.D.

BRIEF REPORT

Luteinizing Hormone Beta Mutation
and Hypogonadism in Men and Women

Adriana Lofrano-Porto, M.D., Gustavo Barcelos Barra, Pharm.D.,
Leonardo Abdala Giacomini, Paula Pires Nascimento,
Ana Claudia Latronico, M.D., Luiz Augusto Casulari, M.D.,
and Francisco de Assis da Rocha Neves, M.D.

SUMMARY

Selective luteinizing hormone deficiency due to mutations in the luteinizing hormone beta-subunit gene (*LHB*) is a rare cause of hypogonadism. We describe the clinical features of a consanguineous family in which three siblings, two men and one woman, had hypogonadism related to isolated luteinizing hormone deficiency. These subjects have a newly discovered homozygous mutation of a 5' splice site in *LHB*: IVS2+1G→C. This mutation disrupts the splicing of messenger RNA (mRNA), generating a gross abnormality in the processing of the luteinizing hormone beta-subunit mRNA, which abrogates the secretion of luteinizing hormone. We also determined that the female phenotype of this *LHB* mutation is characterized by normal pubertal development, secondary amenorrhea, and infertility.

LUTEINIZING HORMONE PLAYS AN ESSENTIAL ROLE IN NORMAL PUBERTAL development and reproductive function in humans. It consists of two glycosylated, noncovalently linked subunits: a hormone-specific beta subunit and an alpha subunit common to all members of the glycoprotein hormone family. Selective luteinizing hormone deficiency is predicted to compromise reproductive capacity markedly in both sexes.¹⁻³

Inactivating mutations of the human luteinizing hormone beta-subunit gene (*LHB*) were previously described in three men with hypogonadism who had normal genitalia at birth but had no pubertal development and had infertility due to selective luteinizing hormone deficiency.³⁻⁵ To our knowledge, no female phenotype of such inactivating mutations in the *LHB* gene has been described. We describe the clinical and hormonal characteristics of three siblings, two men and a woman, all of whom had hypogonadism associated with a newly discovered mutation of the *LHB* gene.

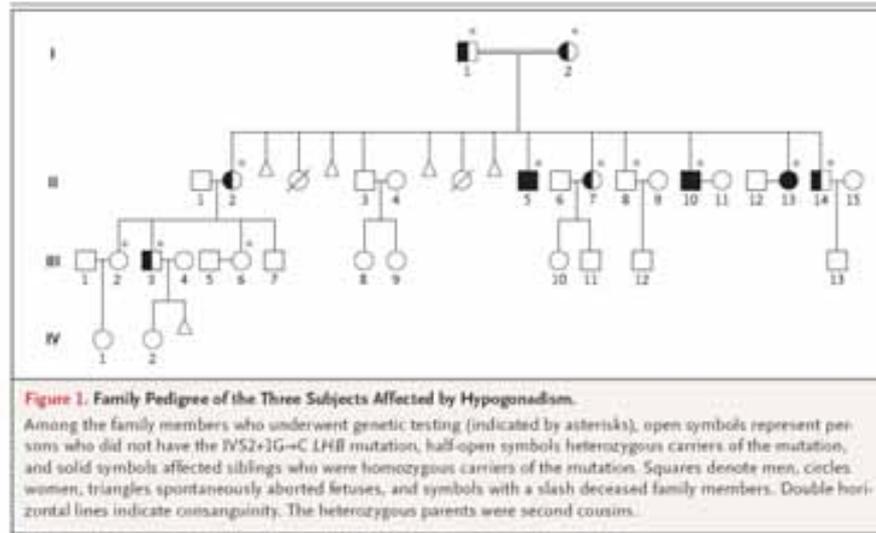
CASE REPORTS

The proband (Subject II-5) (Fig. 1), a 38-year-old Brazilian man born to consanguineous parents, was referred to the Endocrinology Unit of the University Hospital of Brasilia for hypogonadism. He presented with a eunuchoid habitus, a juvenile voice, and bilateral gynecomastia, with scant axillary hair and no facial hair (Tanner stage, genitalia 1 and pubic hair 4). He was 181 cm tall, weighed 87 kg, and had an arm span of 193 cm. He had a micropenis (4.5 cm in length; mean [±SD] normal length, 13.3±3.8) and underdeveloped, though descended, testes.

