



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA

*Mecanismo de Ação do Receptor do Hormônio
Tireoideano Beta 1: Caracterização Molecular e
Funcional da Região de Dobradiça e Influência do
Receptor do Ácido 9-cis Retinóico*

Rutnéia de Paula Pessanha

Brasília

2007

Rutnéia de Paula Pessanha

*Mecanismo de Ação do Receptor do Hormônio Tireoideano
Beta 1: Caracterização Molecular e Funcional da Região de
Dobradiça e Influência do Receptor do Ácido 9-cis
Retinóico*

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Patologia Molecular, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, para obtenção do grau de Doutor em Patologia Molecular.

Orientador: Prof. Francisco de A. Rocha Neves

Brasília

2007

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Farmacologia Molecular, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, sob a orientação do Prof. Francisco de A. Rocha Neves, com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e da Fundação de Empreendimentos Científicos e Tecnológicos (Finatec).

**Dedico este trabalho ao Prof. Ralf
Carvalho Justiniano Ribeiro por sua
dedicação à ciência.**

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar quero agradecer a Deus pelas oportunidades diárias de crescimento pessoal, profissional e espiritual.

Ao professor Ralff Carvalho Justiniano Ribeiro, que apesar da ausência física está sempre presente em nossos corações.

Ao professor Francisco de Assis Rocha Neves por ter encarado a árdua batalha de prosseguir, superando os obstáculos e dando continuidade ao projeto iniciado junto com o professor Ralff.

Aos membros da família Simeoni, Luiz e Cristina, pela amizade, apoio e colaboração na execução desse trabalho.

À amiga Marie Togashi, pelos conselhos pessoais e profissionais, companheirismo e disponibilidade.

Ao professor John D. Baxter e Paul Web pelo suporte financeiro, valiosas discussões científicas e incentivo ao nosso trabalho.

À amiga Rilva pelos sete anos de agradável convivência, amizade e carinho em todos os momentos.

Às amigas, Karime, Priscila e Sabrina, pelo apoio na realização dos experimentos.

Às amigas, Adriana, Alessandra, Ana Caroline, Angélica, Carol Perdigão, Daniela, Fanny, Isabel, Karime e Thaís, pelo convívio diário, que muito me ajudou a superar todos os obstáculos e por compartilhar comigo vários momentos felizes. Ao amigo Gustavo pelas discussões científicas, convivência amiga e solicitude no compartilhamento das técnicas.

À todos os alunos que passaram pelo Laboratório de Farmacologia Molecular nestes sete anos, pelas trocas de experiências e convívio amigo. Em especial aos amigos, Marlon, Tiago e Roberto Carlos e as amigas, Alice, Angélica, Elaine, Lara e Manuela.

Ao meu esposo Ranieri, pela compreensão, apoio, incentivo e por todos os momentos felizes compartilhados. Ao meu filho Fernando que participou de forma ativa na execução desse trabalho e por todas as alegrias que ele tem nos proporcionado.

À minha mãe pelo apoio em todos os sentidos, o que proporcionou que eu pudesse concluir este trabalho.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente na execução desse trabalho. Muito obrigado!

SUMÁRIO

Folha de Rosto.....	i
Apoio Financeiro.....	ii
Dedicatória.....	iii
Agradecimentos.....	iv
Sumário.....	v
Lista de Abreviaturas.....	viii
Resumo.....	x
Abstract.....	xi
Prefácio.....	xii

INTRODUÇÃO.....	1
Superfamília dos Receptores Nucleares.....	1
Domínios Funcionais dos Receptores Nucleares.....	4
Receptores dos Hormônios Tireoideanos.....	8
Mecanismo de Ação dos Receptores dos Hormônios Tireoideanos.....	10
Importância da Região de Dobradiça na Ligação do Receptor do Hormônio Tireoideano ao DNA.....	13
Influência do Receptor do Ácido 9-cis Retinóico no Mecanismo de Ação do Receptor do Hormônio Tireoideano nos Diferentes Elementos Responsivos.....	20
OBJETIVOS.....	25
Objetivo Geral.....	25
Objetivos Específicos.....	25
MATERIAL E MÉTODOS.....	26
Mutações no TR β 1 humano usadas neste estudo.....	26
Mutações na região T-box.....	26
Deleção da alça localizada entre as hélices 1 e 2 do LBD.....	27
Mutações no RXR α humano usadas neste estudo.....	28
Deleção da região T-box e da alça localizada entre o final do DBD e a hélice 1 do LBD.....	29
Outros Vetores Utilizados.....	30
Genes Repórteres.....	30

Cultura de Células, Transfecção e Ensaio da Atividade da Enzima Luciferase.....	31
Cálculo da Taxa de Ativação da Transcrição e Análise Estatística.....	33
Transcrição e Tradução <i>in vitro</i>	33
Eletroforese de Proteínas em Gel de Poliacrilamida com Sulfato Duodecil Sódico (SDS-PAGE).....	34
Ensaio de Ligação Proteína-DNA (<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>).....	34
RESULTADOS	36
Importância da região de dobradiça na ligação do receptor do hormônio tireoideano ao DNA.....	36
Análise das mutações na região T-box do TR β 1 humano.....	37
Resposta ao T ₃ mediada pelos mutantes da região T-box do TR β 1 humano em células U937.....	38
Análise da deleção da alça localizada entre as hélices 1 e 2 do LBD do TR β 1 humano..	39
Resposta ao T ₃ mediada pela deleção da alça localizada entre as hélices 1 e 2 do LBD do TR β 1 humano em células U937.....	40
Análise da deleção da região T-box e da alça localizada entre o final do DBD e a hélice 1 do LBD do RXR α humano.....	42
Resposta ao T ₃ mediada pela deleção da região T-box e da alça localizada entre o final do DBD e a hélice 1 do LBD do RXR α humano em células COS-1.....	44
Análise do efeito compensatório das mutações realizadas no TR β 1 e RXR α humanos..	46
Influência do receptor do ácido 9-cis retinóico no mecanismo de ação do receptor do hormônio tireoideano nos diferentes TRES.....	49
Avaliação do efeito de RXR na ação do TR nos diferentes elementos responsivos.....	50
Avaliação dos mecanismos moleculares envolvidos na modulação do receptor do hormônio tireoideano pelo RXR.....	52
DISCUSSÃO	57
Importância da Região de Dobradiça na Ligação do Receptor do TR aos diferentes elementos responsivos.....	57
Influência do RXR no Mecanismo de Ação do TR nos Diferentes Elementos Responsivos.....	65
CONCLUSÃO	70
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

ANEXOS	87
<i>Anexo I: Thyroid Hormone Response Element Organization Dictates the Composition of Active Receptor</i>	
<i>Anexo II: Effects of Retinoid X Receptor (RXR) upon Thyroid Hormone Action: Influence of Thyroid Response Elements and RXR Concentration in Solution</i>	

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>A-box</i> , caixa A	GAL-ERE, elemento responsivo do GAL-4
AF-1, função de ativação 1	GAL-4, fator de transcrição de leveduras
AF-2, função de ativação 2	GR, receptor de glicocorticóide
AR, receptor de androgênio	GRIP-1, proteína 1 que interage com o GR
cAMP, adenosina monofosfato cíclica	GST, glutathione S transferase
CAR, receptor constitutivo dos androstanos	HDAC, complexo de desacetilase das histonas
CBP, proteína que se liga a CREB	<i>Hinge</i> , dobradiça
cDNA, DNA complementar	HRE, elemento responsivo ao hormônio
c-erbA, gene nativo homólogo ao oncogene viral (v-erbA)	HSP, proteína de choque térmico
CMV, citomegalovírus	kDa, kilodalton
COA, co-ativador	LBD, domínio de ligação ao ligante
<i>Cor-box</i> , região de ligação a co-repressores	LUC, luciferase
COS-1, células derivadas de fibroblastos de rim de macaco	LXR, receptor hepático X
CREB, proteína que se liga ao elemento responsivo cAMP	MR, receptor de mineralocorticóide
CTE, extensão carboxi-terminal	mRNA, RNA mensageiro
<i>D-box</i> , caixa D	N-Cor, co-repressor do receptor nuclear
DBD, domínio de ligação ao DNA	NGFI-B, receptor induzido pelo fator de crescimento B do nervo
dNTP, nucleotídeos sintéticos	NH ₂ -t, domínio amino-terminal
DR, repetição direta (DR-1 a DR-5)	NLS, sinal de localização nuclear
DR-4, TRE repetição direta	PAGE, eletroforese em gel de poliacrilamida
<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i> , Ensaio de Ligação Proteína-DNA	<i>P-box</i> , caixa P
ER, receptor de estrogênio	PBS, solução salina tamponada com fosfato
F2, TRE palíndromo invertido	pCAF, fator associado a p300/CBP
FXR, receptor do farnesóide X	pCIP, proteína associada ao co-integrador p300/CBP

PCR, reação da polimerase em cadeia
PPAR, receptor dos proliferadores peroxissomais
PR, receptor de progesterona
Primer, iniciador
PXR, receptor do pregnano X
RAR, receptor do ácido all-trans retinóico
RMN, ressonância magnética nuclear
Rev-erb, receptor órfão reverso ao v-erbA
rGH, gene do hormônio de crescimento de ratos
RHT, resistência ao hormônio tireoideano
RID, domínio de interação com o receptor
RNAsin, inibidor de RNase
RXR, receptor do ácido 9-cis retinóico
SDS, sulfato duodecil sódico
Sin3, co-repressor com atividade de desatilação das histonas
siRNA, pequeno RNA de interferência
SMRT, mediador silencioso para o TR e o RAR
splicing alternativo, processamento alternativo
SRC-1, co-ativador 1 do receptor de esteróide
T₃, tri-iodo-L-tironina
T₄, tetra-iodo-L-tironina
Tampão TEA, tampão com Tris-base, EDTA e acetato de sódio
T-box, caixa T
TEMED, tetrametiletilenodiamina
TK, timidina cinase
TR, receptor do hormônio tireoideano
TRBP, proteína que se liga ao TR
TRE, elemento responsivo ao hormônio tireoideano
TREpal, TRE palíndromo
U2OS, células de osteosarcoma humano
U937, células promonocíticas humanas
VDR, receptor da vitamina D
v-erbA, vírus da eritroblastose aviária
Zinc fingers, dedos de zinco
Wild type (wt), nativo
9-cis-RA, ácido 9-cis retinóico

RESUMO

Os receptores do hormônio tireoideano (TRs) são proteínas constituídas pelos seguintes domínios: amino-terminal, domínio de ligação ao DNA (DBD) e o domínio de ligação ao ligante (LBD). A região que conecta o DBD ao LBD supostamente age como uma dobradiça. O TR se liga ao DNA como homodímeros ou heterodímeros tendo como parceiro o receptor do ácido 9-cis retinóico (RXR). Estes dímeros pré-formados se ligam aos elementos responsivos (TREs) independente da orientação das bases AGGTCA. O TR reconhece três diferentes TREs: repetições diretas (DR-4: AGGTCAN4AGGTCA); palíndromos (TREpal: AGGTCATGACCT) e palíndromos invertidos (F2: TGACCTN6AGGTCA). Desta forma, para que os receptores se liguem especificamente aos TREs em diferentes orientações, especula-se a necessidade que os DBDs girem em até 180 graus em relação aos LBDs. Para isto, a região que conecta o DBD ao LBD deve atuar como uma dobradiça permitindo tal movimento de rotação. Com o objetivo de investigar qual região corresponderia à dobradiça foram realizadas mutações em diferentes regiões do TR β 1, região T-box (aminoácidos 175 a 180) e alça que conecta as hélices 1 e 2 do LBD (aminoácidos 233 a 238), e do RXR α , região T-box (aminoácidos 201 a 209) e alça que conecta o final do DBD a primeira hélice do LBD (aminoácidos 225 a 232). Foram realizados ensaios de ligação proteína-DNA utilizando proteínas sintetizadas *in vitro* TR e RXR, nativo e mutantes, marcados ou não com ³⁵S-metionina, e oligonucleotídeos sintéticos contendo os diferentes TREs: DR4, TREpal e F2. Para o estudo funcional foram realizados ensaios de co-transfecção em células U937 e COS-1 com vetores de expressão para o TR e/ou RXR, nativos e mutantes, e plasmídeos contendo cada um dos elementos responsivos (DR-4, F2, TREpal ou DR-1) associados ao gene repórter da luciferase. Embora as mutações na região T-box do TR tenham influenciado a capacidade do receptor em se ligar ao DNA, principalmente como homodímero, e tenha reduzido drasticamente a atividade transcrricional em F2, nós sugerimos que essa não seja a região de dobradiça, e sim uma região importante para a ligação de homodímeros. As outras regiões estudadas no TR e/ou RXR não influenciaram a ligação dos receptores aos diferentes TREs e a ativação da transcrição em resposta ao T₃, sugerindo que estas regiões não atuam como uma dobradiça nestes receptores. Como os resultados com a deleção da região T-box do TR sugeriram que há uma ligação preferencial aos diferentes TREs, mais especificamente de homodímeros em F2, nós analisamos se o aumento dos níveis intracelulares de RXR poderia exercer um efeito modulatório seletivo em cada elemento responsivo em resposta ao T₃. Para verificar essa possibilidade, foram realizados experimentos de co-transfecção e gene repórter em células U937. A co-transfecção de RXR inibiu a resposta mediada por T₃ em F2 e TREpal, mas não em DR-4. Nós analisamos se esse efeito ocorria pela ligação direta de heterodímeros ao DNA, pelo seqüestro de co-ativadores em solução ou pelo seqüestro de TR em solução. Nossos resultados demonstraram que dependendo do contexto do DNA, o RXR exerce um efeito modulatório sobre o mecanismo de ação do TR. Em F2, esse efeito aparentemente ocorre de forma indireta pelo seqüestro de TR em solução diminuindo a sua disponibilidade para se ligar como homodímeros nesse elemento responsivo. Por outro lado, em TREpal o efeito modulatório se daria tanto pela ligação direta de heterodímeros ao DNA, quanto indireta pelo seqüestro de TR em solução, ambos devido ao fato deste elemento responsivo ser o sítio preferencial para a ligação de monômeros.

ABSTRACT

Thyroid hormone receptors (TRs) are proteins comprised by modular domains: amino-terminal domain, DNA-binding domain (DBD) and ligand-binding domain (LBD). The region that connects the DBD to LBD is supposed act as a hinge. The TR binds to DNA, as homodimers or heterodimers, with the 9-cis retinoic acid receptor (RXR). These dimers pre-formed binding to responsive elements (TREs) independent of the bases AGGTCA orientation. TR recognizes three different TREs: direct repeat (DR-4: AGGTCA₄AGGTCA), palindromic (TRE_{pal}: AGGTCATGACCT) and inverted palindromic (F2: TGACCCN₆AGGTCA). In such a way, for receptors binding specifically in TREs with different orientations, would be necessary that the DBDs must be rotated in respect to the LBDs. Thus, the region that connects the DBD to LBD should act as a hinge. With the aim of investigate which region correspond to the hinge it performed mutations in different regions of the TR β 1 T-box region (amino acids 175 to 180) and the loop that connects the LBD helices 1 and 2 (amino acids 233 to 238), and of the RXR α T-box region (amino acids 201 to 209) and the loop that connects the end of DBD to the first helix of LBD (amino acids 225 to 232). Electrophoretic Mobility Shift Assays were performed using translated *in vitro* proteins TR and RXR, wild type and mutants, labeled or not with ³⁵S-methionine, and synthetic oligonucleotides with the different TREs: DR4, F2 and TRE_{pal}. For functional study, U937 and COS-1 cells were co-transfected with TR and/or RXR, wild type and mutants, expression vectors and plasmids with each one of the TREs (DR4, F2 or TRE_{pal}) associated with a luciferase reporter gene. Even so, the mutations in the TR T-box had influenced the ability of the receptor to binding to DNA, and drastically decreased the transcriptional activity on F2, we suggested that this region not be the hinge, it seems important to the homodimers binding on DNA. The other regions studied in TR and/or RXR not influenced the receptor binding to different TREs and the transcription activation mediated by T₃, suggesting that these regions did not act as a hinge in these receptors. As the results with the TR T-box deletion suggested that there is a preferential binding to different TREs, specifically homodimers on F2, we analyzed whether the increase of intracellular levels of RXR could be exert a selective modulator effect in each responsive element in response to T₃. To verify this possibility, it performed co-transfections and gene reporter assays in U937 cells. The RXR co-transfection inhibited the response mediated by T₃ on F2 and TRE_{pal}, but not on DR-4. We analyzed whether this effect occurs by direct binding of heterodimers to DNA, by coactivators sequester in solution or by TR sequester in solution. Our results demonstrated that RXR exerts a modulator effect upon TR action dependent of the DNA context. On F2, this effect apparently occurs in an indirect form by TR sequestration in solution decreasing its availability to binding as homodimers in this responsive element. On the other hand, on TRE_{pal} the modulator effect would be by direct binding of heterodimers to DNA, or indirect by TR sequestration in solution, both due as this responsive element to be the preferential site to monomers binding.

PREFÁCIO

Os hormônios tireoideanos têm um papel fundamental na diferenciação, crescimento e metabolismo dos vertebrados, modificando inúmeras funções em nosso organismo, tais como, controle da taxa metabólica, utilização de glicose, termogênese, função cardíaca, metabolismo lipídico, desenvolvimento do sistema nervoso central, entre outras. No interior da célula, o hormônio tireoideano liga-se a receptores específicos localizados no núcleo, os receptores do hormônio tireoideano (TRs) que irão mediar as suas ações.

A primeira parte desta tese trata da importância da região de dobradiça para a ligação do TR aos diferentes elementos responsivos (TREs). Os TRs são proteínas constituídas pelos seguintes domínios: amino-terminal, domínio de ligação ao DNA (DBD) e o domínio de ligação ao ligante (LBD). A região que conecta o DBD ao LBD supostamente age como uma dobradiça.

O TR se liga ao DNA como homodímeros ou heterodímeros tendo como parceiro o receptor do ácido 9-cis retinóico (RXR). Estes dímeros pré-formados se ligam aos elementos responsivos (TREs) independente da orientação das bases AGGTCA. O TR reconhece três diferentes TREs: repetições diretas (DR-4: $\overrightarrow{\text{AGGTCA}}\text{N4}\overleftarrow{\text{AGGTCA}}$), palíndromos (TREpal: $\overrightarrow{\text{AGGTCA}}\overleftarrow{\text{TGACCT}}$) e palíndromos invertidos (F2: $\overleftarrow{\text{TGACCT}}\text{N6}\overrightarrow{\text{AGGTCA}}$). Desta forma, para que os DBDs se liguem especificamente aos TREs em diferentes orientações, especula-se a necessidade que os DBDs girem em até 180 graus em relação aos LBDs. Para isto, a região que conecta o DBD ao LBD deve atuar como uma dobradiça permitindo tal movimento de rotação.

Com o objetivo de investigar qual região corresponderia à dobradiça foram realizadas mutações em diferentes regiões do TR β 1 e RXR α humanos. Supõe-se que a deleção da região de dobradiça limitaria a ligação do TR apenas ao TRE que mantivesse a ligação específica entre as bases AGGTCA e os aminoácidos do DBD.

Para avaliar a capacidade dos mutantes em se ligar aos diferentes TREs e ativar a transcrição, plasmídeos de expressão do TR e RXR nativos e mutantes foram utilizados para a síntese *in vitro* de proteínas cuja função foi analisada por ensaios de ligação proteína-DNA (*Gel Shift Assays*) e também por ensaios de co-transfecção transitória em células U937 e COS-1 utilizando diferentes elementos responsivos ligados ao gene repórter da luciferase.