From the Section of Endocrinology, University Hospital of Brasilia, Faculty of Medicine (A.L.-P., L.A.G., P.P.N., L.A.C.), and the Molecular Pharmacology Laboratory, Faculty of Health Sciences (G.B.B., F.A.R.N.), University of Brasilia, Brasilia; the Sabin Institute and Laboratory of Clinical Analysis, Brasilia (G.B.B.); and the Developmental Endocrinology Unit, Hormone and Molecular Genetic Laboratory, São Paulo University Medical School, São Paulo (A.C.L.) — all in Brazil. Address reprint requests to Dr. Lofrano-Porto at the Hospital Universitário de Brasilia, Laboratório de Farmacologia Molecular, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Caixa Postal 04473, CEP 70.919-970, Brasilia DF, Brazil, or at adlofrano@unb.br.

Drs. Lofrano-Porto and Barra and Drs. Casulari and Neves contributed equally to this article.

N Engl J Med 2007;357:897-904.
Copyright © 2007 Massachusetts Medical Society.



The results of the initial laboratory tests are summarized in Table 1. The luteinizing hormone level was not detectable; both the baseline follicle-stimulating hormone level and the peak levels after administration of gonadotropin-releasing hormone were high (see the Methods section). The serum testosterone level was low, the free alpha-subunit level was elevated, and the inhibin B level was normal. The estradiol level was also normal. The proband had azoospermia. Ultrasonography showed heterogeneous, hypoechogenic testes with diffuse microlithiasis and confirmed the clinical finding of reduced testicular volume (right testis, 5.0 cm³; left testis, 4.6 cm³; normal volume, 15.0 to 25.0 cm³). Results of magnetic resonance imaging (MRI) of the brain and pituitary gland were normal. The karyotype was 46,XY.

A diagnosis of hypogonadism due to selective luteinizing hormone deficiency was made. Treatment with intramuscular testosterone (250 mg every 3 weeks) (Durateston, Akzo Organon) was initiated. Over a 12-month period, the testosterone induced virilization, penile growth to 9 cm in length, and an increase in testicular volume to 7.1 cm³ (right testis) and 6.6 cm³ (left testis), a total increase of 42.7%.

The proband's 30-year-old brother (Subject II-10) had been treated with intramuscular testosterone for hypogonadism from the age of 25 years. He reported considerable penile and testicular growth after treatment, but he continued to have

azoospermia. On admission to the endocrine unit, he had normal male genitalia with no gynecomastia; the Tanner stage was genitalia 5 and pubic hair 5, with a penile length of 9 cm. Ultrasonography revealed testicular volumes of 10.7 cm³ (right testis) and 8.2 cm³ (left testis). The hormonal profile was similar to that of his brother (Table 1). A testicular-biopsy specimen showed interstitial fibrous thickening, hypoplastic seminiferous tubules with a predominance of Sertoli cells, spermatogenic arrest, and an absence of Leydig cells.

The proband's 29-year-old sister (Subject II-13) presented with secondary amenorrhea and infertility. She had had spontaneous, normal pubertal development and menarche at the age of 13 years, followed by oligomenorrhea. Her weight was 56 kg, and her height 166 cm. She had normal breast and pubic-hair development (Tanner stage, mammary glands 5 and pubic hair 5). Ultrasonography of the pelvis revealed a normal uterus (volume, 50 cm³; normal range, 30 to 90), with atrophic endometrium (3 mm in thickness). The ovaries were normal in size (right ovary, 10 cm³; left ovary, 7 cm³) and contained multiple antral follicles (up to 13 mm in diameter) not restricted to the periphery (Fig. 2A). Serial ultrasonography of the pelvis over a 2-week period showed no changes in endometrial thickness or ovarian appearance. Repeated measurement of serum estradiol and progesterone showed levels within the low-to-normal range for the follicular phase.

Inhibin B and free alpha-subunit levels were elevated.

The sister also had undetectable luteinizing hormone levels, as measured by two assays (see the Methods section), whereas the follicle-stimulating hormone levels were normal (Table 1). Serum testosterone, androstenedione, dehydroepiandrosterone sulfate, prolactin, and human chorionic gonadotropin levels were all normal, as were the results of thyroid-function tests. After administration of gonadotropin-releasing hormone, luteinizing hormone levels remained undetectable, but the follicle-stimulating hormone level rose from 4.8 IU per liter to 6.8, 8.1, and 8.2 IU per liter after 15, 30, and 60 minutes, respectively (normal baseline range, 2.4 to 9.3; normal peak range after administration of gonadotropin-releasing hormone, 4.6 to 11.7). The pituitary and brain appeared normal on MRI. Therefore, we initiated estrogen-only replacement therapy (0.625 mg of estrogen per day; Premarin, Wyeth) for the first 3 months, followed by combined estrogen-progestagen (Trisequens, Medley). During this period, follow-up ultrasonography showed progressive endometrial thickening and follicle enlargement (Fig. 2B and 2C).