Nenhuma das regiões estudadas por nós, tanto no TR (aminoácidos 175 a 180 e 233 a 238), quanto no RXR (aminoácidos 201 a 209 e 225 a 232), corresponderam à região de dobradiça. Desta forma, especulamos três possibilidades para explicar a ligação do TR aos diferentes TREs: 1) o TR e o RXR não têm uma região específica com função de dobradiça, e o que na verdade ocorre é uma adaptação global das proteínas de forma a permitir a sua ligação aos diferentes elementos responsivos; 2) não há região de dobradiça e desta forma, os contatos dos complexos de TR/TR e TR/RXR seriam ótimos para um dos TREs, enquanto nos outros, um dos receptores estaria se ligando de forma inespecífica ou mais fraca; e 3) a região de dobradiça está localizada em outra região do TR e/ou do RXR. Estes resultados referentes às supostas regiões de dobradiça, do TR e do RXR, irão gerar um terceiro artigo que no momento está sendo elaborado.

Uma das supostas regiões de dobradiça estudadas foi a região conhecida como T-box. Essa região faz parte do DBD, mais especificamente da extensão carboxi-terminal (CTE). A deleção dessa região do TR ocasionou uma redução na capacidade de ligação do TR ao DNA na forma de heterodímeros e uma completa ausência da ligação de homodímeros. Surpreendentemente, os ensaios funcionais demonstraram que a deleção da T-box ocasionou uma significativa redução na atividade transcricional apenas em F2, sugerindo que a ativação nesse elemento ocorre via homodímeros. Apesar desse resultado, nós acreditamos que essa não seja a região de dobradiça, e sim, uma região importante para a ligação de homodímeros permitindo o posicionamento adequado da A-box e conseqüentemente seu contato com as bases na fenda menor do DNA.

Esse resultado forneceu mais um indício de que possa haver uma ligação preferencial dos complexos de TR, monômeros, homodímeros e heterodímeros, aos diferentes elementos responsivos e foi incorporado ao nosso artigo ***“Thyroid Hormone Response Element Organization Dictates the Composition of Active Receptor”*** publicado em abril de 2007 no periódico ***“Journal Biological Chemistry”*** (anexo I).

O RXR tem sido descrito como um receptor nuclear altamente promíscuo, capaz de formar heterodímeros com diversos receptores nucleares. Desta forma, supõe-se que a heterodimerização com o RXR aumente a atividade transcricional destes receptores, porém, não é sabido se isso ocorre em todos os elementos responsivos ou contextos celulares.

Como os resultados com a deleção da região T-box do TR sugeriram que há uma ligação preferencial nos diferentes TREs, mais especificamente de homodímeros em F2,

nós pensamos que o aumento dos níveis intracelulares de RXR poderia exercer um efeito modulatório seletivo em cada elemento responsivo em resposta ao T₃. Para verificar essa possibilidade, nós realizamos experimentos de co-transfecção e gene repórter em células U937. Nossos resultados prévios demonstraram que a superexpressão de RXR inibiu a ação do TR em F2, mas não em DR-4, fortalecendo a idéia de que os homodímeros estariam se ligando de forma seletiva em F2 e os heterodímeros em DR-4 (anexo I).

Juntos estes resultados foram de fundamental importância para demonstrar que a ligação dos diferentes complexos do receptor do hormônio tireoideano (TR), monômeros, homodímeros e heterodímeros, varia de acordo com o contexto do DNA.

A relevância do efeito modulatório do RXR sobre a ação do TR nos induziu a investigar o mecanismo molecular pelo qual o receptor RXR estaria exercendo esse efeito nos diferentes elementos responsivos (DR-4, F2 e TREpal). Esses resultados nos permitiram elaborar um segundo artigo, *“Effects of Retinoid X Receptor (RXR) upon Thyroid Hormone Action: influence of thyroid response element and RXR concentration in solution”* que se encontra em fase final de revisão e será submetido à publicação no periódico *“Molecular Pharmacology”* (anexo II).

Os resultados apresentados na segunda parte desta tese demonstraram que o RXR exerce um efeito modulatório sobre o mecanismo de ação do TR dependendo do contexto do DNA. Inicialmente, confirmamos os resultados prévios, ou seja, a co-transfecção de RXR inibiu a resposta mediada por T₃ em F2, mas não em DR-4, e também demonstramos que essa inibição ocorre em TREpal.

Em seguida, resolvemos examinar se o efeito modulador de RXR poderia ser via competição pela ligação de heterodímeros (RXR/TR) ao DNA ou pelo seqüestro de co-ativadores em solução. Os resultados sugerem que o RXR não modula a ação do TR em F2 pela ligação direta de heterodímeros ao DNA ou pelo seqüestro de co-ativadores em solução. Ao contrário, em TREpal, os resultados sugerem que o efeito modulatório se dá pela ligação de heterodímeros (TR/RXR) ao DNA.

Por último, nós examinamos se o RXR estaria seqüestrando TR em solução. Nossos resultados demonstraram que o RXR estava seqüestrando TR em solução, e diminuindo a sua disponibilidade para formar homodímeros em F2, ou diminuindo a disponibilidade de TR e favorecendo a ligação de monômeros de TR em TREpal.

Em suma, a ligação das diferentes formas oligoméricas em cada um dos elementos responsivos é um mecanismo complexo e ainda não totalmente elucidado. Nossos

resultados não nos permitem concluir como se dá a ligação das formas oligoméricas de TR aos diferentes elementos responsivos. Atualmente, ainda não se conhecem todos os genes regulados por T_3 , o que dificulta prever qual a natureza do elemento responsivo (repetições diretas, palíndromos, palíndromos invertidos, ou elementos múltiplos) e qual forma oligomérica será recrutada. A afinidade de cada complexo oligomérico pelo DNA, pelo ligante e pelos co-reguladores provavelmente é diferente. Além disso, a elucidação da necessidade ou não de uma região específica com função de dobradiça é importante para a compreensão de como ocorre a ligação aos diferentes TREs, e como seria a ligação de trímeros ou pentâmeros ao DNA.

A compreensão de todos esses fatores pode no futuro contribuir para o desenvolvimento de estratégias farmacológicas que permitam o desenvolvimento de ligantes mais específicos e a ligação seletiva aos elementos responsivos, conseqüentemente limitando a ação do TR a determinados genes alvo.

INTRODUÇÃO

Os hormônios tireoideanos têm um papel fundamental na diferenciação, crescimento e metabolismo dos vertebrados ^{1; 2; 3}. A ação ou produção do hormônio tireoideano têm efeito em diversas funções, tais como o controle da taxa metabólica, utilização de glicose, termogênese, função cardíaca, metabolismo lipídico, desenvolvimento do sistema nervoso central, entre outras ^{2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 11}.

A principal forma do hormônio tireoideano secretada pela glândula tireóide é a 3,5,3',5'-tetra-iodo-L-tironina (tiroxina ou T₄) e uma menor quantidade é secretada como 3,5,3'-tri-iodo-L-tironina (T₃). O total plasmático de T₄ é cerca de 40 vezes maior que o de T₃ (90nM versus 2nM) ². A principal fonte de produção de T₃, que é a forma ativa do hormônio nas ações nucleares, ocorre através da conversão de T₄ em T₃ pela 5' desidiação de T₄ nos tecidos periféricos ¹². Assim, o T₃ derivado destas fontes é responsável pela maioria das ações genômicas dos hormônios tireoideanos ^{1; 2; 4; 5; 6; 13; 14; 15}.

Uma vez secretados, os hormônios tireoideanos circulam comumente ligados a proteínas plasmáticas, ainda que 0,03% de T₄ e 0,3% de T₃ estejam livres ^{1, 2}. A ligação destes hormônios às proteínas plasmáticas aumenta suas meias-vidas e assegura uma distribuição regular do hormônio nos tecidos alvos ¹⁶. A entrada e a saída do hormônio nas células ocorrem, em uma menor parcela, por difusão passiva ¹, e a outra principal através de transportadores específicos que regulam a captação e o efluxo dos hormônios tireoideanos ^{17; 18; 19; 20; 21}. No interior da célula, o T₃ liga-se a receptores específicos localizados no núcleo, os receptores do hormônio tireoideano (TRs) ^{3, 4, 22}.

Os receptores possuem duas funções distintas, reconhecer o hormônio ou ligante e propagar a informação transmitida por este ligante. O reconhecimento ocorre com a ligação específica entre o hormônio e o receptor que é caracterizada por alta afinidade ¹⁴. Uma vez ligados aos hormônios, os receptores iniciam uma seqüência de eventos bioquímicos que terminam por promover na célula a resposta à ação hormonal ³.

Superfamília dos Receptores Nucleares

Os receptores do hormônio tireoideano pertencem à superfamília de receptores nucleares, que até o momento compreende 48 genes que codificam 75 proteínas diferentes,

que estão envolvidas na transdução de sinais hormonais extracelulares em respostas transcricionais ^{23; 24; 25; 26; 27}. A identificação de receptores em insetos ²⁸ como sendo membros da superfamília sugere uma origem comum destes receptores e claramente demonstra que a evolução destes antecede a divergência de vertebrados e invertebrados ^{29; 30; 31; 32}.

Os membros da superfamília de receptores nucleares são fatores de transcrição dependentes do ligante e atuam diretamente em seqüências específicas no DNA, os elementos responsivos ao hormônio (HREs) ^{3; 33; 34; 35}. Os HREs localizam-se na região promotora dos genes alvos ³⁶ e são específicos para cada receptor. Geralmente, os HREs possuem duas cópias imperfeitas de um hexanucleotídeo que podem estar arranjadas em diferentes orientações, com espaçamento e seqüências flanqueadoras diferentes ^{3; 35}. Os receptores nucleares associam-se aos HREs como monômeros, homodímeros ou heterodímeros ^{14; 37; 38}.

Os receptores nucleares incluem os receptores para esteróides, vitamina D, retinóides, hormônios tireoideanos e prostaglandinas, além de outros receptores, em maior número, que não possuíam ligantes conhecidos no momento de sua identificação, chamados de receptores órfãos ^{24; 27; 32; 33; 38; 39; 40}. Atualmente já é de conhecimento que o termo órfão representa uma denominação inadequada, uma vez que ligantes específicos têm sido identificados para esses receptores, como o ácido 9-cis retinóico para o receptor do retinóide X (RXR) ⁴¹ e oxiesteróis, ácidos biliares, ácidos graxos, pregnanos e androstanos para os receptores chamados receptor hepático X (LXR), receptor dos farnesóides X (FXR), receptor dos proliferadores peroxissomais (PPAR), receptor dos pregnanos X (PXR) e receptor constitutivo dos androstanos (CAR), respectivamente ^{40; 42; 43; 44}.

Os receptores para os hormônios esteróides formam a subclasse de receptores esteroidais ou tipo I da superfamília de receptores nucleares ^{29; 38}. Na ausência do ligante, os receptores dos esteróides: glicocorticóides (GRs), mineralocorticóides (MRs), androgênios (ARs), estrogênio (ER) e progesterona (PR) estão associados em um complexo com proteínas de choque térmico (HSPs) no citoplasma e em alguns casos no núcleo da célula. A ligação do hormônio dissocia os receptores deste complexo e induz a formação de homodímeros que se dirigem ao núcleo onde se ligam aos seus respectivos HREs regulando a transcrição gênica ^{32; 45}. Os receptores de hormônios esteróides ligam-se na forma de homodímeros a elementos responsivos, constituídos de um palíndromo

espaçado por três bases contendo duas cópias do hexanucleotídeo AGAACA, exceto os receptores de estrogênio (ER) que se ligam às seqüências AGGTCA também na forma de palíndromo espaçado por três bases^{14; 36; 37}.

A outra subclasse de receptores não esteroidais ou tipo II da superfamília de receptores nucleares é representada pelos receptores dos hormônios tireoideanos (TRs), do ácido retinóico (RAR), da vitamina D (VDR), e dos proliferadores peroxissomais (PPAR), que formam heterodímeros com o RXR^{29; 38}. Estes receptores na ausência do hormônio estão localizados no núcleo associados ao DNA²². Esta subclasse liga-se preferencialmente a repetições diretas (DRs) do hexâmero AGGTCA (AGGTCA N AGGTCA), onde 'N' é o número de bases que separa cada hexâmero e que determina a especificidade da ligação⁴⁶. A capacidade de cada receptor reconhecer os HREs constituídos por repetições diretas é chamada de regra 1 a 5 (figura 1).

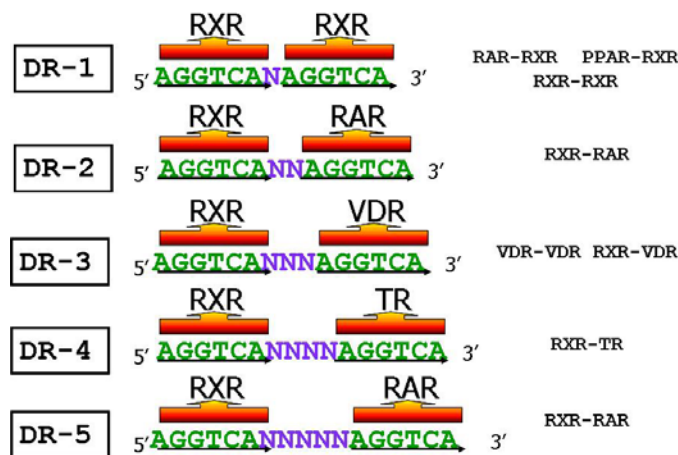


Figura 1: Esquema representando a regra 1 a 5 que especifica a ligação a repetições diretas (DRs), com espaçamentos variáveis (N), pelo RXR e os seus vários parceiros heterodiméricos. Fonte: Barra *et al.*, Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia, 48 (1): p. 25-39, 2004.

Desta forma, o PPAR e o RXR se ligam a uma DR espaçada por uma base (DR-1), o RAR se liga a DRs espaçadas por duas ou cinco bases (DR-2 e DR-5), o VDR a uma DR espaçada por três bases (DR-3) e o TR a uma DR espaçada por quatro bases (DR-4)^{24; 38; 47}. O RAR também pode se ligar a uma seqüência DR-1 heterodimerizado com o RXR, porém neste elemento o RAR atua como um potente repressor da transcrição ativada pelo

homodímero de RXR e seu ligante, o ácido 9-cis retinóico, visto que o complexo heterodimérico (RAR/RXR) tem uma maior afinidade por este sítio ^{48; 49; 50}.

Além das DRs, os HREs podem estar na forma de palíndromos ⁵¹ e palíndromos invertidos ⁵², que serão mostrados em maiores detalhes adiante. Há também um número de receptores órfãos que podem se ligar a um único hexanucleotídeo como monômero ^{24; 43}.

Na ausência do ligante, os receptores desta subclasse encontram-se ligados aos seus respectivos elementos responsivos na forma de homo ou heterodímeros cujo complexo interage com proteínas conhecidas como co-repressoras, pois atuam inibindo a transcrição gênica ^{53; 54; 55}. Com a chegada do hormônio e sua ligação ao receptor observa-se uma formação predominante de heterodímeros com o RXR, seguida de dissociação das proteínas repressoras e a associação com proteínas co-ativadoras ⁵⁶ que medeiam à estimulação de genes alvos ^{4; 24; 54}.

Domínios Funcionais dos Receptores Nucleares

Os receptores nucleares de hormônios são constituídos de uma única cadeia polipeptídica que constitui domínios modulares com funções distintas (figura 2), que também podem interagir entre si para executar uma determinada ação biológica do receptor ^{2; 4; 14; 33}. Os três principais domínios são: o domínio amino-terminal, o domínio de ligação ao DNA (DBD) e o domínio de ligação ao ligante (LBD). A região que conecta o DBD ao LBD é conhecida como dobradiça ^{14; 36}.

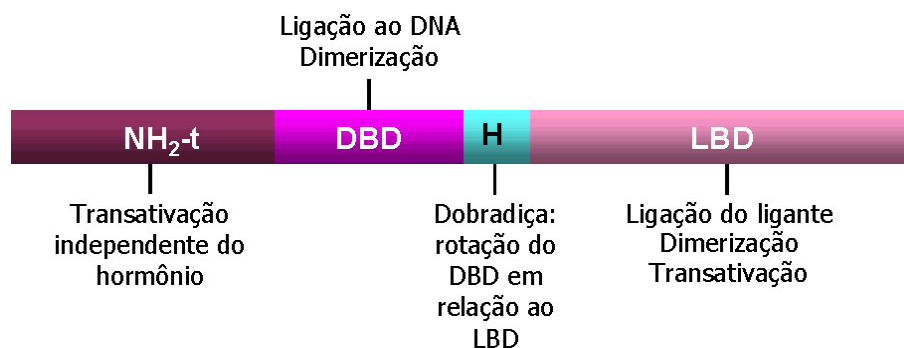


Figura 2: Estrutura linear representando os domínios funcionais dos receptores nucleares e suas funções: domínio amino-terminal (NH₂-t), domínio de ligação ao DNA (DBD), dobradiça (*Hinge*) e domínio de

ligação ao ligante (LBD). Fonte: Barra *et al.*, Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia, 48 (1): p. 25-39, 2004.

O domínio amino-terminal é extremamente variável entre os membros da superfamília, tanto no tamanho, quanto na seqüência de aminoácidos. Este domínio contém uma função de ativação transcricional independente do ligante, denominada função de ativação 1 (AF-1), que é distinta para cada receptor ^{4; 57; 58}. Este domínio no TR é relativamente pequeno, e na maioria dos casos, sua deleção tem pouco efeito sobre a resposta transcricional positiva ao T₃ ^{59; 60}. Exceto por um segmento conservado de doze aminoácidos adjacente ao DBD, o módulo amino-terminal do TR é completamente divergente dos outros receptores nucleares ^{57; 59}.

O DBD é o módulo mais bem conservado entre todos os receptores nucleares e tem como função principal à ligação ao DNA (figura 3). Este domínio situa-se na porção central dos receptores, e é composto por duas estruturas conhecidas como dedos de zinco, ou *zinc fingers*, onde quatro resíduos de cisteína de cada dedo formam complexos coordenados por íons de zinco, formando duas estruturas independentes em forma de alça, seguidas por uma extensão carboxi-terminal (CTE) ^{24; 32; 38}. A integridade de cada dedo de zinco é crítica, pois deleções ou substituições das cisteínas comprometem a ligação do receptor ao DNA, e conseqüentemente, sua atividade transcricional ⁶¹. Os dois dedos de zinco são separados por uma seqüência de 15 a 17 aminoácidos. Três aminoácidos na base do primeiro dedo, região chamada de caixa P (*P-box*), são responsáveis pelo reconhecimento específico do HRE ^{23; 27; 62; 63}, ao passo que uma seqüência de cinco aminoácidos, entre a primeira e a segunda cisteína na base do segundo dedo, também chamada de caixa D (*D-box*), é importante para a dimerização do receptor ^{23; 59; 64}. Os termos *P-box* e *D-box* estão relacionados com a posição proximal e distal destas regiões, funcionalmente distintas, em relação ao domínio amino-terminal do receptor ³⁷.

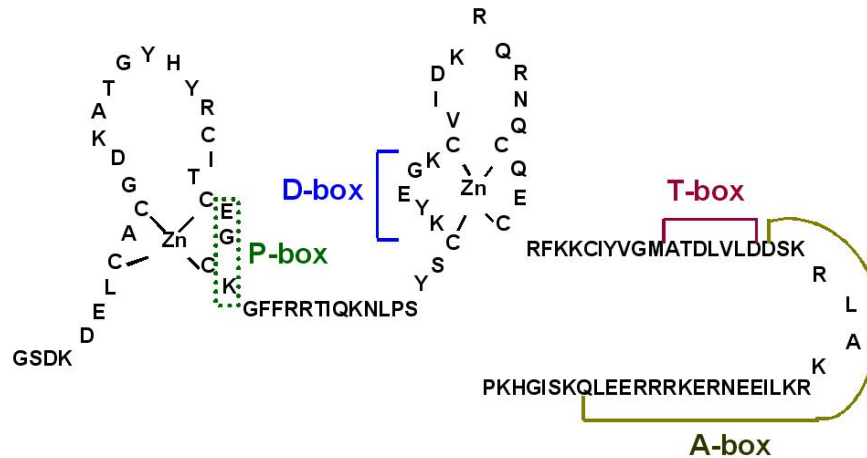


Figura 3: Domínio de ligação ao DNA (DBD) do receptor TR β 1 humano mostrando os dois módulos correspondentes aos dedos de zinco e identificando as regiões conhecidas como: *P-box*, *D-box*, *T-box* e *A-box*. Fonte: Modificado de Barra *et al.*, Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia, 48 (1): p. 25-39, 2004.