In addition to these 3 subjects, we studied 9 asymptomatic family members and 100 unrelated, ethnically matched controls (two alleles from each). Written informed consent was obtained from all participants. The study was approved by the Research Ethics Committee of the Faculty of Medicine, University of Brasilia, Brazil.

METHODS

HORMONAL ASSAYS

An immunofluorometric assay (AutoDELFIA, Wallace Oy) was used to measure luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, estradiol, testosterone, progesterone, and free alpha-subunit levels. Serum luteinizing hormone, estradiol, and progesterone levels were confirmed by a chemiluminescent immunometric assay (Immulite 2000, Euro DPC), which was also used to measure androstenedione and dehydroepiandrosterone sulfate levels, as well as the testosterone levels in female Subject II-13. Inhibin B was detected with the use of an enzyme-linked immunoassay (Active Inhibin B ELISA, Diagnostic Systems Laboratories). The intrassay and interassay variations were less than 8% and less than 10%, respectively, for all hormones. The gonadotropin-releasing hormone stim-

Table 1. Hormonal Data for Three Homozygotes with the IVS2+1G-C Mutation in the Luteinizing Hormone (LH) Beta-Subunit Gene.*

Subject No.†	Sex	Age‡	LH		FSH	Peak‡	Estradiol	Progesterone	Testosterone	Androstenedione	DHEAS	Free Alpha Subunit		Inhibin B
			Baseline	Peak‡								ng/dl	ng/ml	
II-5‡	M	38	ND	ND	20.4	28.7	<1‡		0.97			1736.9	107	
II-10‡	M	10	ND	ND	12.8	18.6	<1‡		1.88			1102.7	163	
II-13	F	29	ND	ND	4.8	8.2	44	0.44	0.27	2.5	303	1010.1	194	
Normal range														
M			1.0–8.4	12.0–29.7	0.6–10.5	2.9–7.8	ND–35		2.71–9.65			120.0–790.0	80–300	
F¶			2.2–6.8	7.6–11.7	2.4–9.3	4.6–11.7	22–215	0.33–1.20	0–0.99	0.3–3.3	34–430	80.0–604.0	15–90	

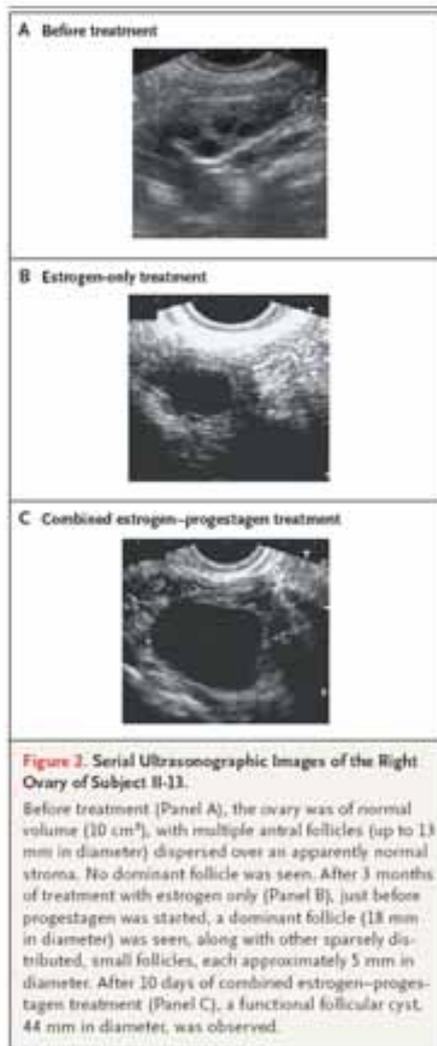
* To convert values for estradiol to picograms per milliliter, divide by 3.671; to convert values for progesterone to nanomoles per milliliter, multiply by 3.180; to convert values for testosterone to nanomoles per liter, multiply by 3.492; LH, follicle-stimulating hormone (FSH), estradiol, testosterone, progesterone, and free alpha-subunit levels were measured with an immunofluorometric assay (except for the testosterone level for the female Subject II-13, which was measured with a chemiluminescent immunometric assay). Androstenedione and dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) levels were measured — and serum LH, estradiol, and progesterone levels were confirmed — with a chemiluminescent immunometric assay. Inhibin B levels were measured with an enzyme immunoassay. ND denotes not detectable.