Além destas regiões também foram identificadas as caixas T e A (*T-box* e *A-box*). A *A-box* encontra-se localizada após o segundo dedo de zinco e foi inicialmente identificada no receptor órfão NGFI-B (receptor induzido pelo fator de crescimento B do nervo) como sendo importante por fazer contato com duas adeninas localizadas na posição 5' ou *upstream* ao seu elemento responsivo^{37; 65; 66; 67; 68}. Outra função citada para esta região é o seu papel na homodimerização cooperativa e ligação com alta afinidade ao DNA do receptor do fator nuclear 4 de hepatócitos (HNF-4)⁶⁹. A resolução da estrutura tridimensional do DBD do RXR mostrou que *A-box* está incluída em uma região helicoidal após o segundo dedo de zinco e essa hélice é também conhecida como H0 por ligar o final do DBD ao início do LBD (H1)⁷⁰. A *T-box*, localizada entre o segundo dedo de zinco e *A-box*, forma uma interface de dimerização crítica na ligação de DBDs homo e heterodiméricos em alguns elementos responsivos^{37; 65; 66; 67; 68; 70}. As regiões *T-box* e *A-box* fazem parte da CTE, que dependendo do receptor pode ter um papel importante na dimerização e no reconhecimento específico do elemento responsivo³².

O LBD é menos conservado que o DBD, refletindo a variedade de ligantes que atuam nestes receptores. Este domínio localiza-se na região carboxi-terminal e participa na dimerização do receptor, localização nuclear, dissociação das proteínas de choque térmico (HSPs)³⁶ e interação com proteínas co-repressoras^{53; 57} e co-ativadoras^{37; 56; 71} que atuam na repressão ou ativação da transcrição^{54; 72; 73}. A ligação do hormônio a este domínio

resulta em mudanças conformacionais nos receptores e influencia sua associação a proteínas com propriedades na regulação da transcrição^{60; 74; 75}.

Além destas funções o LBD compreende também uma função de ativação transcricional 2, chamada de AF-2, que é dependente da presença do hormônio e interage com proteínas auxiliares para se comunicar com o complexo de transcrição^{60; 76}.

Estudos de cristalografia de raios X com o domínio LBD do TR^{72; 77; 78; 79; 80}, RAR^{81; 82; 83}, RXR^{84; 85; 86}, VDR^{87; 88; 89; 90} e PPAR^{91; 92; 93}, demonstraram que o LBD dos receptores da superfamília tem uma estrutura tridimensional conservada e constituída predominantemente de 12 hélices numeradas de 1 a 12 (H1 a H12). Estas estruturas sugerem que após a ligação ao ligante, a hélice 12 dobra-se em direção as hélices H3, H4 e H5 criando uma superfície hidrofóbica para a interação com as proteínas co-ativadoras^{56; 59} e impedindo a interação do receptor com as proteínas co-repressoras (figura 10)⁹⁴.

Estas estruturas cristalográficas também foram importantes para demonstrar a interface de dimerização dos receptores, tanto para homodímeros, quanto para heterodímeros. Esta interface compreende os aminoácidos localizados nas hélices H7, H9, H10 e H11, sendo que H11 contribui com mais de 75% para a formação desta superfície^{32; 95; 96}. A análise mutacional dos aminoácidos localizados na superfície do LBD do TR permitiu a identificação de um núcleo de aminoácidos hidrofóbicos na hélice 11 envolvidos na dimerização deste receptor⁹⁷. Estes resultados demonstraram que uma mesma superfície no LBD é empregada para a dimerização do TR em DR-4 e F2 indicando que a homodimerização nestes elementos independe da orientação e espaçamento dos hexanucleotídeos, entretanto no elemento responsivo disposto como palíndromo, TREpal, nenhuma mutação foi capaz de impedir a homodimerização do TR sugerindo que neste elemento, os homodímeros observados nos ensaios de ligação proteína-DNA são na verdade constituídos por dois monômeros não dimerizados⁹⁷.

A região que conecta o DBD ao LBD, e age como uma dobradiça é extremamente variável entre os diferentes receptores^{14; 27; 32}. No caso específico do TR a principal função desta região seria promover o movimento de rotação do DBD em relação ao LBD possibilitando que o TR se ligue nos elementos responsivos ao hormônio tireoideano (TRE) dispostos em diferentes orientações^{3; 14; 24; 37; 59; 98; 99; 100}. Outros estudos sobre esta região têm-se limitado a citá-la como sendo importante para a ligação de co-repressores no TR^{2; 53; 101; 102} e translocação do TR dependente de T₃ do citoplasma para o núcleo¹⁰³.

A identificação destes domínios funcionais entre os membros da superfamília de receptores nucleares foi definida pela comparação da seqüência dos receptores e análises mutacionais ²³, porém a determinação das estruturas cristalográficas tem sido importante para confirmar as funções destes domínios e as mudanças estruturais induzidas pela ligação ao ligante e ao DNA ^{5; 72; 77; 78; 79; 80; 104}.

Receptores dos Hormônios Tiroideanos

Após a identificação dos cDNAs que codificam os receptores de glicocorticóide (GR) e estrógeno (ER) em 1985 ^{105; 106}, estudos de homologia demonstraram que os receptores do hormônio tiroideano (TRs), clonados em 1986 de bibliotecas de embriões de galinha e placenta humana, eram homólogos celulares do oncogene viral v-erbA (vírus da eritroblastose aviária) ^{15; 107; 108}.

O gene nativo homólogo ao oncogene viral (c-erbA) foi denominado TR α e nos humanos localiza-se no cromossomo 17, enquanto o outro gene, clonado simultaneamente, foi denominado TR β e encontra-se localizado no cromossomo 3 ^{2; 107; 108}. Cada um destes genes codifica várias proteínas ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\Delta\alpha 1$, $\Delta\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$ e $\Delta\beta 3$), que são resultado de um processamento alternativo (*splicing*) do RNA mensageiro ou da utilização de promotores alternativos desses genes (figura 4) ^{6; 15; 109}. As isoformas $\alpha 1$ e $\alpha 2$ diferem somente em sua região carboxi-terminal, enquanto que as isoformas $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 3$ diferem em sua região amino-terminal ^{3; 5; 22}. A isoforma TR $\alpha 2$ não se liga ao T₃ devido a uma modificação na sua porção carboxi-terminal, mas pode inibir a transcrição mediada por T₃ quando este está ligado às outras isoformas, por competir pela ligação aos TREs e/ou na formação de heterodímeros com RXR ^{3; 4; 45; 64}. A isoforma TR $\beta 3$ foi recentemente descrita em ratos ¹¹⁰, e a comparação das seqüências genômicas destes animais com os humanos, sugeriu que esta isoforma seria conservada entre as duas espécies ¹⁰⁹. Porém novas evidências têm demonstrado que este *locus* não está presente em outros vertebrados, incluindo os humanos ¹¹¹. As isoformas $\Delta\alpha 1$, $\Delta\alpha 2$ e $\Delta\beta 3$ são versões truncadas de TR $\alpha 1$, TR $\alpha 2$ e TR $\beta 3$, respectivamente ¹⁵.

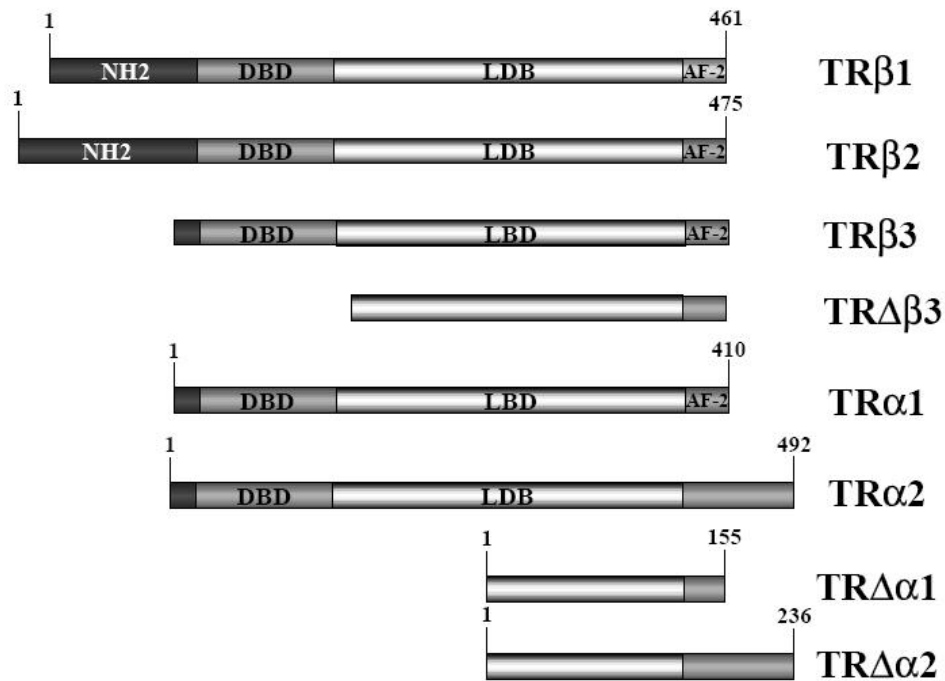


Figura 4: Estrutura primária das diferentes isoformas codificadas pelos genes receptores do hormônio tireoideano: as isoformas TRβ1, TRβ2, TRβ3 e TRΔβ3 são codificadas pelo gene TRβ através da utilização de promotores alternativos. O gene TRα produz as proteínas TRα1, TRα2, TRΔα1 e TRΔα2 por processamento alternativo do RNA (*splicing* alternativo) ou pela utilização de promotores alternativos. Fonte: Barra *et al.*, Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia, 48 (1): p. 25-39, 2004.

A expressão dos mRNAs dos TRs varia com o desenvolvimento e com a diferenciação celular^{22; 64; 112}. Os mRNAs do TRα1, TRα2 e TRβ1 são expressos em quase todos os tecidos, ainda que em níveis diferentes. O TRα1 é abundante nos músculos esqueléticos, gordura marrom e no coração; o TRα2 é particularmente abundante no cérebro; o TRβ1 é abundante no fígado, rim e cérebro e o TRβ2 ocorre somente na pituitária e em outras áreas do cérebro^{2; 3; 22; 113; 114}. O TRΔα1 e TRΔα2 são encontrados principalmente no epitélio do intestino delgado, pulmão e durante os estágios precoces do desenvolvimento¹⁰⁹. Em ratos, o TRβ3 é expresso no fígado, rim e pulmão, enquanto que o TRΔβ3 é encontrado no músculo esquelético, coração, baço e cérebro¹¹⁰. A expressão variada dos TRs pode constituir um mecanismo usado pelo T₃ para a regulação de tecidos de forma seletiva^{2; 3; 64}.

Mecanismo de Ação dos Receptores dos Hormônios Tireoideanos

Embora os mecanismos biológicos exatos pelos quais os hormônios tireoideanos exercem seus efeitos específicos só agora começam a ser compreendidos, o conceito que a maioria das ações dos hormônios tireoideanos é mediada por receptores nucleares já está solidificado.

A ligação do T₃ aos seus receptores nucleares, TRs, ocorre com grande afinidade e especificidade, alterando fundamentalmente a estrutura tridimensional do TR e conseqüentemente a sua associação com outras proteínas. Conforme mencionado anteriormente, os TRs na ausência de T₃ encontram-se intimamente associados à cromatina em um complexo com proteínas co-repressoras^{5; 45; 94} como, por exemplo, o N-Cor (co-repressor do receptor nuclear), o SMRT (mediador silencioso para o TR e RAR)^{53; 101; 115; 116} e as proteínas que se associam aos co-repressores como Sin3 e HDAC (complexo de desacetilase das histonas)^{60; 117; 118}. Estas proteínas têm ação de desacetilação das histonas, promovendo uma organização mais compacta da cromatina facilitando a repressão transcricional^{54; 60}.

Após a ligação ao T₃, ocorre uma alteração na conformação do TR, que resulta na liberação das proteínas co-repressoras^{53; 94} e no recrutamento de proteínas co-ativadoras (figura 5)^{6; 56; 59}. Vários co-ativadores foram identificados: GRIP-1 (proteína 1 que interage com GR), SRC-1 (co-ativador 1 do receptor de esteróide), pCIP (proteína associada ao co-integrador p300/CBP) e o pCAF (fator associado a p300/CBP)^{57; 73; 119; 120}. Outra proteína identificada como co-ativadora do TR é uma proteína que se liga ao CREB (proteína que se liga ao elemento responsivo cAMP) conhecida como CBP e mais recentemente foi identificado o co-ativador TRBP (proteína que se liga ao TR)^{57; 121}. As proteínas co-ativadoras possuem uma atividade de acetilação das histonas, promovendo o relaxamento da cromatina e facilitando a interação deste complexo com os componentes da maquinaria de transcrição no promotor dos genes alvos^{56; 57; 60; 73; 122}.

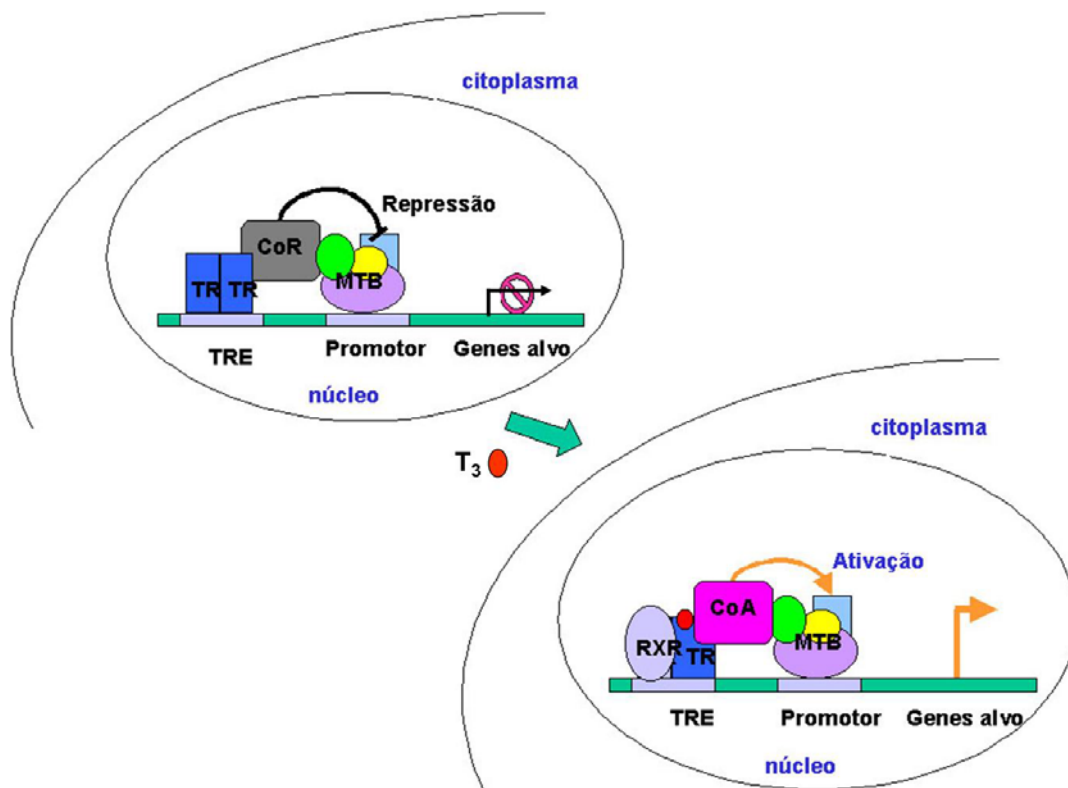


Figura 5: Representação esquemática do mecanismo de ação do TR. Na ausência de T_3 , o TR se encontra ligado ao TRE como homodímero associado a proteínas co-repressoras que atuam inibindo a maquinaria de transcrição basal (MTB). A ligação do TR ao T_3 (círculo vermelho) induz a uma mudança conformacional que conduz a dissociação de homodímeros (TR/TR) e associação de heterodímeros (TR/RXR), liberação dos co-repressores e associação com proteínas co-ativadoras que agem sobre a MTB ativando a transcrição de genes alvo. Fonte: Barra *et al.*, Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia, 48 (1): p. 25-39, 2004.

Os TRs na ausência do hormônio podem estar ligados aos TREs na forma de monômeros, homodímeros e, preferencialmente, como heterodímeros². A importância fisiológica da ligação do TR como homodímero ainda não está clara, principalmente na ativação da transcrição. Por outro lado, esses homodímeros têm um papel importante na repressão de genes que são estimulados por T_3 ¹²³. Após a ligação do hormônio os homodímeros tendem a se dissociar, aumentando a disponibilidade de monômeros e favorecendo a formação de heterodímeros com o RXR em TREs do tipo repetições diretas, DR-4, que é o elemento responsivo freqüentemente encontrado nos genes alvo; e nos palíndromos invertidos espaçados por 6 bases, F2^{124; 125; 126}. Em contraste, o T_3 não altera a ligação de homodímeros de TR no palíndromo não espaçado, TREpal^{45; 124}. Desta forma, o

T₃ em concentrações fisiológicas, modifica o equilíbrio entre os TRs que podem se ligar ao DNA como monômeros, homodímeros e heterodímeros ^{2; 59}.

Os TREs funcionam como elementos amplificadores da transcrição (*enhancers*) e produzem este efeito independentemente de sua localização em relação ao ponto de início da transcrição ou de sua orientação (5' ou 3') no promotor do gene alvo devido a mobilidade do DNA ¹²⁷. Estas seqüências são distintas da região do promotor onde se liga a maquinaria basal de transcrição que inclui os fatores de transcrição basal e a RNA polimerase II ¹²⁸.

Os TREs são constituídos por duas cópias, geralmente imperfeitas do hexanucleotídeo AGGTCA ¹²⁹. Estas seqüências podem estar dispostas como repetições diretas separadas por 4 bases 5' AGGTCA N4 AGGTCA 3' (DR-4), como palíndromos na forma 5' AGGTCA TGACCT 3' (TREpal) sem espaçamento entre as cópias, ou ainda como palíndromos na forma inversa 5' TGACCT N6 AGGTCA 3' (F2) onde as cópias são separadas por 6 bases (figura 6) ^{2; 36; 37}.

A ordem, a orientação e a distância entre os hexâmeros dos TREs acarretam diferenças na interação TR-TRE. Por exemplo, DR-4 é descrito como o principal sítio para a interação de heterodímeros TR-RXR, enquanto os homodímeros de TR-TR aparentemente se ligam de forma mais eficiente a palíndromos invertidos, F2 ^{45; 125; 126; 130}.

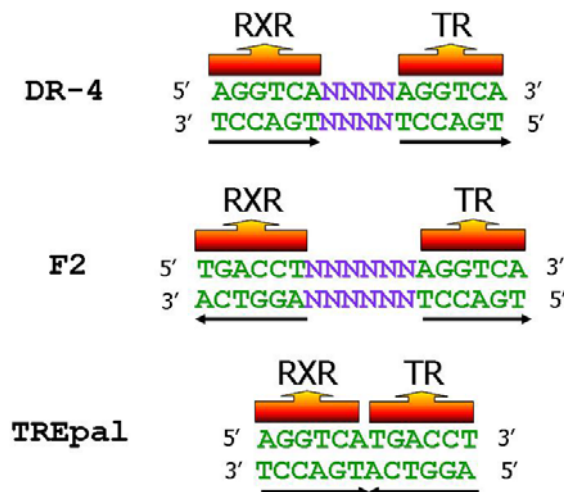


Figura 6: Elementos responsivos ao TR: repetição direta (DR-4), palíndromo invertido (F2) e palíndromo (TREpal). O “N” indica o número de nucleotídeos entre os hexâmeros. Fonte: Barra *et al.*, Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia, 48 (1): p. 25-39, 2004.

Importância da Região de Dobradiça na Ligação do Receptor do Hormônio Tiroideano ao DNA

O modelo atual de dimerização sugere que resíduos idênticos no LBD do TR estão envolvidos na homodimerização ou heterodimerização com RXR. Estes dímeros pré-formados se ligam aos TREs, DR-4, F2 e TREpal, independente da orientação das bases AGGTCA, embora no TREpal a formação de homodímeros parece ser simplesmente a ligação de dois monômeros ao DNA ⁹⁷. Este modelo sugere que para que os DBDs se liguem especificamente aos TREs em diferentes orientações, há necessidade que girem em até 180 graus em relação aos LBDs (figura 7). Para isto, a região que conecta o DBD ao LBD deve atuar como uma dobradiça permitindo tal movimento de rotação ^{14; 24; 27; 37; 59; 98; 99}.

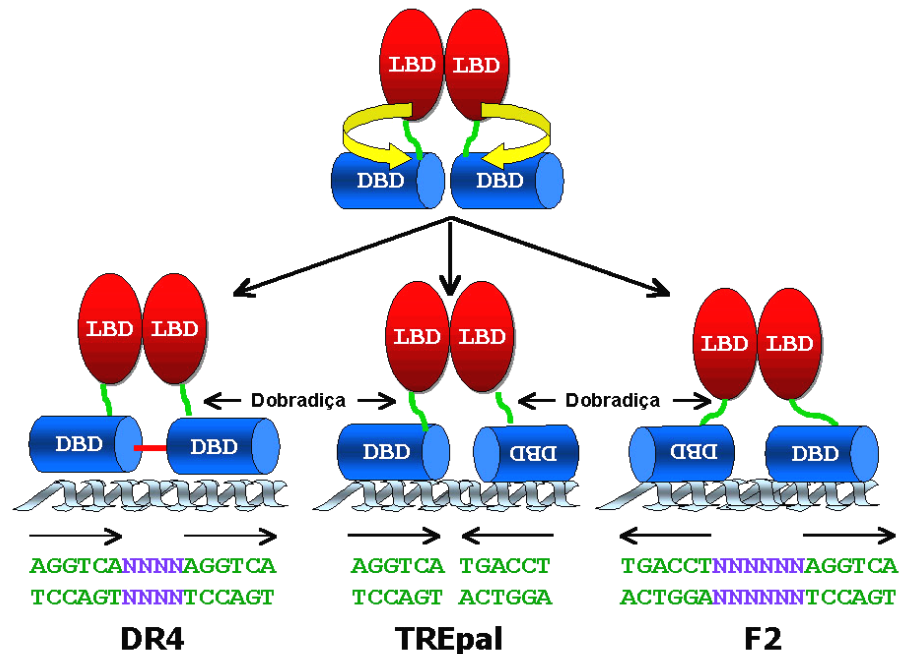


Figura 7: Modelo da ligação do TR aos diferentes TREs. O TR se dimeriza (homo ou heterodímero) através da interface de dimerização presente no domínio de ligação ao ligante (LBD). Este dímero se liga ao DNA através do domínio de ligação ao DNA (DBD). O LBD está ligado ao DBD por uma região conectora. Para que o DBD possa se ligar aos TREs em diferentes orientações é necessário que a região conectora tenha flexibilidade para efetuar rotações de até 180 graus, ou seja, deve funcionar como uma dobradiça. Fonte: Barra *et al.*, Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia, 48 (1): p. 25-39, 2004.

Esta hipótese, apesar de amplamente aceita por vários grupos de pesquisadores, ainda não foi confirmada, assim como, não se conhece ao certo os aminoácidos que formam essa região. Várias sugestões foram colocadas no passado ^{33; 49; 53; 131; 132; 133}. Assim, Evans (1988) com base na perda da homologia das seqüências sugeriu que a região de dobradiça corresponderia aos aminoácidos 169 a 232 do TR β e aminoácidos 120 a 183 do TR α humanos. Outros autores baseados na predição da estrutura secundária da região de dobradiça afirmam que esta região corresponderia aos aminoácidos 171 a 237 do TR β 1 humano ^{131; 132; 133}. Kurokawa e colaboradores (1995) sugeriram que a região de dobradiça corresponderia aos aminoácidos 210 a 227 no TR β 1 humano, e Horlein e colaboradores (1995) citam que esta região corresponde aos aminoácidos 206 a 236 no TR β 1 humano e aminoácidos 157 a 186 no TR α 1 de camundongos ⁵³.

Um dos fatores que dificulta a localização exata da região de dobradiça é a ausência de uma estrutura cristalográfica do receptor completo (*full lenght*) ou dos dois principais domínios conectados, o DBD e o LBD. Atualmente, as principais indicações da dobradiça são provenientes da comparação das estruturas cristalográficas disponíveis desses domínios separados.

Em 2001, com a determinação da estrutura cristalográfica do LBD do TR β 1 humano, Wagner e colaboradores sugeriram que a região de dobradiça seria constituída pelos aminoácidos 209 a 214 (GHKPEP). Sabendo-se que as hélices são estruturas relativamente rígidas, tem-se que a alça compreendida por estes seis aminoácidos (figura 9), que separam a hélice carboxi-terminal do DBD (H0) da hélice amino-terminal do LBD (H1), seria uma região mais flexível e poderia atuar como uma dobradiça ⁷⁸. No entanto, ao realizarmos mutações nesta região do TR, deletando os seis aminoácidos (DEL), substituindo dois aminoácidos por prolinas (Rígido) ou inserindo 5 alaninas nesta região (5AlaINS), não houve modificação na capacidade do receptor em se ligar aos diferentes elementos responsivo, assim como, não houve alteração sua capacidade de ativar a transcrição em resposta ao T₃ (figura 8) ¹³⁴.

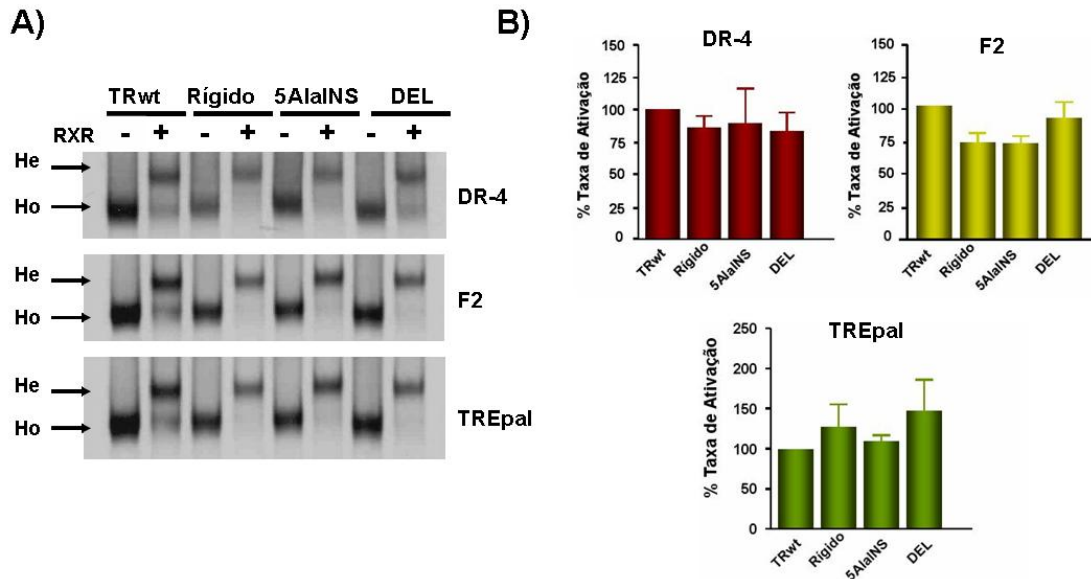


Figura 8: A) Formação de homodímeros (Ho) e heterodímeros (He) de hTRβ1wt e dos mutantes da região que conecta o final do DBD ao início do LBD em DR-4, F2 e TREpal. Os ensaios de ligação proteína-DNA foram realizados empregando-se de 1 a 3μl de cada receptor sintetizado *in vitro* marcado (³⁵S-Metionina), na ausência ou presença de RXRα não marcado e 20ng do elemento responsivo por reação. As reações foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 5% não-desnaturante e posteriormente o gel foi submetido à autorradiografia. B) Resposta ao T₃ mediada pela adição de 2,0μg do vetor de expressão do hTRβ1wt ou mutantes (Rígido, 5AlaINS e DEL) nos elementos responsivos DR-4, F2 e TREpal. As células U937 foram co-transfectadas com 4μg do vetor para o gene repórter TRE-2TK-LUC e tratadas com etanol ou 100nM de T₃. A atividade do gene repórter foi medida após 22h com a lise das células e os números representam o percentual da taxa de ativação em relação ao TRwt. Este gráfico corresponde à média de no mínimo três experimentos realizados com cada um dos TRES. A análise estatística foi realizada pela análise de variância a 5% (ANOVA) seguida da comparação das médias pelo Teste de Newman-Keuls Fonte: Pessanha, R. P., Dissertação de Mestrado, 2003.

Uma região do TR que poderia corresponder à dobradiça é a região *T-box*. A comparação da estrutura do DBD do receptor órfão reverso ao oncogene viral v-erbA (Rev-erb) mostrou que a hélice carboxi-terminal do DBD se situa em uma posição oposta a do TR, sugerindo que alça de nove aminoácidos que precede esta hélice nestes receptores poderia atuar como uma dobradiça¹³⁵. Esta região no TRβ1 humano corresponde aos aminoácidos 175 a 180 e é chamada de *T-box* (figura 9).

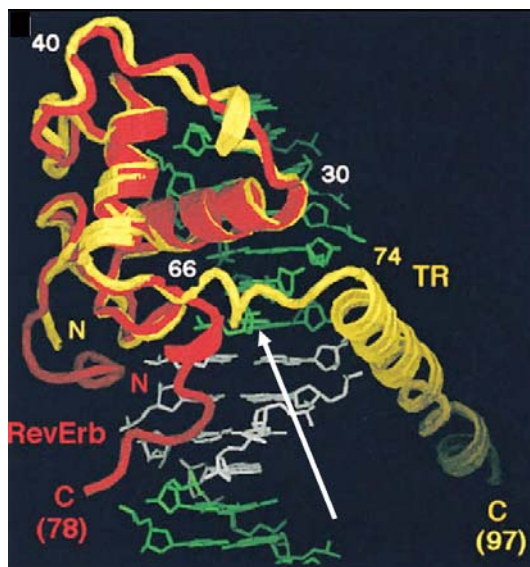


Figura 9: Comparação do DBD do receptor órfão Rev-Erb (em vermelho) e do TRβ1 (em amarelo) mostrando a similaridade dos 66 resíduos conservados e o diferente dobramento da extensão carboxi-terminal (CTE). Fonte: Zhao *et al.*, Molecular Cell, 1(6): p. 849-861, 1998.

Pissios e colaboradores (2001) verificaram que a primeira hélice (H1) do LBD do TR interage fracamente com o resto do LBD na ausência do hormônio ¹³⁶. Porém, esta interação é fortemente aumentada com a adição do hormônio, confirmando que a ligação ao hormônio provoca mudanças estruturais no LBD do TR ⁵⁶. Desta forma, foi proposto que H1 tem a função de estabilizar a estrutura do LBD ^{136; 137}. Assim, a alça localizada entre H1 e H2 do LBD juntamente com o deslocamento de H1 do corpo do LBD poderia permitir a rotação deste módulo independente do DBD, preservando a dimerização entre os LBDs, assim como suas demais funções, e permitindo a ligação específica do complexo (TR/TR ou TR/RXR) aos TREs contendo hexanucleotídeos em diferentes orientações (DR-4, F2 e TREpal). Esta alça compreende os aminoácidos 232 a 238 no TRβ1 humano (figura 10).

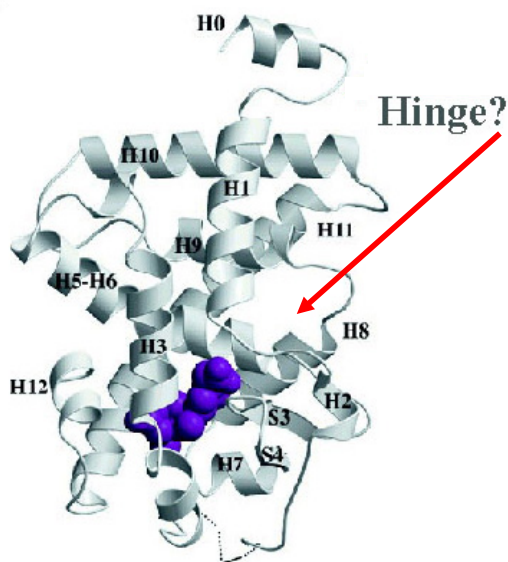


Figura 10: Estrutura do LBD do TR β 1 humano demonstrando as 12 hélices na presença do hormônio (esferas azuis). A seta está indicando a suposta região que pode corresponder à dobradiça do TR (aminoácidos 232-238). Fonte: Modificada de Wagner *et al.*, 15(3), p. 398-410, 2001.

Outra possibilidade ainda não examinada é a de que não haveria região de dobradiça no TR, mas sim no RXR que é um componente crítico para a formação de heterodímeros com vários receptores nucleares gerando uma diversidade de respostas hormonais. O RXR é um receptor nuclear altamente promíscuo, que se liga a diferentes receptores nucleares como o TR, RAR, PPAR, VDR, PXR, CAR, FXR, LXR e NGFI-B, entre outros²⁴.

A ligação destes receptores ao DNA ocorre com diferentes polaridades, isto é, com alguns receptores ele se liga no hexanucleotídeo situado na região 5' (*upstream*), o que ocorre na grande maioria das vezes, e com outros no hexanucleotídeo situado na região 3' (*downstream*) em elementos responsivos dispostos como DRs. Em DR-3, DR-4 e DR-5 o RXR ocupa o hexanucleotídeo localizado na posição 5' e o seu parceiro VDR, TR e RAR, respectivamente ocupa o hexanucleotídeo na posição 3'^{66; 98}. Em DR-1, o RXR pode ser ligar na forma de heterodímeros com o PPAR e o RAR, e também na forma de homodímeros (RXR/RXR). Com o RAR e o PPAR, a polaridade é reversa, ou seja, o RXR ocupa o hexanucleotídeo localizado na posição 3' e o RAR ou o PPAR ocupa a posição 5'. Em vários tipos celulares a consequência desta polaridade reversa de RAR/RXR é importante para a repressão da transcrição ativada pelo homodímero de RXR e seu ligante, o ácido 9-cis retinóico^{48; 49}. Em relação à ligação ao PPAR, esta orientação é devido à

extensão carboxi-terminal (CTE) do DBD do PPAR que impede a sua ligação no hexanucleotídeo localizado na posição 3' em DR-1¹³⁵. Além disso, o PPAR necessita da região 5' flanqueadora para se ligar a DR-1¹³⁸.

Outro fato evidenciado com a ligação de RXR a DRs é que a simples mudança de um nucleotídeo no espaçador conduz a uma rotação de aproximadamente 36° do RXR em torno da dupla hélice. Como consequência deste movimento, sugeriu-se que o RXR não poderia interagir com uma única interface de dimerização com cada um de seus parceiros²⁴. Entretanto, Ribeiro e colaboradores (2001), utilizando mutações na interface de dimerização do TR e do RXR demonstraram que pelo menos em relação ao heterodímeros RXR/TR há uma única interface de dimerização, para os genes regulados positivamente, que envolve aminoácidos localizados nas hélices 10 e 11, como a leucina L422 e a metionina M423, que são conservados nos receptores RXR α , ER α , ER β e PPAR γ ⁹⁷.

Se considerarmos que a heterodimerização ocorre antes da ligação ao DNA, e que há uma única superfície de dimerização no RXR, seria necessário um movimento de rotação do DBD em relação ao LBD para que ocorresse a ligação do RXR heterodimerizado em ambos os hexanucleotídeos dispostos como DRs, sugerindo a existência de uma região de dobradiça no RXR. Desta forma, a presença da dobradiça no RXR poderia também explicar a ligação do TR aos TREs contendo diferentes orientações sem a necessidade de uma dobradiça no TR.

Zhao e colaboradores (2000) verificaram que o RXR quando comparado ao TR e ao Rev-erb fez apenas três contatos com cada hexanucleotídeo, sugerindo que a fraca ligação de RXR deve ser derivada da substituição de um único aminoácido na hélice de reconhecimento do RXR de arginina R26 no TR/Rev-erb para lisina (K) no RXR. Esta perda de contatos com os hexanucleotídeos indica que o RXR tem uma especificidade mais relaxada que os outros receptores nucleares. Esta idéia é amparada pela observação que os elementos responsivos naturais do RXR divergem significativamente da seqüência consenso¹³⁹. Considerando que o RXR é parceiro de vários outros receptores nucleares e que se liga de forma mais flexível ao DNA é possível que a presença de uma região de dobradiça neste receptor favoreça a ligação dos heterodímeros RXR/TR nos vários elementos responsivos.

A comparação do DBD do RXR livre em estudos de espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e do DBD do RXR dimerizado em DR-1 confirmou que ocorre uma mudança conformacional na proteína após a ligação ao DNA

¹⁴⁰. A hélice *T-box* correspondente aos aminoácidos 201 a 209 do RXR sofre uma transição estrutural que aumenta a habilidade do RXR em interagir favoravelmente com o DNA na forma de dímero (figura 11). O remodelamento da hélice *T-box* para uma conformação mais estendida reposiciona o glutamato E74 para fora da hélice de ligação ao DNA e permite que a arginina R30 e a lisina K26 interajam com as bases do DNA e os grupos fosfatos ¹³⁹. Como a região *T-box* apresenta certa flexibilidade é possível que ela possa corresponder à região de dobradiça do RXR.

A estrutura cristalográfica do LBD do TR sugere que a alça que conecta a hélice carboxi-terminal do DBD a hélice amino-terminal do LBD, aminoácidos 209 a 214, pode atuar como uma dobradiça ⁷⁸. Desta forma, a região homóloga no RXR também poderia apresentar flexibilidade suficiente para atuar como uma dobradiça, neste receptor essa região corresponde aos aminoácidos 225 a 232.

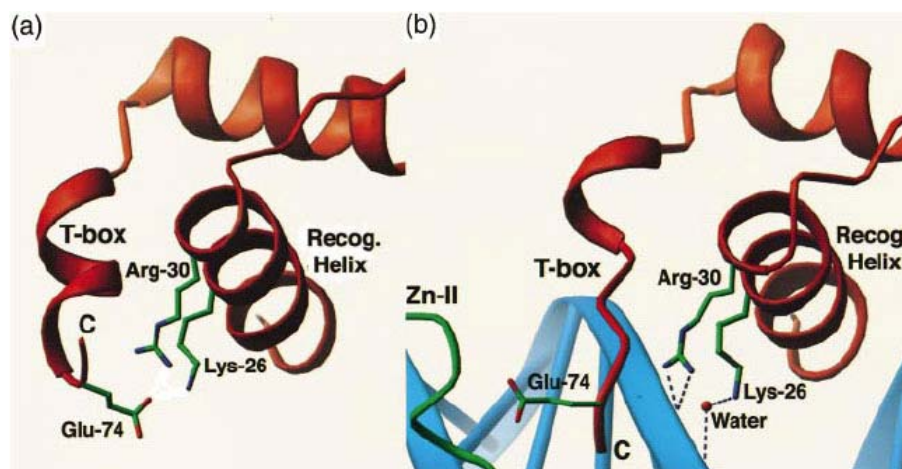


Figura 11: Mudanças na conformação da *T-box* e na hélice de reconhecimento do DNA do (a) a estrutura do DBD do RXR livre e (b) RXR dimerizado ligado em DR-1. Fonte: Zhao *et al.*, Journal of Molecular Biology, 296, p.509-520, 2000.