† The Tanner stage was as follows: for Subject II-5 before treatment, G1P4; for Subject II-10 after prolonged treatment with exogenous testosterone, G5P5; and for Subject II-13 before treatment, MSP5.

‡ The peak value was the maximum level measured within 90 minutes after intravenous administration of 100 µg of gonadotropin-releasing hormone.

§ The hormonal levels shown for the two male subjects were measured 60 days after discontinuation of treatment with exogenous testosterone. The pretreatment hormonal profile was similar in Subject II-5, except that the testosterone level was undetectable with the chemiluminescent immunometric assay.

¶ Normal values for the follicular phase are shown.



ulation test was performed in all three affected siblings. Serum luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone levels were measured 0, 15, 30, 60, and 90 minutes after intravenous administration of 100 μ g of gonadotropin-releasing hormone. Each result was compared with established normal values.⁸

DNA SEQUENCING AND ANALYSIS

Genomic DNA samples from subjects and controls were extracted from whole-blood specimens by the

Chelex-100 method.⁷ The region spanning exon 2, intron 2, and exon 3 of the *LHB* gene was amplified with the use of a polymerase-chain-reaction (PCR) assay, with primers designated as LH23F and LH23R, under previously described conditions.⁸ PCR products were sequenced in both the sense and antisense orientations, with the use of an automated sequencer (ABI-377, Perkin-Elmer). The primer LH23R has specific 3'-end mismatches in order to discriminate between *LHB* and the highly homologous human chorionic gonadotropin beta-subunit gene (*hCGB*) and pseudogenes. To investigate whether the identified mutation represented a polymorphism, the same *LHB*-gene fragment from 100 ethnically matched controls was amplified and digested with the *Nco*I restriction enzyme (Fermentas). This procedure, involving PCR and restriction-fragment-length polymorphism assays, was also used to analyze genomic DNA from family members of the three affected subjects.

AMPLIFICATION AND ANALYSIS OF LEUKOCYTE *LHB* mRNA

Since *LHB* mRNA, but not *hCGB* mRNA, was previously shown to be detectable by a reverse-transcriptase-PCR (RT-PCR) assay of unstimulated human blood leukocytes,⁹ we extracted total RNA from a 5-ml buffy-coat sample from each study participant, using Trizol (Invitrogen Life Technologies). To prevent contamination of genomic DNA, each sample was treated with RNase-free DNase I (Fermentas). Synthesis of complementary DNA was performed with the use of the LH23R primer and Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Promega). The complementary DNA (5- μ l samples) was subsequently amplified in advance of the PCR assay (35 cycles of 1 minute at 94°C, 1 minute at 60°C, and 1 minute at 72°C) with primers (3'5'-GCACCAAGGATGGAGATGCTCCAG-3' and LH23R) and GoTaq DNA Polymerase (Promega). Half-nested PCR was then performed with the preamplification product (1- μ l samples), the internal primer 1F5-GGCGGGGCATGGGCATCCAG-3', and the LH23R primer, under the preamplification conditions. The sequences and the specificity of the assay were verified by direct sequencing.

RESULTS

Automated DNA sequencing of exon 2, intron 2, and exon 3 of the *LHB* gene in the male proband, his affected brother, and his sister revealed a homozygous G→C substitution at the +1 position of

intron 2 (IVS2+IG→C), a 5' splice-donor site (Fig. 3). The effect of this substitution on splicing of the mRNA transcript is shown in Figure 4.

The asymptomatic parents (Subjects I-1 and I-2) of the affected subjects, two sisters (Subjects II-2 and II-7), one brother (Subject II-14), and one nephew (Subject III-3) were heterozygous for this mutation. All heterozygotes were fertile and had normal basal gonadotropin and sex-steroid levels for their ages, except the mother (Subject I-2), a 66-year-old woman, who had unexpectedly low serum luteinizing hormone levels for her menopausal state (Table S1 in the Supplementary Appendix, available with the full text of this article at www.nejm.org). The IVS2+IG→C mutation was not identified in any of the 200 alleles from the controls.

We detected RT-PCR products of the expected size in both the control and the normal heterozygotes (Fig. 5). In the affected homozygotes, a PCR product approximately 250 bp larger was consistently obtained. Direct sequencing of these amplicons revealed that the observed difference in size was due to the presence of the entire intron 2, containing 236 nucleotides. The larger PCR product was not detected in the heterozygotes (Fig. 5).

Results of the mRNA analysis of the affected siblings clearly suggest that the IVS2+IG→C mutation disrupted the splicing of intron 2 of the *LHB* mRNA, resulting in the insertion of 236 nucleotides in the mutant transcript (Fig. S1 in the Supplementary Appendix).

DISCUSSION

We report a homozygous mutation of the *LHB* gene associated with selective luteinizing hormone deficiency in three siblings, two men and one woman, who were members of a consanguineous Brazilian family. The IVS2+IG→C mutation is located in a noncoding intronic sequence affecting a conserved 5' splice-donor site.

Subject II-13, the woman with a luteinizing hormone deficiency, underwent normal pubertal feminization and thelarche, as have several women with a homozygous inactivating mutation in the luteinizing hormone-receptor gene.^{12,30} However, in contrast to those women, Subject II-13 had a uterus of normal size, allowing sporadic menses to occur during the first 14 years after menarche. Although the amount of estradiol produced throughout her life could not be quantified with certainty, it was sufficient for the development of

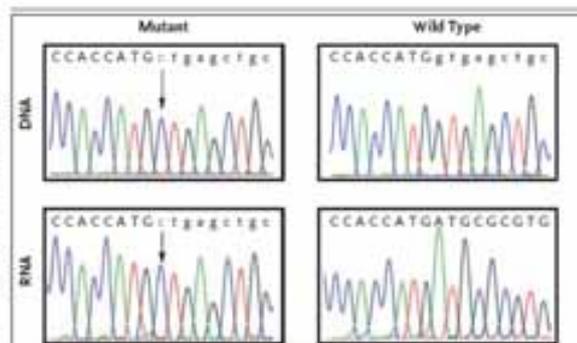


Figure 3. The IVS2+IG→C Mutation of the Luteinizing Hormone Beta-Subunit Gene (*LHB*).

Automated sequencing of genomic *LHB* DNA (top) and the messenger RNA (mRNA) transcript of *LHB* (bottom) from a homozygote with the mutation (Subject II-13) and a normal homozygote showed that the IVS2+IG→C mutation disrupts the splicing of mRNA. Capital letters indicate exonic sequences, lowercase letters intronic sequences, and gray type and arrows the mutation.

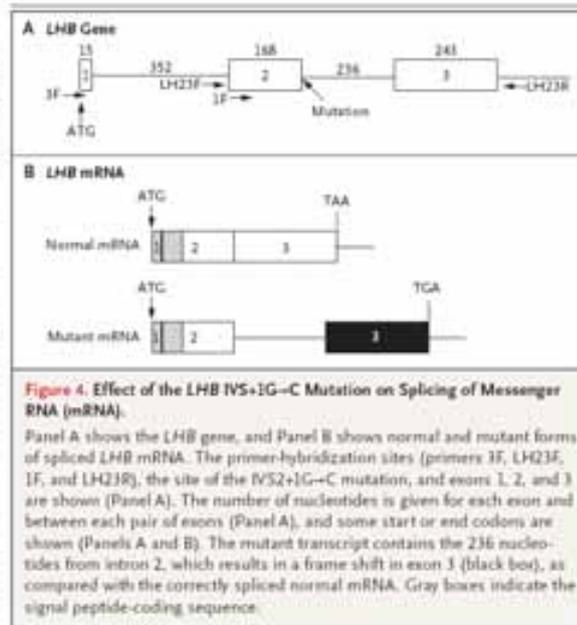


Figure 4. Effect of the *LHB* IVS2+IG→C Mutation on Splicing of Messenger RNA (mRNA).

Panel A shows the *LHB* gene, and Panel B shows normal and mutant forms of spliced *LHB* mRNA. The primer-hybridization sites (primers 3F, LH23F, IF, and LH23R), the site of the IVS2+IG→C mutation, and exons 1, 2, and 3 are shown (Panel A). The number of nucleotides is given for each exon and between each pair of exons (Panel A), and some start or end codons are shown (Panels A and B). The mutant transcript contains the 236 nucleotides from intron 2, which results in a frame shift in exon 3 (black box), as compared with the correctly spliced normal mRNA. Gray boxes indicate the signal peptide-coding sequence.