Considerando que a determinação da região de dobradiça é importante para a compreensão da fisiologia molecular e mecanismo de ação do receptor do hormônio tireoideano, e que pode contribuir significativamente para a identificação de novos alvos farmacológicos, decidimos investigar algumas regiões desse receptor e também do RXR para identificar qual delas corresponde à região de dobradiça. Desta forma, poderemos confirmar a se a dobradiça confere a mobilidade necessária para que o complexo TR/RXR

possa se ligar aos diferentes elementos responsivos, portanto, realizamos mutações em diferentes regiões do TR β 1 e RXR α humanos utilizando as seguintes estratégias: deletar os aminoácidos das regiões, ou ainda, no caso da região T-box do TR tornar o segmento mais rígido por meio da substituição dos aminoácidos por prolinas. Estas modificações na estrutura do TR e/ou RXR poderiam retirar a capacidade de rotação do DBD, imobilizando-o em relação ao LBD e limitando a ligação do complexo TR/TR ou TR/RXR apenas ao TRE que mantivesse a ligação específica entre as bases AGGTCA e os aminoácidos do DBD.

Influência do Receptor do Ácido 9-cis Retinóico no Mecanismo de Ação do Receptor do Hormônio Tireoideano nos Diferentes Elementos Responsivos

O receptor do ácido 9-cis retinóico (RXR) tem se mostrado único, entre os membros da superfamília de receptores nucleares. Apesar de vários estudos realizados desde a sua descoberta, estes receptores permanecem como enigmáticos, e ainda não há um consenso sobre o seu papel. Embora algumas questões básicas permaneçam não respondidas, ou sejam controversas, está claro que o RXR é essencial em diversas vias de sinalização principalmente devido ao fato de formar heterodímeros promiscuamente com vários receptores^{44; 139}.

Para se ligar ao DNA os TRs precisam formar homodímeros ou heterodímeros com o RXR. Os heterodímeros TR/RXR são observados em solução ou ligados ao DNA, porém a formação de homodímeros de TR ocorre somente quando estes estão ligados ao DNA⁵. Estas informações indicam que os heterodímeros são mais estáveis que os homodímeros e, portanto interações moleculares que promovem a formação de homodímeros diferem das que promovem a formação de heterodímeros⁵.

A heterodimerização entre o TR e o RXR aumenta a ligação do receptor ao DNA tanto *in vitro* como *in vivo* e estimula a transcrição gênica^{141; 142; 143}. O RXR dimerizado com o TR não responde ao seu ligante, sendo por esta razão considerado um parceiro silencioso. Isto ocorre devido a uma modificação alostérica no LBD do RXR que o impede de se ligar ao ácido 9-cis retinóico^{24; 144; 145; 146}. Entretanto, estudos recentes demonstraram que o RXR poderia participar do complexo heterodimérico de forma mais ativa,

permitindo a ligação do seu ligante, o ácido 9-cis retinóico, e consequentemente aumentando a atividade transcricional do complexo RXR/TR mediada por T₃^{147; 148; 149}.

O TR contém duas regiões independentes para dimerização, uma no DBD e outra no LBD. Acredita-se que para os heterodímeros de TR/RXR em DR-4 a dimerização ocorra em duas etapas, uma entre os LBDs em solução e a segunda entre os DBDs, após a ligação ao DNA^{24; 99; 144}. Esta segunda interface de dimerização envolve o segundo dedo de zinco do DBD do RXR e o primeiro dedo de zinco do DBD do TR, adotando a polaridade cabeça-cauda (*head-to-tail*), onde o RXR se liga no hexâmero AGGTCA situado na região 5' e o TR se liga no hexâmero AGGTCA situado na região 3'¹⁰⁴. Porém, em F2 e TREpal as seqüências dos dois hexâmeros são simétricas e desta forma não ditam uma orientação particular do heterodímero TR/RXR sobre estes TREs².

Vários genes alvos regulados pelos TRs têm TREs que contém mais do que dois hexanucleotídeos próximos^{150; 151; 152}. O promotor do gene do hormônio de crescimento de ratos (rGH) tem servido como um protótipo deste tipo de elemento responsivo múltiplo. O elemento responsivo central deste promotor é um TRE consistindo de dois hexanucleotídeos dispostos como DR-4, seguido de um terceiro hexanucleotídeo disposto como um palíndromo com uma base no espaçador^{152; 153; 154; 155; 156; 157}. Uma análise mais detalhada deste promotor demonstrou que além destes três hexanucleotídeos centrais, há dois hexanucleotídeos adicionais flanqueando o promotor¹⁵⁶.

Estudos com o promotor do rGH demonstraram que os três hexanucleotídeos centrais contribuem para a regulação da transcrição pelos TRs, que podem atuar tanto como trímeros, quanto como tetrâmeros com o RXR, e, além disso, a seqüência do promotor contendo os cinco hexanucleotídeos também foi capaz de recrutar um complexo homopentamérico ou heteropentamérico¹⁵². Porém ainda não foi esclarecida qual a seqüência das etapas de dimerização e ligação ao DNA destes complexos. A dimerização pode compreender uma mistura de interações proteína-proteína, e interações entre os domínios de ligação ao DNA (DBD) e de ligação ao ligante (LBD) que estariam atuando juntos para formar o complexo oligomérico, ou ainda pode haver a interação de superfícies adicionais nos receptores, exploradas especificamente para a formação destes complexos¹⁵².

Além do TR, o RXR também pode formar diferentes complexos oligoméricos, tanto em solução, quanto ligados ao DNA. Estudos anteriores têm demonstrado que o

RXR β , mas não o RXR α ou o RXR γ , forma trimeros, tetrameros e pentâmeros dependendo da multiplicidade dos hexanucleotídeos encontrados no elemento responsivo ^{158; 159}.

Mais recentemente, o RXR foi descrito por ser capaz de formar tetrameros em solução, além da capacidade de formar dímeros. A adição do ligante ou DR-1 a esses tetrameros conduz a sua rápida dissociação em homodímeros ^{160; 161; 162}. Além da formação de trimeros ligado ao DNA, o TR β 1 também foi demonstrado formar homotetrameros em solução. Este complexo oligomérico é favorecido pela alta concentração de proteínas e desfavorecido pela ligação ao ligante ^{163; 164}. A relevância fisiológica desses achados ainda não está esclarecida, porém especula-se que estes complexos protéicos podem de alguma forma modular a ação do hormônio tireoideano.

Até o momento, estes novos estudos têm demonstrado a formação de complexos oligoméricos de um mesmo receptor em solução, como homotetrameros de TR ou RXR, porém complexos oligoméricos de heterodímeros em solução ainda não foram demonstrados.

Aparentemente o seqüestro de receptores nucleares em tetrameros pode ser um mecanismo utilizado pela célula para estocar um excesso de receptores até que seja necessário o desempenho de suas funções fisiológicas como homodímeros e/ou heterodímeros. Desta forma, o equilíbrio dinâmico dos oligômeros de TR e RXR são influenciados pelas concentrações dos receptores, ligação aos ligantes e presença do DNA ^{162; 163; 164}.

Outro importante fator a ser considerado é a diversidade funcional dos TREs encontrados naturalmente como palíndromos, palíndromos invertidos e repetições diretas, e o diferente número de bases entre os hexanucleotídeos, região conhecida como espaçadora. Além disso, estas seqüências são em geral degeneradas, sugerindo que o contexto do DNA possa ser determinante na ligação do TR e regulação da atividade transcricional, como monômeros, homodímeros, heterodímeros ou trimeros ^{45; 152; 165}. A capacidade de ligação de trimeros ao DNA pode providenciar um nível adicional de reconhecimento do DNA que pode contribuir para a discriminação de genes alvo pelos diferentes membros da superfamília de receptores nucleares ¹⁵².

Ribeiro e colaboradores (1992) demonstraram a primeira evidência que os oligômeros de TR ligam-se de forma preferencial aos diferentes TREs. Ensaio de Ligação Proteína-DNA (*Electrophoretic Mobility Shift Assays*) mostraram que a presença de T₃ aboliu a formação de homodímeros em DR-4, mas somente diminuiu a formação destes

complexos em F2, sugerindo que homodímeros estão ligados de forma mais estável neste elemento responsivo. Por outro lado, a presença de T₃ não influenciou a ligação de heterodímeros ligados ao DNA^{45; 125; 126; 130}.

Outra evidência que corrobora a ligação preferencial do TR aos diferentes elementos responsivos foi demonstrada em experimentos realizados em *Saccharomyces cerevisiae*. Nas transfecções realizadas com o elemento responsivo DR-4 a atividade transcrricional ocorreu principalmente com a ligação de heterodímeros (RXR/TR). Em contraste, nos elementos responsivos F2 e TREpal, os homodímeros e heterodímeros apresentaram uma atividade transcrricional semelhante¹⁶⁶.

Um estudo utilizando a técnica de RNA de interferência (siRNA) para abolir a expressão endógena do RXR, em uma linhagem de células pré-neurais de camundongos, possibilitou a análise de genes que são ativados exclusivamente pelo TR. Os resultados demonstraram que somente um grupo de genes regulados por T₃ foi prejudicado pela ausência de RXR, sugerindo que a necessidade de RXR para a ativação de genes é variável e que outras formas oligoméricas de TR devem ser ativas¹⁶⁷.

Recentemente nosso grupo demonstrou utilizando tanto leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*), quanto células de mamíferos (U937 e U2OS), que o TR se liga de forma preferencial aos diferentes elementos responsivos. Foi demonstrado que TRβ ativa a transcrição de forma mais eficiente do que TRα em F2, e isto está correlacionado com a formação preferencial de homodímeros de TRβ neste elemento *in vivo*, visto que a formação de homodímeros de TRα não é eficiente. Além disso, a análise dos efeitos de mutações no TRβ que bloqueiam a formação de homodímeros e/ou heterodímeros revelou que o TRE exerce uma pressão seletiva sob estes complexos, sugerindo que homodímeros de TRβ são ativos em F2, heterodímeros (RXR/TR) em DR-4, e TR monômeros em TREpal. Interessantemente, a hiperexpressão de RXR em células promonocíticas humanas (U937) reduziu a resposta ao T₃ em F2 cerca de 50%, mas não afetou a resposta mediada por T₃ em DR-4¹⁶⁵.

Considerando que o RXR está influenciando a atividade transcrricional do TR em F2, mas não em DR-4, decidimos investigar o mecanismo molecular envolvido nessa modulação. Mais especificamente, o papel da heterodimerização com o RXR, ligado ou não ao DNA, sobre a ativação da transcrição mediada por T₃ nos diferentes elementos responsivos. Os mecanismos que podem estar envolvidos são: 1) competição pela ligação de heterodímeros (RXR/TR) ao DNA; 2) seqüestro de co-ativadores; e 3) seqüestro de TR

em solução. A determinação do mecanismo pelo qual RXR modula a ativação transcricional do TR nos diferentes elementos responsivos irá contribuir para a compreensão da fisiologia molecular e mecanismo de ação do receptor do hormônio tireoideano e determinação do papel da heterodimerização.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Investigar qual região corresponde à dobradiça, do TR β 1 e RXR α humanos, que permite o movimento de rotação do DBD em relação ao LBD desses receptores e o papel do RXR α na modulação da ação do TR β 1 nos diferentes elementos responsivos.

Objetivos Específicos

1. Investigar se as mutações no TR β 1 humano interferem na ligação desses receptores, como homodímeros e heterodímeros com o RXR, aos diferentes TREs:
 - 1.1 Mutações na região *T-box* (**del T-box** e **pro T-box**) do DBD, correspondente aos aminoácidos 175 a 180.
 - 1.2 Deleção da alça que conecta as hélices 1 e 2 do LBD (**del H1-H2**), correspondente aos aminoácidos 233 a 238.
2. Investigar se as mutações no RXR α humano interferem na ligação desses receptores, como homodímero ou heterodímero com o TR, aos diferentes TREs:
 - 2.1 Deleção da região *T-box* (**del T-box**) do DBD, correspondente aos aminoácidos 201 a 209.
 - 2.2 Deleção da alça que conecta o final do DBD ao início do LBD (**del H0-H1**), correspondente aos aminoácidos 225 a 232.
3. Investigar o efeito do excesso de RXR na ação do TR nos diferentes elementos responsivos.
4. Investigar os mecanismos moleculares envolvidos na modulação da ação do receptor do hormônio tireoideano (TR) pelo RXR:
 - 4.1 A importância da ligação de heterodímeros aos diferentes TREs.
 - 4.2 O papel do seqüestro de co-ativadores pelo RXR em solução.
 - 4.3 A importância da formação heterodímeros (TR/RXR) em solução.

MATERIAL E MÉTODOS

Os plasmídeos pCMX-hTR β 1 e pCMX-hRXR α nativo e mutantes foram utilizados para a síntese *in vitro* e *ex vivo* dos receptores do hormônio tireoideano e do receptor do ácido 9-cis retinóico, respectivamente. A transcrição do RNA codificado por este cDNA é controlada pelo promotor do citomegalovírus (CMV) e o promotor do T7, o que permite a expressão desses RNAs em células de mamíferos e pelo promotor da RNA polimerase do bacteriófago T7, permitindo a expressão desses RNAs em um sistema de transcrição e tradução *in vitro*, e conseqüentemente, das proteínas por eles codificadas. Os detalhes da construção destes plasmídeos foram descritos anteriormente^{46, 56}.

Mutações no TR β 1 humano usadas neste estudo

Os TRs mutantes utilizados nesse estudo foram construídos por meio de duas estratégias diferentes, uma pela síntese de oligonucleotídeos dupla fita codificando a seqüência mutada e a sua ligação ao vetor pCMX-hTR β 1, e a outra por mutagênese sítio-dirigida por PCR (Quick Change Site-Directed Mutagenesis Kits, Stratagene). O TR β 1mutante DEL (deleção dos aminoácidos 209 a 214) utilizado em alguns ensaios de ligação proteína-DNA foi descrito anteriormente¹³⁴.

Mutações na região T-box (aminoácidos 175 a 180 – ATDLVL):

Foram realizadas duas mutações na região T-box do TR β 1 humano localizada no DBD e correspondente aos aminoácidos 175 a 180, em um dos mutantes foi feita a deleção dos aminoácidos dessa região (del T-box) e no outro esses aminoácidos foram substituídos por prolinas (pro T-box). Esses mutantes foram construídos por mutagênese sítio-dirigida por PCR (Quick Change Site-Directed Mutagenesis Kits, Stratagene), utilizando como molde o vetor de expressão do TR β 1 nativo (pCMX-hTR β 1), oligonucleotídeos sintéticos como iniciadores (*primers*) contendo as seqüências dos nucleotídeos mutados descritas a seguir, o tampão de reação, os nucleotídeos (dNTPs) e a polimerase (Pfu). A construção do mutante contendo a deleção da T-box foi descrita anteriormente¹⁶⁵.

- **Deleção dos aminoácidos 175 a 180 (del T-box):**

5' TC TAT GTT GGC ATG GAT GAC AG 3'
3' ACG TAG ATA CAA CCG TAC CTA CTG TCG ATC 5'

- **Substituição dos aminoácidos 175 a 180 por prolinas (pro T-box):**

5' TC TAT GTT GGC ATG CCA CCA CCT CCG CCG CCG GAT GAC AG 3'
3' ACG TAG ATA CAA CCG TAC GGT GGT GGA GGC GGC GGC CTA CTG TCG ATC
5'

O primeiro ciclo da PCR foi constituído dos seguintes passos: 1) 95°C por 1 min, 2) 95°C por 30 seg, 55°C por 1 min e 4) 68°C por 20 min. Esse ciclo foi seguido de outros 12 ciclos que começaram a partir do segundo passo. A seguir foi adicionado 1 µL da enzima Dpn1 (New England Biolabs) ao produto e a reação foi incubada por 1 h a 37°C para que a enzima digerisse o DNA parental (metilado). Os plasmídeos mutantes, que não foram digeridos pela Dpn1, foram transformados utilizando células competentes (*E. coli* DH5α), cultivados em meio LB e purificados pelo kit de purificação Maxiprep (Qiagen). A seqüência mutada foi confirmada por sequenciamento do DNA (Sequenase Kits, Stratagene).

Deleção da alça localizada entre as hélices 1 e 2 do LBD (aminoácidos 233 a 238 - NAQGS):

O mutante contendo a deleção dos aminoácidos localizados entre as hélices 1 e 2 do LBD do TRβ1 humano (del H1-H2) foi construído utilizando-se mutagênese sítio-dirigida por PCR (Quick Change Site-Directed Mutagenesis Kit, Stratagene). A deleção desses aminoácidos foi realizada em duas etapas, sendo que cada uma delas consistiu na realização de uma PCR onde foi utilizado um par de oligonucleotídeos dupla fita como iniciadores (*primers*), o vetor de expressão do TRβ1 humano (pCMX-hTRβ1) como molde, o tampão de reação, os nucleotídeos (dNTPs) e a polimerase (Pfu).

Cada uma das etapas consistiu na deleção de três aminoácidos do receptor, sendo que o produto da 1ª etapa foi utilizado como molde para a 2ª etapa. Os iniciadores utilizados continham seqüências que se anelavam antes e após os três aminoácidos a serem deletados, a fim de que eles não fossem passados para as novas cópias obtidas por PCR.

- **Deleção dos aminoácidos 225 a 232 (del H0-H1):**

1ª Etapa:

5' CC GAA GCC CAT GTG GCG ACC GGC AGC CAC TGG AAG CAA AAA CGG 3'
3' GG CTT CGG GTA CAC CGC TGG CCG TCG GTG ACC TTC GTT TTT GCC 5'

2ª Etapa:

5' CC GAA GCC CAT GTG GCG ACC TGG AAG CAA AAA CGG AAA TTT CTG 3'
3' GG CTT CGG GTA CAC CGC TGG ACC TTC GTT TTT GCC TTT AAA GAC 5'

O primeiro ciclo da PCR foi constituído dos seguintes passos: 1) 95°C por 1 min, 2) 95°C por 30 seg, 55°C por 1 min e 4) 68°C por 20 min. Esse ciclo foi seguido de outros 12 ciclos que começaram a partir do segundo passo. Ao final de cada PCR foi adicionado 1 µL da enzima Dpn1 ao produto para que essa digerisse o DNA parental (metilado) sendo as reações incubadas a 37°C por 1 h. Posteriormente, foi realizada a transformação dos plasmídeos obtidos em bactérias competentes (*E. coli* DH5α). Para um diagnóstico prévio das mutações, após a 1ª etapa de deleção foram escolhidas cinco colônias transformadas do mutante, e essas foram submetidas a uma nova PCR utilizando iniciadores específicos para a amplificação do TRβ1 humano. Os produtos dessas reações foram incubados com a enzima de restrição Hpa II que digeriam de forma diferente os plasmídeos originais e os mutados, e analisados em um gel de agarose 1% para a confirmação das mutações. Posteriormente, as colônias foram purificadas pelo Kit Maxiprep (Qiagen) e as seqüências mutadas foram confirmadas pelo sequenciamento do DNA.

Mutações no RXRα humano usadas neste estudo

Os dois RXR contendo mutações na provável região de dobradiça utilizados nesse estudo foram construídos por mutagênese sítio-dirigida por PCR (Quick Change Site-Directed Mutagenesis Kits, Stratagene).

Deleção da região T-box (aminoácidos 201 a 209 – KREAVQEER) e da alça localizada entre o final do DBD e a hélice 1 do LBD (aminoácidos 225 a 232 – SANEDMPV):

As mutações no RXR α humano foram realizadas em três etapas, sendo que cada uma delas consistiu da realização de uma PCR onde foi utilizado um par de oligonucleotídeos dupla fita ou iniciadores (*primers*), o vetor de expressão do RXR α humano (pCMX-hRXR α) como molde, o tampão de reação, os nucleotídeos (dNTPs) e a polimerase (Pfu).

Cada etapa consistiu na deleção de três aminoácidos do receptor e os produtos foram utilizados como molde para a próxima etapa. Os iniciadores utilizados continham seqüências que se anelavam antes e após os três aminoácidos a serem deletados, a fim de que eles não fossem passados para as novas cópias obtidas por PCR.

- **Deleção dos aminoácidos 201 a 209 (del T-box):**

1ª Etapa:

5' C CAG AAG TGC CTG GCC ATG GGC ATG GCC GTG CAG GAG GAG CGG C 3'
3' G GTC TTC ACG GAC CGG TAC CCG TAC CGG CAC GTC CTC CTC GCC G 5'

2ª Etapa:

5' C CAG AAG TGC CTG GCC ATG GGC ATG GAG GAG CGG CAG CGT GGC 3'
3' G GTC TTC ACG GAC CGG TAC CCG TAC CTC CTC GCC GTC GCA CCG 5'

3ª Etapa:

5' C CAG AAG TGC CTG GCC ATG GGC ATG CAG CGT GGC AAG GAC CGG 3'
3' G GTC TTC ACG GAC CGG TAC CCG TAC GTC GCA CCG TTC CTG GCC 5'

- **Deleção dos aminoácidos 225 a 232 (del H0-H1):**

1ª Etapa:

5' G AAT GAG GTG GAG TCG ACC AGC GAG GAC ATG CCG GTG GAG AGG 3'
3' C TTA CTC CAC CTC AGC TGG TCG CTC CTG TAC GGC CAC CTC TCC 5'

2ª Etapa:

5' G AAT GAG GTG GAG TCG ACC AGC CCG GTG GAG AGG ATC CTG GAG G 3'
3' C TTA CTC CAC CTC AGC TGG TCG GGC CAC CTC TCC TAG GAC CTC C 5'

3ª Etapa:

5' G AAT GAG GTG GAG TCG ACC AGC GAG AGG ATC CTG GAG GCT GAG C 3'
3' C TTA CTC CAC CTC AGC TGG TCG CTC TCC TAG GAC CTC CGA CTC G 5'

O primeiro ciclo da PCR foi constituído dos seguintes passos: 1) 95°C por 1 min, 2) 95°C por 30 seg, 55°C por 1 min e 4) 68°C por 12 min. Esse ciclo foi seguido de outros 12 ciclos que começaram a partir do segundo passo. Ao final de cada PCR foi adicionado 1 µL da enzima Dpn1 ao produto para que essa digerisse o DNA parental (metilado) sendo as reações incubadas a 37°C por 1 h. Posteriormente, foi realizada a transformação dos plasmídeos obtidos em bactérias competentes (*E. coli* DH5α). Para um diagnóstico prévio das mutações, após cada deleção em série foram escolhidas cinco colônias transformadas de cada mutante, e estas foram submetidas a uma nova PCR utilizando iniciadores específicos para a amplificação do RXRα humano. Os produtos dessas reações foram incubados com enzimas de restrição que digeriam de forma diferente os plasmídeos originais e os mutados, e analisados em um gel de agarose 1% para a confirmação das mutações. Posteriormente, as colônias foram purificadas pelo Kit Maxiprep (Qiagen) e as seqüências mutadas foram confirmadas pelo sequenciamento do DNA.

Outros vetores utilizados

O RXRα humano contendo uma dupla mutação na superfície de dimerização (RXR LL419,420RR) foi construído por mutagênese sítio-dirigida por PCR (Quick Change Site-Directed Mutagenesis Kits, Stratagene). Em alguns experimentos foi utilizado um vetor quimérico contendo o DBD do fator de transcrição de leveduras GAL4 fusionado ao LBD do RXRα humano (DBD-GAL/RXR-LBD) e o gene repórter do GAL4 contendo cinco sítios de ligação localizados na posição 5' (*upstream*) do promotor mínimo do adenovírus E1b ligado às seqüências que codificam a enzima luciferase (GAL-ERE)⁹⁷.

Genes Repórteres

Uma série de genes repórteres foi construída utilizando-se plasmídeos derivados do vetor pUC19 (New England Biolabs) contendo cada plasmídeo duas cópias dos seguintes

TREs: DR-4 5'-ttcAGGTCAcaggAGGTCAgag-3', F2 5'-ttcTGACCTcattggAGGTCAgag-3', TREpal 5'-attcAGGTCATGACCTgaat-3' e DR-1 5'-ttcAGGTCAcAGGTCAgag-3'. Estes elementos responsivos situam-se na posição 5' (*upstream*) da seqüência de -32/+45 do promotor mínimo da timidina cinase do vírus herpes simplex (TK). O promotor mínimo contém as seqüências responsáveis para a ligação da maquinaria basal de transcrição e da RNA polimerase II e não possui seqüências conhecidas para a ligação de outros fatores de transcrição, os quais poderiam interferir na transcrição induzida pelos receptores nucleares estudados. Este promotor está associado às seqüências que codificam a enzima luciferase (LUC).

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 os métodos descritos anteriormente e comentados a seguir ¹⁶⁸.

Nos experimentos da região de dobradiça, comparando o TR nativo e mutantes, foram utilizadas células derivadas de promonócitos humanos (U937) obtidas do Centro de Cultura de Células da Universidade da Califórnia, São Francisco (UCSF - *University of California San Francisco*). Estas células foram cultivadas em meio RPMI 1640 (GIBCO), contendo 10% de soro bovino fetal (GIBCO) com 2 mM glutamina, 50 U/mL penicilina e 50 µg/mL estreptomicina (SIGMA) e mantidas em uma incubadora a 37°C com 5% de CO₂.

O método de eletroporação foi utilizado para a transfecção das células em cultura. As células U937 foram coletadas por centrifugação a 4.000 rpm por 3 min e suspensas (10 milhões) em 0,5 mL de solução de *Phosphate Buffered Saline* (PBS: 8,0g NaCl; 0,2g KCl; 1,44 g Na₂HPO₄; 0,24 g KH₂PO₄; H₂O q.s.p. 1 L; pH 7.4) contendo 0,1 g/L CaCl₂ e 0,1% dextrose. Estas células foram a seguir misturadas a 4 µg do plasmídeo repórter e 2 µg do vetor de expressão dos TRs nativos ou mutantes. As células, com os respectivos plasmídeos, foram suspensas e transferidas para uma cuveta própria para eletroporação e, após 5 min em temperatura ambiente, eletroporadas utilizando-se um gerador de pulso Bio-Rad com voltagem de 300 mV e 950 µF de capacitância. As células eletroporadas foram em seguida transferidas para tubos cônicos contendo 6 mL de meio RPMI 1640 (GIBCO)

com 10% de soro bovino fetal (GIBCO). Neste meio, as células foram ressuspensas e transferidas para placas de 12 poços (1 mL/poço), e em seguida foram incubadas por 24 h a 37°C na ausência ou presença de 1,0 µL de 100 nM de T₃ (GIBCO) diluído em etanol.

Nos experimentos da região de dobradiça, comparando o RXR nativo e mutantes, foram utilizadas células derivadas de fibroblastos de rim de macaco (COS-1) obtidas do Centro de Cultura de Células da UCSF. Estas células foram cultivadas em meio DMEN (GIBCO), contendo 10% de soro bovino fetal (GIBCO) com 2 mM glutamina, 50 U/mL penicilina e 50 µg/mL estreptomicina (SIGMA) e mantidas em uma incubadora a 37°C com 5% de CO₂.

O método de eletroporação foi utilizado para a transfecção das células em cultura. As células COS-1 foram tripsinizadas (0,05% de tripsina + 0,02% de EDTA), coletadas por centrifugação a 1.000 rpm por 5 min e suspensas (10 milhões) em 0,5 mL de solução de PBS contendo 0,1 g/L CaCl₂ e 0,1% dextrose. Estas células foram a seguir misturadas a 4 µg do plasmídeo repórter e 2 µg do vetor de expressão dos RXR nativo ou mutantes, na presença de 2 µg do vetor de expressão do TR nativo. As células, com os respectivos plasmídeos, foram suspensas e transferidas para uma cuveta própria para eletroporação e, após 5 min em temperatura ambiente, eletroporadas utilizando-se um gerador de pulso Bio-Rad com voltagem de 300 mV e 750 µF de capacitância. As células eletroporadas foram em seguida transferidas para tubos cônicos contendo 6 mL de meio DMEN (GIBCO) com 10% de soro bovino fetal (GIBCO). Neste meio, as células foram ressuspensas e transferidas para placas de 12 poços (1 mL/poço), e em seguida foram incubadas por 24 h a 37°C na ausência ou presença de 1,0 µL de 100 nM de T₃ (GIBCO) diluído em etanol e em alguns casos 1,0 µL de 100 nM do ácido 9-cis retinóico (GIBCO).

Nos experimentos realizados para analisar o mecanismo envolvido na modulação do RXR sobre o TR foram utilizadas células U937, obtidas do Centro de Cultura de Células da UCSF, e os procedimentos de cultura de células e de eletroporação foram os mesmos descritos para essas células anteriormente.

O plasmídeo pCMVβgal, que expressa a β-galactosidase, foi utilizado nos experimentos (2 µg/transfecção) para verificar a eficiência da transfecção. A β-galactosidase produzida no meio de cultura pelas células transfectadas foi medida como descrito previamente¹⁶⁹.

Para o ensaio da enzima luciferase, as células U937 foram transferidas para microtubos de 1,5 mL e centrifugadas por 2 min a 13.000 rpm. O sobrenadante foi aspirado e descartado, e o precipitado celular foi lisado e solubilizado pela adição de 150 µL de 0,1 M Tris-HCl, pH 7,8 contendo 0,1% de Triton X 100 por 10 min. Os microtubos foram novamente centrifugados por 2 min a 13.000 rpm. O lisado celular (50 µL) foi misturado com o substrato para a enzima luciferase (50 µL) (Luciferase Assay System, Promega) e a medida da atividade desta enzima foi quantificada em um luminômetro (Turner).

No caso das células COS-1, o meio DMEN foi aspirado das placas de 12 poços e foi adicionado o tampão de lise 200 µL por poço. As placas foram colocadas em um agitador de mesa (*shaker*) por 15 min e congeladas por 15 min no freezer a -80°C. A seguir, as placas foram colocadas no agitador até que descongelassem e fosse possível coletar o lisado celular para a quantificação da luciferase.

Cálculo da Taxa de Ativação da Transcrição e Análise Estatística

A taxa de ativação da transcrição foi calculada pela razão entre a atividade das células induzidas pelo hormônio sobre a atividade das células tratadas com o veículo. Este valor foi utilizado para o cálculo do percentual dos TR e/ou RXR mutantes em relação ao receptor nativo que foi considerado como 100%. Todos os gráficos apresentados correspondem à média de no mínimo três experimentos e foram feitos utilizando o programa Prisma 3.0 (GraphPad Software, Inc.).

A análise estatística também foi realizada pelo programa Prisma 3.0 (GraphPad Software, Inc.), onde foi feita a análise de variância a 5% (ANOVA) e na comparação das médias do TR e/ou RXR nativo e mutantes foi utilizado o teste de Newman-Keuls.

Transcrição e Tradução *in vitro*

Os receptores utilizados para os ensaios de ligação com o DNA foram sintetizados utilizando-se um kit de transcrição e tradução *in vitro* (TNT T7 – Quick Coupled Transcription/Translation System – Promega)¹³⁰. Nesta técnica, os plasmídeos contendo os cDNAs que codificam o TRβ1 humano nativo e mutado e/ou o RXRα humano nativo e

mutado regulados pelo promotor da RNA polimerase do bacteriófago T7 são adicionados a um sistema que contém toda a maquinaria necessária para a transcrição e tradução da proteínas. Este sistema contém a RNA polimerase do bacteriófago T7, ribonucleotídeos, inibidor de RNase (RNAsin) e um lisado de reticulócitos de coelho suplementado com 40 μM ZnCl_2 e aminoácidos (exceto a metionina). A metionina marcada ou não com enxofre 35 (^{35}S -Metionina, Amershan, Pharmacia), foi adicionada no momento da reação, dependendo se o objetivo era a síntese de receptores radioativamente marcados ou não, respectivamente. As reações foram realizadas em microtubos de 0,5 mL com a adição de 1 a 2 μg do plasmídeo aos componentes necessários para a transcrição e tradução, seguindo-se uma incubação a 30°C por 90 min. Ao término da reação, foram coletadas amostras (1 a 2 μL) para a realização da eletroforese de proteínas sendo o restante da reação congelado em nitrogênio líquido e armazenado no freezer a -80°C.

Eletroforese de Proteínas em Gel de Poliacrilamida com Sulfato Duodecil Sódico (SDS-PAGE)

A eletroforese de proteínas, em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (sulfato duodecil sódico “SDS”) ¹⁷⁰, foi utilizada para confirmar a eficiência da síntese protéica *in vitro* assim como o tamanho da proteína gerada. Após a corrida eletroforética, o gel foi fixado em uma solução de 30% metanol e 10% ácido acético glacial durante 30 min, sendo em seguida exposto por 30 min a uma solução amplificadora (Amplify, Amersham) para intensificar a transmissão da energia radioativa e secado a vácuo a 70°C por 40 min (Geldryer, BioRad). O gel seco foi submetido à autorradiografia a -80°C utilizando-se um filme de raios-X (Kodak) por um período de 8 a 24 h, sendo posteriormente revelado.

Ensaio de Ligação Proteína-DNA (*Eletrophoretic Mobility Shift Assay*)

Para testar os receptores, TR e/ou RXR traduzidos *in vitro*, quanto a sua capacidade de se ligar a oligonucleotídeos contendo diferentes TREs, utilizamos o Ensaio de Ligação Proteína-DNA ¹³⁰. Quantidades equivalentes dos receptores, TR e RXR, nativos e

mutantes, marcados ou não com ^{35}S -Metionina, usualmente 1 a 3 μL da reação de transcrição e tradução, foram misturados com 20 ng de DNA (DR-4: 5'-ttcAGGTCAcaggAGGTCAgag-3', F2: 5'-ttcTGACCCcattggAGGTCAgag-3', TREPai: 5'-attcAGGTCATGACCTgaat-3' e DR-1 5'-ttcAGGTCAcAGGTCAgag-3') e 1 μg do polinucleotídeo dupla fita dIdC (Pharmacia) em um tampão contendo 0,2 mM NaH_2PO_4 , 1 mM MgCl_2 , 0,5 mM EDTA, 5% glicerol, em um volume final de 20 μL . As reações foram feitas em microtubos de 0,5 mL mantidos no gelo. Após a adição dos componentes da reação de ligação, os microtubos foram transferidos do gelo para a temperatura ambiente por 20 min e ao final deste período às reações foram submetidas à eletroforese em um gel de poli(acrilamida) 5% não desnaturante. Nesta condição, os complexos de proteínas que não se ligarem ao DNA, permanecem intactos e não são afetados pela eletroforese. Isto ocorre devido ao fato que a carga do complexo proteína-DNA é fornecida pelo DNA, ou seja, negativa, pois a somatória total de cargas da proteína não é suficiente para que ela se desloque sozinha no gel. O gel foi preparado com 5% de acrilamida/bisacrilamida em um tampão TEA composto de 67 mM Tris-base, 10 mM EDTA e 33 mM Acetato de sódio, pH 7,5 a 25°C. Após a adição de 200 μL de persulfato de amônia 10% e 25 μL de N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED), esta mistura foi transferida para um sistema vertical de eletroforese (Hoeffer) até que ocorresse a polimerização. O gel foi submetido à eletroforese por 30 min, 200 V a 4°C para a remoção de possíveis contaminantes presentes na solução de acrilamida. Ao término desta pré-corrída, aplicamos as reações nas canaletas, iniciando-se a eletroforese por 2 h e 30 min, 220 V a 4°C com o mesmo tampão TEA utilizado no gel. Após a eletroforese, o gel foi lavado duas vezes com uma solução fixadora contendo 30% metanol e 10% ácido acético glacial, onde permaneceu por um período de 8 a 12 h e em seguida foi colocado por 30 min em uma solução amplificadora do sinal radiográfico (Amplify, Amersham). A seguir, o gel foi secado (Geldryer, BioRad) por 1 h e colocado junto a um filme de raios-X para autorradiografia a -80°C por 24 h e posteriormente revelado. A migração dos complexos protéicos ligados ao DNA caracteriza o tipo de complexo formado sobre o elemento responsivo, podendo-se então separá-los em monômeros, homodímeros ou heterodímeros pelas diferenças de mobilidade no gel.

RESULTADOS

Importância da Região de Dobradiça na Ligação do Receptor do Hormônio Tiroideano ao DNA

Para verificar o papel da região conhecida como dobradiça na ligação do TR aos elementos responsivos no DNA dispostos em diferentes orientações (DR-4, F2 e TREpal), os ensaios de ligação proteína-DNA foram utilizados para testar a capacidade dos receptores mutados, na ausência e presença de RXR nativo, se ligarem a oligonucleotídeos sintéticos contendo os diferentes TREs. Estes experimentos foram realizados com as proteínas sintetizadas *in vitro* marcadas (TR nativos e mutantes) ou não com ^{35}S -Metionina (RXR nativo).

A eficiência da síntese *in vitro* dos receptores nativos e mutantes foi acompanhada pela eletroforese das proteínas sintetizadas. Como pode ser observado na figura 12, o gel de SDS demonstra que as reações de síntese dos receptores TR e RXR foram eficientes e podem ser visualizadas por bandas bem definidas e com massas moleculares semelhantes e equivalentes a 50 kDa.

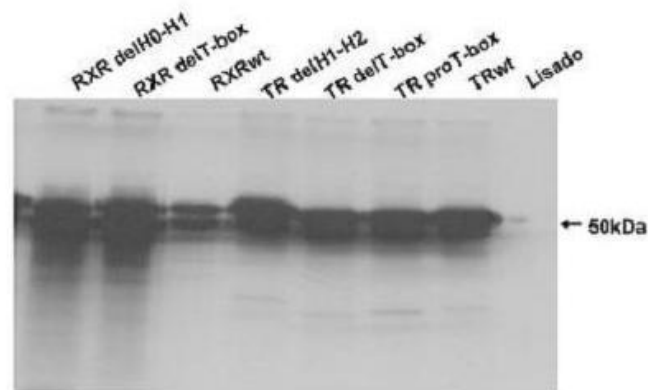


Figura 12: Determinação da massa molecular aparente dos receptores sintetizados pelo método de transcrição e tradução *in vitro* em reticulócitos de coelho. Os receptores foram sintetizados na presença de metionina marcada com enxofre (^{35}S), submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS e posteriormente o gel foi submetido à autorradiografia. Na parte superior estão indicados os receptores e a seta na lateral indica a massa molecular. Neste ensaio foi utilizado o marcador de massa molecular *Low Range* (BioRad). O lisado corresponde a uma reação onde não foi adicionado cDNA.

Análise das mutações na região T-box do TR β 1 humano

Os ensaios de ligação proteína-DNA apresentados na figura 13 com os elementos responsivos DR-4, F2 e TREpal, mostram que a adição de TR nativo isoladamente levou a formação de monômeros e homodímeros e a adição de RXR nativo promoveu a formação de heterodímeros.