normal breasts and trophic uterine layers. In the absence of luteinizing hormone activity, the amount of androgenic substrates for aromatization to estradiol in granulosa cells would probably be limited,¹¹ which may have accounted for the low-to-

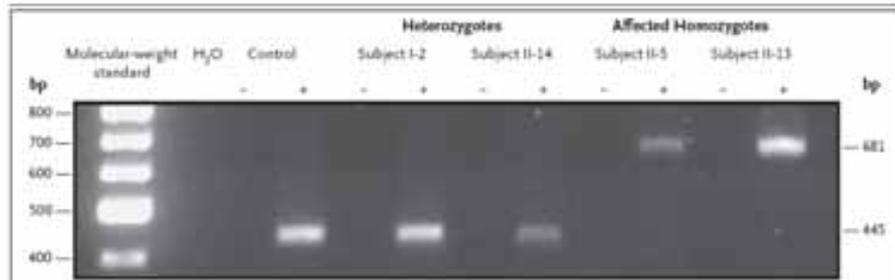


Figure 5. Results of Half-Nested Reverse-Transcriptase–Polymerase-Chain-Reaction (RT-PCR) Assay.

The 1F and LH23R primers were used. PCR products of the expected size were found for the control and heterozygotes, whereas a PCR product approximately 250 bp larger was found for affected Subject II-5 and Subject II-13. (The 5'-splice-site sequence of intron 2 of these larger products is shown in Figure 3.) The first lane shows the product from the size-standard sample; the second lane shows the product from water (negative control). Minus and plus signs indicate the product from RNA samples prepared without and with the reverse-transcriptase reaction step, respectively.

normal serum estrogen levels and endometrial atrophy in our subject. Accordingly, in mice lacking the luteinizing hormone beta-subunit expression of the majority of steroidogenic enzymes is significantly reduced, although differentiation of the ovarian thecal layer is not impaired.¹²

The amenorrhea and repeatedly low progesterone levels in Subject II-13 corroborate the essential roles of luteinizing hormone in ovulatory function. The finding of multicystic ovaries is consistent with follicular growth induced by follicle-stimulating hormone, as reflected by the elevated inhibin E levels, which may represent an increased number of healthy, early antral follicles.^{11,13} Taken together, these findings suggest that granulosa cells fail to maintain sufficient estradiol production, probably in relation to decreased luteinizing hormone-dependent secretion of androgenic precursors by thecal cells, whereas inhibin E production is spared. The high inhibin B levels, in turn, provide negative feedback for the secretion of follicle-stimulating hormone, accounting for the normal follicle-stimulating hormone levels in this subject.¹³

After supplementation with estrogen, the development of a dominant follicle (18 mm in diameter) was evident on ultrasonography, although ovulation remained impaired and no corpus luteum was observed. Given this woman's normal follicle-stimulating hormone level, these findings may indicate that estrogen or estrogen-related factors were the primary determinants of the follicular growth until the early preovulatory stage,

whereas luteinizing hormone activity was not necessary until that stage. We conclude that the *LHB* IVS2+1G→C mutation resulted in impairment of ovulation and corpus luteum function. As expected, this *LHB* mutation did not affect pubertal feminization, thereby permitting normal breast and uterine development.

The two affected men presented with hypogonadism and selective luteinizing hormone deficiency, in association with the absence of mature Leydig cells and spermatogenic arrest, corroborating previous descriptions of hypogonadism.^{3,4} This phenotype is similar to that of male *LHB*-knockout mice.¹² Surprisingly, both affected men had an increase in testicular volume after testosterone-replacement therapy. The key determinant of adult testicular size is the number of mature Sertoli cells, though immature cells may persist in patients with pathologic conditions, such as isolated hypogonadotropic hypogonadism.¹⁴ Since both follicle-stimulating hormone and testosterone increase the rate of proliferation and maturation of these cells,²⁴ the administration of exogenous testosterone may have contributed to the proliferation of Sertoli cells and to testicular growth in these men by acting synergistically with elevated follicle-stimulating hormone levels (a late compensatory mechanism).

The inhibin E levels in the two affected men were inappropriately normal, given the elevated follicle-stimulating hormone levels. In normal adults, inhibin E levels are positively correlated with the function of Sertoli cells and spermatog-

genic status.²¹ Although unusual, our findings are in keeping with those in previous studies showing that in boys, during the first pubertal years, basal inhibin B levels increase because of stimulation by follicle-stimulating hormone, in parallel with proliferation of Sertoli cells.²² Moreover, in patients with hypogonadotropic hypogonadism, baseline inhibin B levels have been shown to increase with increasing testicular volume.¹⁶ Two men previously described as having a luteinizing hormone deficiency also had elevated follicle-stimulating hormone levels,²³ and at least one had normal inhibin B levels.⁴

Previously described gonadotropin mutations are located in the coding region of the genes.^{24,25,27,28} However, mutations in exon-flanking intronic sequences have frequently been associated with disease.²² Our analysis of the *LHB* mRNA isolated from peripheral-blood leukocytes showed that the IVS2+1G→C mutation resulted in the inclusion of the entire intron 2 and, consequently, in disruption of the exon 3 reading frame. Furthermore, the mutation induced a gross abnormality in the *LHB* mRNA (Fig. S1 in the Supplementary Appendix). However, the mechanism accounting for the failure to detect abnormal transcripts in the heterozygotes, but not in the homozygotes, is unknown.

Common variants identified in the *LHB* gene are sometimes associated with pathologic conditions such as the polycystic ovary syndrome and infertility.²³ The absence of the IVS2+1G→C mutation in the 200 control chromosomes reinforces the fact that it is not a polymorphism.

On the basis of the mutant nucleotide sequence, the hypothetical aberrant protein would have an

insertion of 79 residues encoded by intron 2, which would severely affect its tertiary structure. In addition, the exon 3 frame shift results in a lack of domains required for heterodimer stability and receptor binding, such as the conserved "seat belt" region (amino acids 90 to 110) and disulfide bonds from the cysteine knot (Fig. S1 in the Supplementary Appendix).^{24,25} These observations strongly suggest that the mutant luteinizing hormone beta subunit would be incapable of correct assembly with the alpha subunit and therefore would not be secreted.

We conclude that the IVS2+1G→C mutation induced a gross abnormality in the processing of *LHB* mRNA, causing familial selective hypogonadotropic hypogonadism. The male phenotype was similar to those described previously, whereas the affected woman underwent apparently normal pubertal development, followed by secondary amenorrhea and chronic anovulation.

Supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (47940/2003-1, to Dr. Neves, and 30046/2005, to Dr. Latorraca), CNPq Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Subcomponente de Biotecnologia (62000/02-2, to Dr. Neves), Fundação de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico na Área da Saúde (to Dr. Neves), and Fundação de Empreendimentos Científicos e Tecnológicos (to Dr. Lozano-Porrot).

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

We thank Dr. Lawrence C. Layman, Medical College of Georgia, Augusta, for his helpful comments on an earlier version of this manuscript; Dr. Ceres Resende, University Hospital of Brasília, Brasília, Brazil, for performing transvaginal ultrasonography; Dr. Marcelo Serra, Centro de Diagnóstico por Imagem, Brasília, Brazil, for performing testicular ultrasonography; Dr. Luciana Alves, University of Brasília, Brazil, for helpful discussions about the affected subjects and hormonal assays; and staff at the Sabin Institute and Laboratory of Clinical Analysis, Brasília, Brazil, for providing technical assistance.

REFERENCES

- Thomson APN, Huhtaniemi IT. Mutations of gonadotropins and gonadotropin receptors: elucidating the physiology and pathophysiology of pituitary-gonadal function. *Endocr Rev* 2000;21:551-63.
- Latorraca AC, Anazi J, Aruboldi JR, et al. Testicular and ovarian resistance to luteinizing hormone caused by inactivating mutations of the luteinizing hormone-receptor gene. *N Engl J Med* 1996;334:507-12.
- Weiss J, Axelrod L, Whitcomb RW, Harris PE, Crowley WF, Jameson JL. Hypogonadism caused by a single amino acid substitution in the β subunit of luteinizing hormone. *N Engl J Med* 1992;326:179-83.
- Valdes-Socin H, Sahi R, Daly AF, et al. Hypogonadism in a patient with a mutation in the luteinizing hormone beta-subunit gene. *N Engl J Med* 2004;351:2619-25.
- Daly AF, Sahi R, Menage J, et al. Identification of a family harboring a novel LH beta-subunit mutation associated with hypogonadism. Presented at the annual meeting of the Endocrine Society, Boston, June 24-27, 2006, abstract.
- Leite VN, Batista MC, Borges ME, et al. Diagnostic value of fluorescent assays in the evaluation of precocious puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:3539-44.
- Walsh PS, Metzger LA, Higuchi R. Clonix 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Bio techniques* 1991;10:506-13.
- Shirahata K, Naito K. Fertile eunuch syndrome with the mutations (Trp>Arg and Ser>Thr) in the beta subunit of luteinizing hormone. *Endocr J* 2001;50:731-7.
- Heikkinen PE, Serlachius EM, Lintola M, Alfthan HW, Schröder JP, Semman UE. Expression of luteinizing hormone and chorionic gonadotropin beta-subunit messenger-RNA and protein in human peripheral blood leukocytes. *Mol Cell Endocrinol* 2000;162:79-85.
- Toledo SP, Ernster HG, Kraaj R, et al. An inactivating mutation of the luteinizing hormone receptor causes amenorrhea in a 46,XX female. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:3850-4.
- Richards JS, Russell LD, Ochsner S, et al. Novel signaling pathways that control