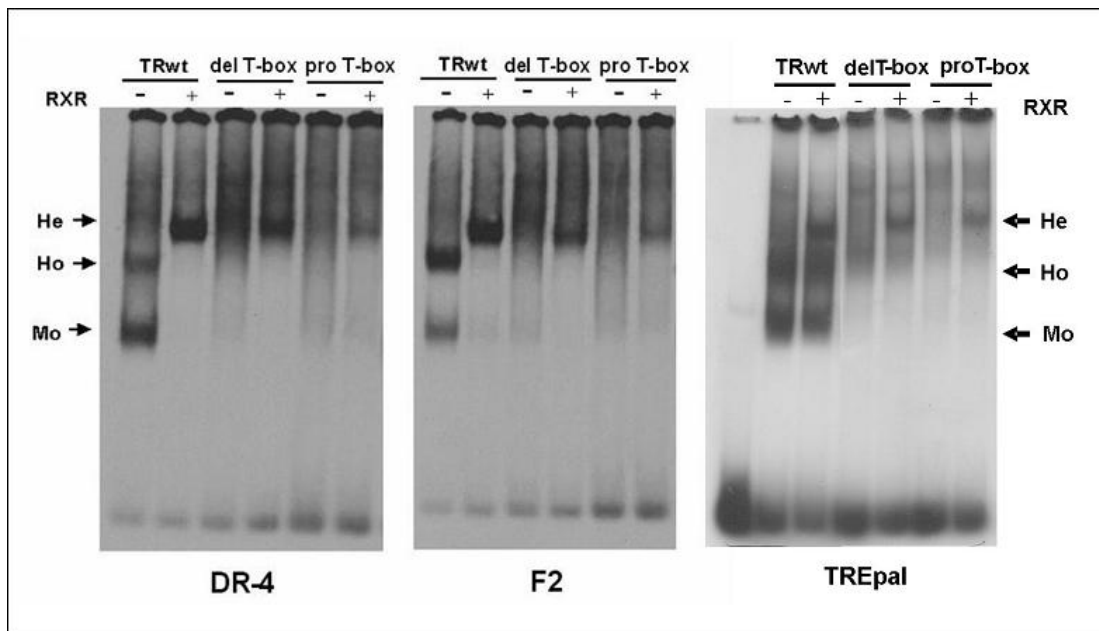


Figura 13: Formação de monômeros (Mo), homodímeros (Ho) e heterodímeros (He) de hTR β 1wt e dos mutantes da região T-box (del T-box e pro T-box) em DR-4, F2 e TREpal. Os ensaios de ligação proteína-DNA foram realizados empregando-se de 1 a 3 μ l de cada receptor sintetizado *in vitro* marcado (35 S-Metionina), na ausência ou presença de hRXR α não marcado e 20ng do elemento responsivo por reação. As reações foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 5% não-desnaturante e posteriormente o gel foi submetido à autorradiografia.

As mutações na região T-box, a deleção (del T-box) e a substituição por prolinas (pro T-box), aboliram a formação de homodímeros, porém esses mutantes ainda foram capazes de formar heterodímeros nos três elementos responsivos, sendo que o mutante pro T-box apresentou uma redução mais acentuada na formação de heterodímeros.

Resposta ao T₃ mediada pelos mutantes da região T-box do TRβ1 humano em células U937

Para avaliar a capacidade destes mutantes em mediar a ação de T₃ nos diferentes TREs comparada com a resposta mediada pelo TR nativo, foram realizados ensaios de co-transfecção transitória com plasmídeos de expressão para o TR nativo ou mutantes (2,0 µg), juntamente com 4,0 µg de um plasmídeo repórter contendo um dos diferentes TREs ligado a seqüências que codificam a enzima luciferase (LUC) em células promonocíticas humanas (U937) cultivadas na ausência ou presença de T₃.

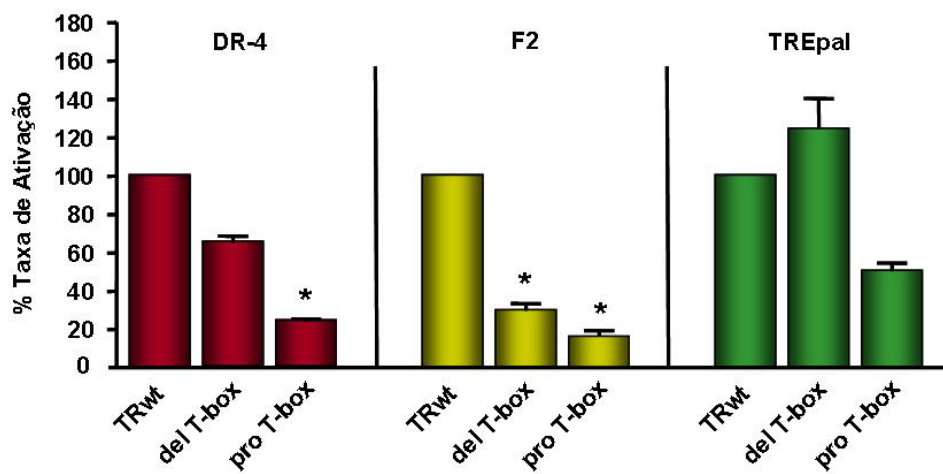


Figura 14: Resposta ao T₃ mediada pela adição de 2,0µg do vetor de expressão do hTRβ1wt ou mutantes (del T-box e pro T-box), nos diferentes elementos responsivos (DR-4, F2 e TREpal). As células U937 foram co-transfectadas com 4µg do vetor para o gene repórter TRE-2TK-LUC e tratadas com etanol ou 100nM de T₃. A atividade do gene repórter foi medida após 22h com a lise das células e os números representam o percentual da taxa de ativação em relação ao TR nativo. Este gráfico corresponde à média de no mínimo três experimentos realizados com cada um dos TREs. A análise estatística foi realizada pela análise de variância a 5% (ANOVA) seguida da comparação das médias pelo Teste de Newman-Keuls (* p<0.05 vs TRwt).

Na figura 14 observam-se os percentuais da taxa de ativação da transcrição mediada pelos TRs com mutações na região T-box em relação ao TR nativo observados nas transfecções realizadas nos diferentes elementos responsivos (DR-4, F2 e TREpal).

O mutante pro T-box apresentou uma reduzida capacidade de ativar a transcrição nos três elementos responsivos estudados (DR-4: 24% ± 1.5, F2: 16.5% ± 3.0 e TREpal:

50.3% \pm 4.3). A substituição dos aminoácidos dessa região (175 a 180) por prolinas aparentemente influenciou na conformação tridimensional da proteína resultando na inativação do receptor.

O mutante del T-box apresentou um comportamento variável em cada um dos elementos responsivos. Em DR-4 o mutante apresentou uma redução de 35% na taxa de ativação (65% \pm 3.7) em comparação ao TR nativo e em TREpal apresentou uma ativação da transcrição igual ou maior que 100% (124% \pm 16.4), em ambos os elementos responsivos essa ativação foi provavelmente devido a formação de heterodímeros, uma vez que a mutação nessa região aboliu a formação de monômeros e homodímeros como mostrado nos ensaios de ligação proteína-DNA. Por outro lado, em F2 esse mutante apresentou uma drástica redução na ativação da transcrição 70% (ativação de 30% \pm 4.0) sugerindo que a ativação da transcrição nesse elemento seja via homodímeros.

De forma geral, os resultados sugerem que a região T-box não atua como uma dobradiça, mas ela parece ser importante para a ligação de homodímeros ao DNA, por conduzir de forma adequada o posicionamento da terceira hélice do DBD, região chamada de A-box, de forma a permitir sua interação com as bases da fenda menor do DNA.

No caso dos heterodímeros, o RXR deve estar se ligando de forma específica ao DNA e desta forma, carregando o TR que na ausência da região T-box estaria ligado de forma inespecífica ao DNA.

Análise da deleção da alça localizada entre as hélices 1 e 2 (H1-H2) do LBD do TR β 1 humano

Os ensaios de ligação proteína-DNA apresentados na figura 15 com os elementos responsivos DR-4, F2 e TREpal, mostram que a adição de TR nativo isoladamente levou a formação de monômeros, exceto em DR-4, e homodímeros e a adição de RXR nativo promoveu a formação de heterodímeros.

O mutante contendo a deleção da alça localizada entre as hélices 1 e 2 do LBD do TR β 1, del H1-H2, se ligou aos diferentes elementos responsivos de forma equivalente ao TR nativo, formando monômeros (F2 e TREpal) e homodímeros e heterodímeros nos três elementos responsivos.

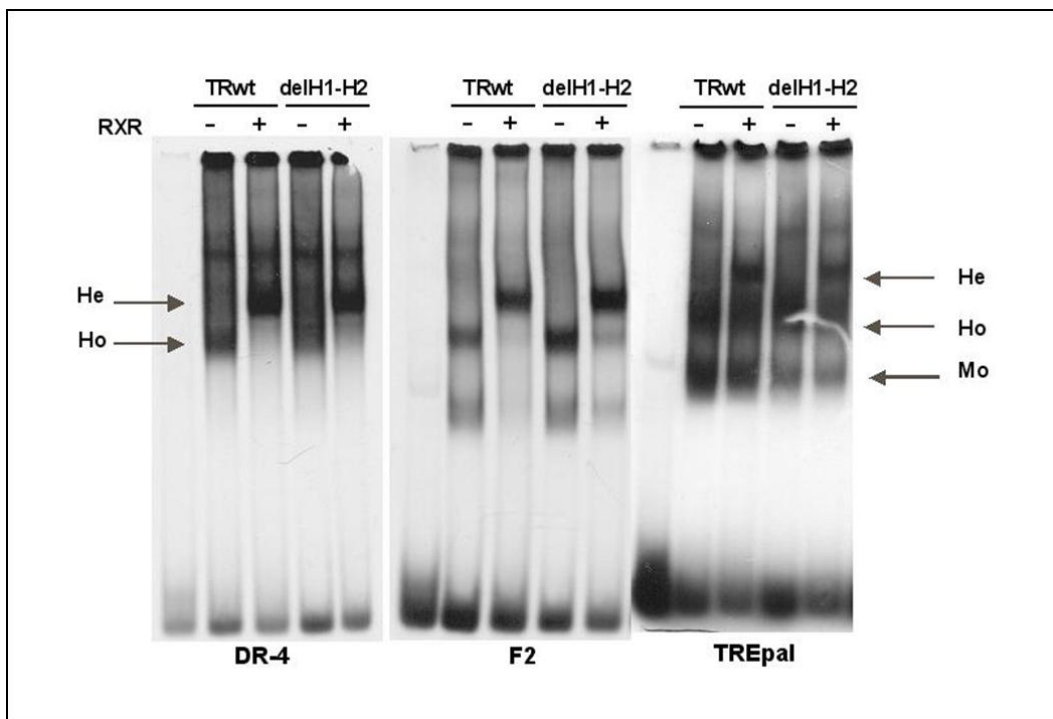


Figura 15: Formação de monômeros (Mo), homodímeros (Ho) e heterodímeros (He) de hTRβ1wt e do mutante da alça localizada entre as hélices 1 e 2 do LBD do TR (del H1-H2) em DR-4, F2 e TREpal. Os ensaios de ligação proteína-DNA foram realizados empregando-se de 1 a 3μl de cada receptor sintetizado *in vitro* e marcado (³⁵S-Metionina), na ausência ou presença de RXRα não marcado e 20ng do elemento responsivo por reação. As reações foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 5% não-desnaturante e posteriormente o gel foi submetido à autorradiografia.

Resposta ao T₃ mediada pela deleção da alça localizada entre as hélices 1 e 2 (H1-H2) do LBD do TRβ1 humano em células U937

Para analisar a função do mutante contendo a deleção da alça localizada entre as hélices 1 e 2 do LBD do TR (del H1-H2) foram realizadas curvas dose-resposta com diferentes concentrações de T₃, variando de 10⁻¹¹ a 10⁻⁴ M.

Nos experimentos realizados em DR-4 (figura 16A) o mutante del H1-H2 apresentou uma taxa de ativação de 6.5 e valor de EC50 = 1.7x10⁻⁸M, ou seja, muito semelhante ao TR nativo que teve uma taxa de ativação de 8.3 e EC50 = 2.6x10⁻⁸M. O mesmo resultado foi observado em F2 (figura 16B), onde o mutante apresentou uma taxa de ativação de 23.0 e EC50 = 2.0x10⁻⁷M e o TR nativo uma taxa de ativação de 21.0 e EC50 = 8.6x10⁻⁸M. Em TREpal (figura 16C), o mutante apresentou uma taxa de ativação

igual a 4.3 e $EC_{50} = 8.4 \times 10^{-8} M$ e o TR nativo uma taxa de ativação de 4.7 e $EC_{50} = 3.6 \times 10^{-8} M$.

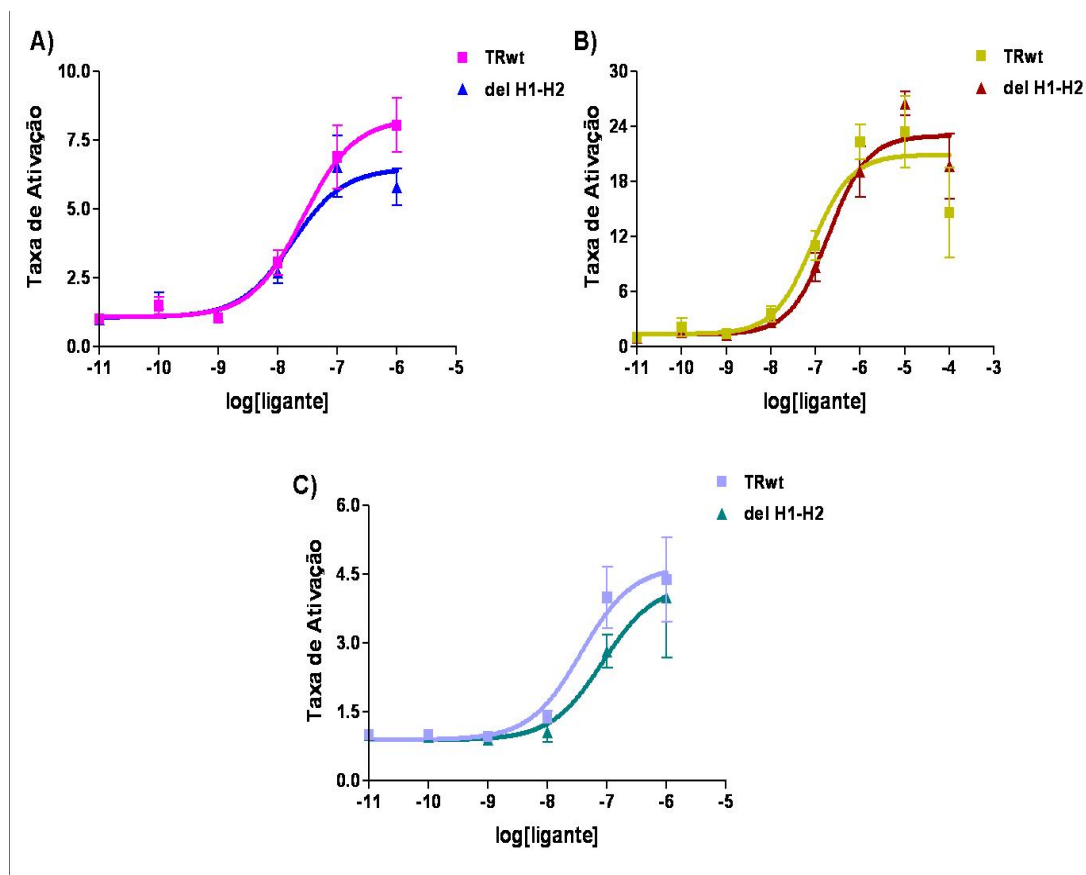


Figura 16: Resposta ao T_3 mediada pela adição de $2,0 \mu g$ do vetor de expressão do hTR β 1wt ou do mutante (del H1-H2) em DR-4 (A), F2 (B) e TREpal (C). As células U937 foram co-transfectadas com $4 \mu g$ do vetor para o gene repórter TRE-2TK-LUC e tratadas diferentes concentrações de T_3 variando de $10^{-11} M$ a $10^{-4} M$. A atividade do gene repórter foi medida após 22h com a lise das células e os números representam a taxa de ativação da transcrição. Este gráfico corresponde a média de no mínimo três experimentos realizados com cada um dos TREs. A análise estatística foi realizada pela análise de variância a 5% (ANOVA) seguida da comparação das médias pelo Teste de Newman-Keuls.

Os resultados mostram que a deleção dessa região do TR (aminoácidos 233 a 238) não afetou a ligação ao DNA e a ativação transcricional mediada por T_3 nos diferentes TREs, sugerindo que essa região não corresponda à região de dobradiça.

Como evidenciado nos resultados, as mutações realizadas nas três diferentes regiões do TR β 1 humano estudadas (T-box, alça entre H0-H1 e alça entre H1-H2) não corresponderam à região de dobradiça do TR, a próxima possibilidade analisada foi a de

que não haveria região de dobradiça no TR, e sim no RXR. Desta forma, para identificar a presença da região de dobradiça no RXR α humano foram realizadas deleções em duas diferentes regiões do receptor, a região T-box e a alça localizada entre o final do DBD e a hélice 1 do LBD (H0-H1).

Análise da deleção da região T-box e da alça localizada entre o final do DBD e a hélice 1 do LBD do RXR α humano

Os ensaios de ligação proteína-DNA apresentados na figura 17 com os elementos responsivos DR-4, F2 e TREpal mostram que a adição de TR nativo isoladamente levou a formação de monômeros e homodímeros e a adição de RXR nativo promoveu a formação de heterodímeros. Os RXR mutantes, del T-box e del H0-H1, formaram heterodímeros com o TR β 1 nativo de forma semelhante ao RXR nativo nos três elementos responsivos estudados.

Esses experimentos foram realizados tanto com o TR marcado com ^{35}S -metionina e o RXR não marcado, como mostrado na figura 17, como ao contrário com o RXR marcado e o TR não marcado (dados não mostrados) e o resultado encontrado foi o mesmo.

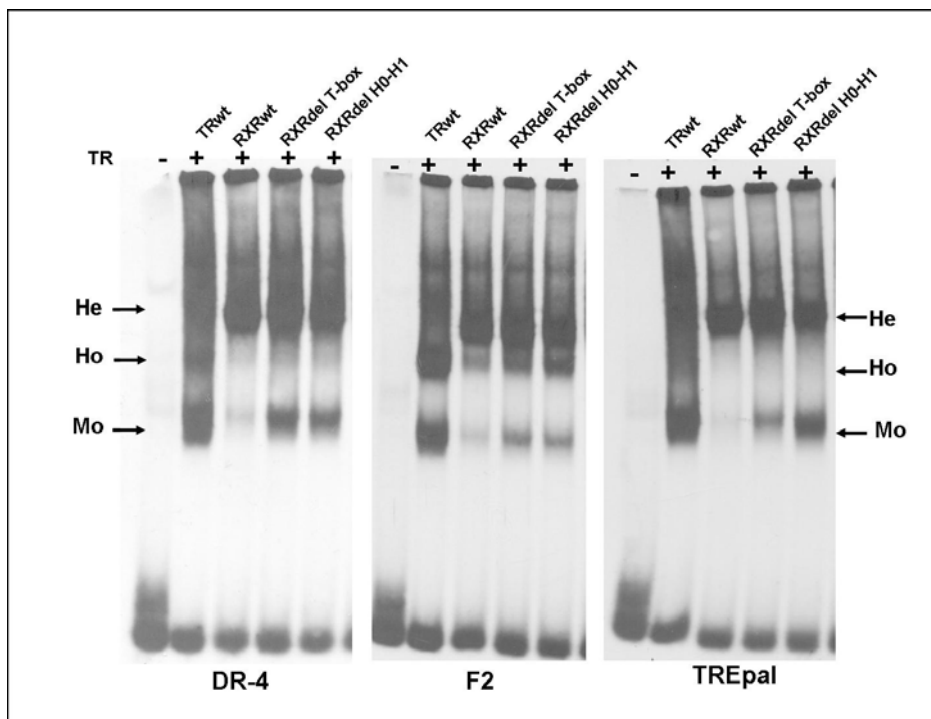


Figura 17: Formação de monômeros (Mo), homodímeros (Ho) de TR β 1wt e heterodímeros (He) com o RXRwt e os RXR mutantes (del T-box e del H0-H1) em DR-4, F2 e TREpal. Os ensaios de ligação proteína-DNA foram realizados empregando-se de 1 a 3 μ l de RXR α sintetizado *in vitro* não marcado, na presença de TR β 1wt marcado com (35 S-Metionina) e 20ng de TRE por reação. As reações foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 5% não-desnaturante e posteriormente o gel foi submetido à autorradiografia.