BRIEF REPORT

- ovarian follicular development, ovulation, and luteinization. *Recent Prog Horm Res* 2002;57:195-220.
12. Ma X, Dong Y, Marzuk MM, Kumar TR. Targeted disruption of luteinizing hormone beta-subunit leads to hypogonadism, defects in gonadal steroidogenesis, and infertility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:17294-9.
 13. Laven JSF, Fauser BCJM. Inhibins and adult ovarian function. *Mol Cell Endocrinol* 2004;225:37-44.
 14. Sharpe RM, McKinnell C, Kjelin C, Fisher B. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction* 2003;125:769-84.
 15. Meacham SJ, Hirschlag E, Simoni M. Inhibin B in male reproduction: pathophysiology and clinical relevance. *Eur J Endocrinol* 2001;145:561-71.
 16. Hacheigali LB, Boepple DA, Seminara DK, et al. Inhibin B secretion in males with gonadotropin-releasing hormone (GnRH) deficiency before and during long-term GnRH replacement: relationship to spontaneous puberty, testicular volume, and prior treatment— a Clinical Research Center study. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:7520-5.
 17. Layman LC, Porto ALA, Xie L, et al. FSH beta gene mutations in a female with partial breast development and a male sibling with normal puberty and azoospermia. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:3702-7.
 18. Lindstedt G, Hystrom E, Matthews C, Ernest I, Janson PO, Chatterjee K. Follitropin (FSH) deficiency in an infertile male due to a mutation in the beta-subunit of follicle-stimulating hormone: a syndrome of normal puberty and virilization but underdeveloped testicles with azoospermia, low FSH but high luteinizing hormone and normal serum testosterone concentrations. *Clin Chem Lab Med* 1998;36:663-5.
 19. Matthews CH, Korgato S, Beck-Peccoz P, et al. Primary amenorrhea and infertility due to a mutation in the beta-subunit of follicle-stimulating hormone. *Am Genet* 1993;5:83-4.
 20. Layman LC, Lee EJ, Peak KB, et al. Delayed puberty and hypogonadism caused by mutations in the follicle-stimulating hormone beta-subunit gene. *N Engl J Med* 1997;337:667-11.
 21. Phillip M, Arbel JE, Segov Y, Parrini E. Male hypogonadism due to a mutation in the gene for the beta-subunit of follicle-stimulating hormone. *J Clin Endocrinol* 1998;338:1729-32.
 22. Xing Y, Wang Q, Lee C. Evolutionary divergence of exon flanks: a dissection of instability and selection. *Genetics* 2006;173:1787-91.
 23. Lamminen T, Hahtaniemi I. A common genetic variant of luteinizing hormone; relation to normal and aberrant pituitary-gonadal function. *Eur J Pharmacol* 2001;414:1-7.
 24. Laphorn AJ, Harris LC, Littlejohn A, et al. Crystal structure of human chorionic gonadotropin. *Nature* 1994;369:455-61.
 25. Marzuk MM, Spangler MM, Camel M, Saganuma H, Boime I. Mutagenesis and chimeric genes define determinants in the beta subunit of human chorionic gonadotropin and luteinizing hormone for secretion and assembly. *J Cell Biol* 1989;109:1429-38.

ELECTRONIC ACCESS TO THE JOURNAL'S CUMULATIVE INDEX

At the Journal's site on the World Wide Web (www.nejm.org), you can search an index of all articles published since January 1975 (abstracts 1975-1992, full text 1993-present). You can search by author, key word, title, type of article, and date. The results will include the citations for the articles plus links to the full text of articles published since 1993. For nonsubscribers, time-limited access to single articles and 24-hour site access can also be ordered for a fee through the Internet (www.nejm.org).