Adicionalmente, para verificar se essas mutações no RXR não afetaram a capacidade dos receptores se ligarem como homodímeros no seu elemento responsivo natural (DR-1) foram realizados ensaios de ligação proteína-DNA nesse elemento responsivo (figura 18). Como esperado, o RXR nativo foi capaz de se ligar ao elemento responsivo como homodímero na ausência e presença do ligante (ácido 9-cis retinóico), sendo que a ligação foi mais eficiente na presença do mesmo. Por outro lado, o mutante del H0-H1 se ligou fortemente a DR-1 tanto na ausência, quanto na presença do hormônio. O mutante del T-box não se ligou de forma eficiente como homodímero em DR-1.

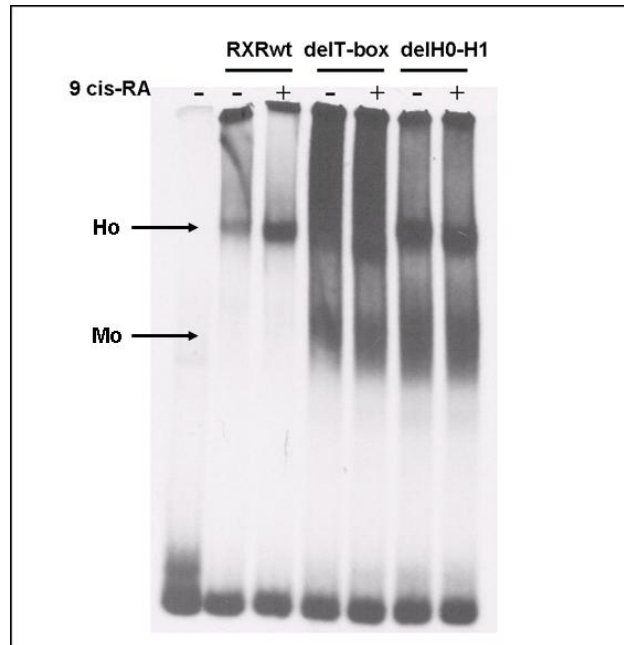


Figura 18: Formação de homodímeros (Ho) de RXRwt e monômeros (Mo) e homodímeros (Ho) dos RXR mutantes del T-box e del H0-H1 em DR-1, na ausência e presença do ácido 9-cis retinóico (9-cis-RA) na concentração de 10^{-6} M. Os ensaios de ligação proteína-DNA foram realizados empregando-se de 1 a 3μ l de RXR α sintetizado *in vitro* e marcado (35 S-Metionina) e 20ng de DR-1 por reação. As reações foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 5% não-desnaturante e posteriormente o gel foi submetido à autorradiografia.

Resposta ao T₃ mediada pela deleção da região T-box e da alça localizada entre o final do DBD (H0) a hélice 1 (H1) do LBD do RXR α humano em células COS-1

Para se analisar se as mutações no RXR α humano influenciaram na ativação da transcrição do TR β 1 em resposta ao T₃, foram realizadas co-transfecções transitórias e ensaios de gene repórter em fibroblatos derivados de células de rim de macaco (COS-1). Essas células foram utilizadas por apresentarem baixos níveis de intracelulares de RXR.

Na figura 19 observa-se os percentuais da taxa de ativação da transcrição mediada pelo TR nativo, RXR nativo e mutantes (del T-box e del H0-H1) nas transfecções realizadas nos elementos responsivos ao TR e também no seu elemento responsivo natural DR-1.

Nos três elementos responsivos ao TR estudados, DR-4, F2 e TREpal, as taxas de ativação dos RXR mutantes, del T-box e del H0-H1, foram semelhantes a do RXR nativo. Em DR-4 (figura 19A) a taxa de ativação do TR nativo foi de $111.5\% \pm 1.5$ e os RXR

mutantes, del H0-H1 de $98.5\% \pm 6.0$ e o mutante del T-box de $95.5\% \pm 0.2$. Em F2 (figura 19B) a taxa de ativação do TR nativo foi de $116.5\% \pm 5.8$ e os RXR mutantes, del H0-H1 de $81.3\% \pm 5.2$ e o mutante del T-box de $80\% \pm 1.2$. Em TREpal (figura 19C) a taxa de ativação do TR nativo foi de $80\% \pm 14$ e os RXR mutantes, del H0-H1 de $85.5\% \pm 6.7$ e o mutante del T-box de $82\% \pm 12.2$. Este resultado corrobora ao observado no estudo *in vitro*, e sugere que as mutações no RXR não modificaram a atividade transcricional do complexo heterodimérico TR/RXR nos diferentes TRES.

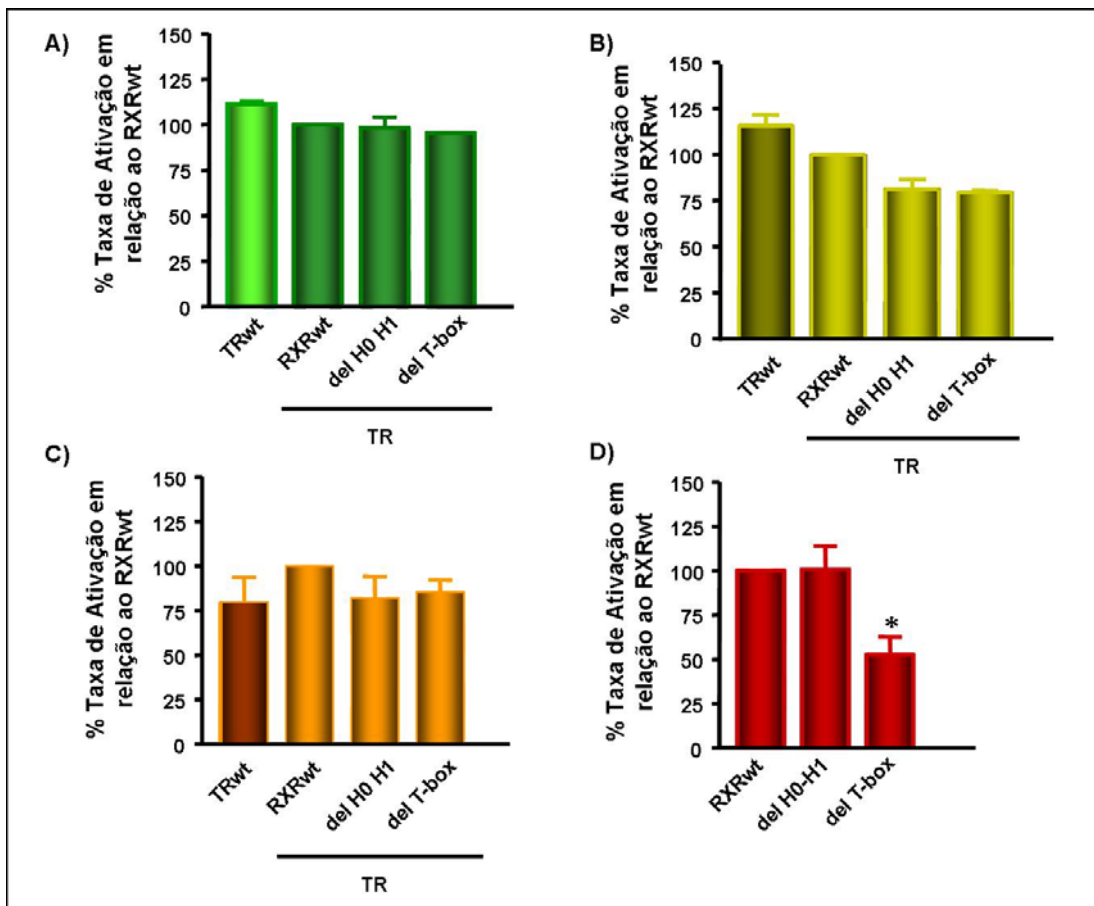


Figura 19: Resposta ao T_3 e ao ácido 9-cis retinóico mediada pela adição de $2,0\mu\text{g}$ do vetor de expressão do hTR β 1wt, hRXR α nativo ou mutantes (del T-box e del H0-H1) nos elementos responsivos DR-4 (A), F2 (B), TREpal (C) e DR-1 (D). As células COS-1 foram co-transfectadas com $4\mu\text{g}$ do vetor para o gene repórter TRE-2TK-LUC (A, B e C) e tratadas com etanol ou 100nM de T_3 ou DR-1-2TK-LUC (D) e tratadas com etanol ou 100nM de 9-cis-RA. A atividade do gene repórter foi medida após 22h com a lise das células e os números representam o percentual da taxa de ativação em relação ao RXRwt. Este gráfico corresponde à média de no mínimo três experimentos realizados com cada um dos elementos responsivos. A análise estatística foi realizada pela análise de variância a 5% (ANOVA) seguida da comparação das médias pelo Teste de Newman-Keuls (* $p < 0.05$ vs TRwt).

Por outro lado, em DR-1 (figura 19D) o mutante del H0-H1 apresentou taxa de ativação semelhante ao RXR nativo, porém o mutante del T-box apresentou uma redução de 60% ($39\% \pm 10$) na ativação da transcrição quando comparado com o RXR nativo e o outro mutante. Este resultado também corrobora ao observado nos estudos *in vitro*, onde a deleção da região T-box diminuiu a ligação do receptor em DR-1.

Os resultados mostraram que as mutações no RXR (aminoácidos 201 a 209 e aminoácidos 225 a 232) não prejudicaram a ligação do complexo heterodimérico TR/RXR aos diferentes elementos responsivos ao TR e a atividade transcricional em resposta ao T₃.

Análise do efeito compensatório das mutações realizadas no TR β 1 e no RXR α humanos

Um ponto questionado foi se no caso da ligação do complexo heterodimérico ao DNA (TR/RXR) o receptor não mutado poderia estar compensando o efeito do receptor mutado. Desta forma, foram realizados ensaios de ligação proteína-DNA com as diversas combinações entre o TR nativo e mutantes (del T-box, del H0-H1 e del H1-H2) com o RXR nativo e mutantes (del T-box e del H0-H1).

Na figura 20, podemos observar o resultado dos experimentos realizados com o elemento responsivo DR-4. A adição de TR nativo isoladamente levou a formação de homodímeros e monômeros e a adição de RXR nativo promoveu a formação de heterodímeros. O TR contendo a deleção da região T-box, diminuiu a formação de heterodímeros, tanto nos complexos formados com o RXR nativo, quanto nos complexos formados com os RXR mutantes (T-box e del H0-H1). As demais combinações de TR e RXR nativos e mutantes formaram heterodímeros de forma semelhante ao TR/RXR nativos. Na combinação de TR nativo com os RXR mutantes, del T-box e del H0-H1, houve também a formação de monômeros de TR (figura 20).

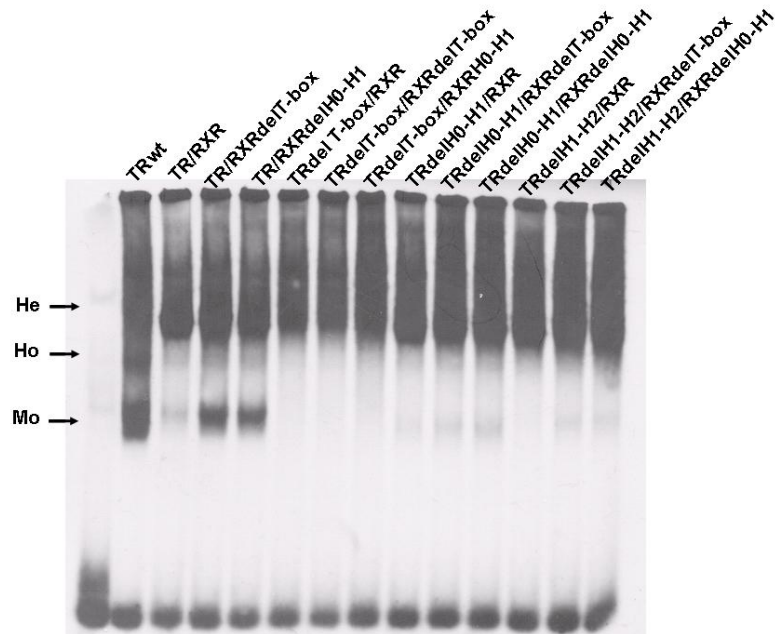


Figura 20: Formação de monômeros (Mo) e homodímeros (Ho) de hTR β 1wt e heterodímeros de hTR β 1wt e hRXR α wt e as diversas combinações dos receptores mutados em DR-4. Os ensaios de ligação proteína-DNA foram realizados empregando-se de 1 a 3 μ l de dos receptores sintetizados *in vitro* e marcados com 35 S-Metionina (TR nativo ou mutantes) na presença do RXR nativo ou mutantes não marcados e 20ng de DR-4 por reação. As reações foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 5% não-desnaturante e o gel foi posteriormente submetido à autorradiografia.

Na figura 21, nos experimentos realizados com o elemento responsivo F2, novamente, a mutação na região T-box do TR diminuiu a formação de heterodímero, e as demais combinações formaram heterodímeros de forma semelhante do TR/RXR nativos.

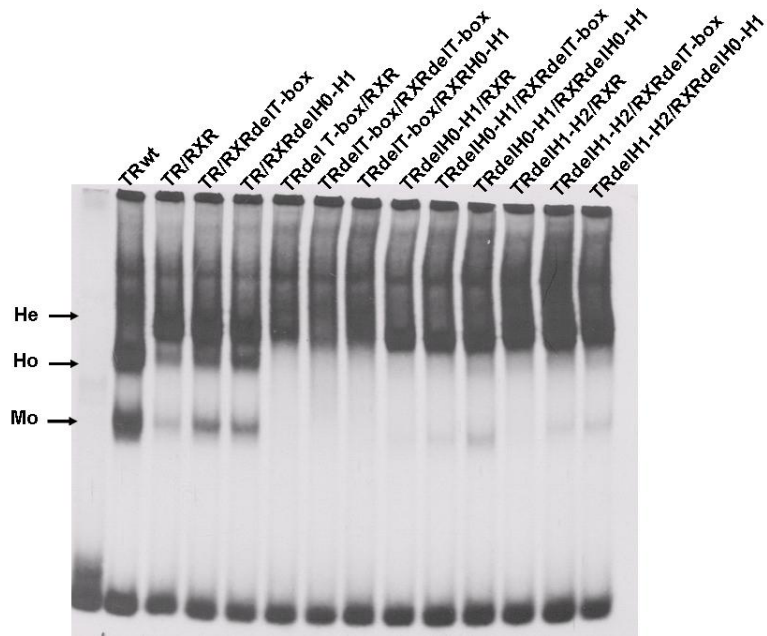


Figura 21: Formação de monômeros (Mo) e homodímeros (Ho) de hTR β 1wt e heterodímeros de hTR β 1wt e hRXR α wt e as diversas combinações dos receptores mutados em F2. Os ensaios de ligação proteína-DNA foram realizados empregando-se de 1 a 3 μ l de dos receptores sintetizados *in vitro* e marcados com 35 S-Metionina (TR nativo ou mutantes) na presença do RXR nativo ou mutantes não marcados e 20ng de F2 por reação. As reações foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 5% não-desnaturante e o gel foi posteriormente submetido à autorradiografia.

Em TREpal, como visto anteriormente, os dois receptores mutados mantiveram a capacidade de formar heterodímeros, exceto o mutante contendo a deleção da região T-box do TR onde houve uma ligeira diminuição na formação desse complexo (figura 22).

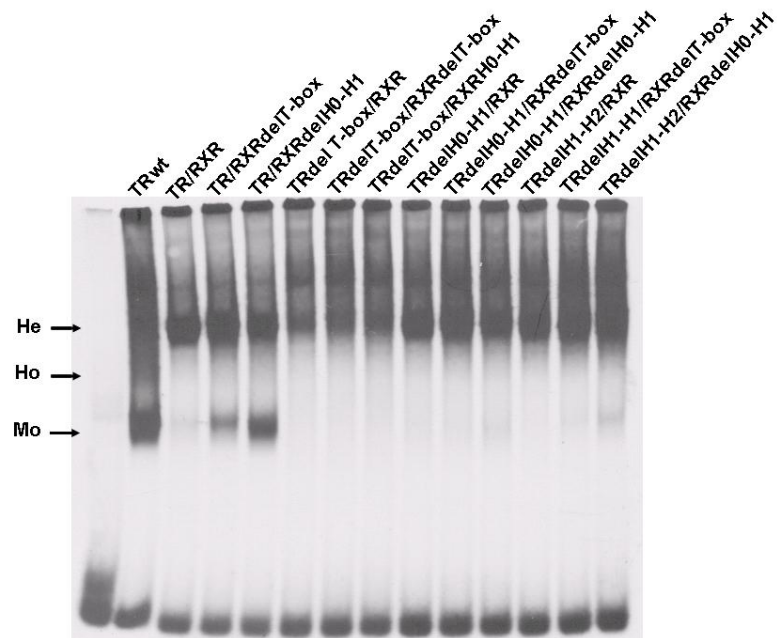


Figura 22: Formação de monômeros (Mo) e homodímeros (Ho) de hTR β 1wt e heterodímeros de hTR β 1wt e hRXR α wt e as diversas combinações dos receptores mutados em TREpal. Os ensaios de ligação proteína-DNA foram realizados empregando-se de 1 a 3 μ l de dos receptores sintetizados *in vitro* e marcados com 35 S-Metionina (TR nativo ou mutantes) na presença do RXR nativo ou mutantes não marcados e 20ng de TREpal por reação. As reações foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 5% não-desnaturante e o gel foi posteriormente submetido à autorradiografia.

Os resultados mostraram que o receptor não mutado não está compensando o efeito da mutação no seu parceiro, pois mesmo usando os dois receptores mutados ainda ocorre a ligação do complexo heterodimérico aos elementos responsivos, com exceção da mutação na região T-box, que como mostrado nos resultados anteriores diminui a ligação do heterodímero ao DNA.

Influência do Receptor do Ácido 9-cis Retinóico no Mecanismo de Ação do Receptor do Hormônio Tireoideano nos diferentes TREs

Esta segunda parte dos resultados diz respeito à modulação do RXR sobre o mecanismo de ação do TR em resposta ao T₃. Recentemente nosso grupo demonstrou utilizando tanto leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*), quanto células de mamíferos (U937 e U2OS), que o TR se liga de forma preferencial aos diferentes elementos responsivos. Um dos principais achados neste trabalho foi que a hiperexpressão de RXR em células

promonocíticas humanas (U937) reduziu a resposta ao T₃ em F2 em cerca de 50%, mas não afetou a resposta mediada por T₃ em DR-4¹⁶⁵.

Considerando que o RXR está influenciando a atividade transcricional do TR em F2, mas não em DR-4, decidimos investigar o mecanismo molecular envolvido nessa modulação. Mais especificamente, o papel da heterodimerização com o RXR, ligado ou não ao DNA, sob a ativação da transcrição mediada por T₃ nos diferentes elementos responsivos. Os mecanismos que podem estar envolvidos são: 1) competição pela ligação de heterodímeros (RXR/TR) ao DNA; 2) seqüestro de co-ativadores; e 3) seqüestro de TR em solução.

Avaliação do efeito de RXR na ação do TR nos diferentes elementos responsivos

Para avaliar o efeito da modulação do RXR sobre a ativação da transcrição pelo TR em resposta ao T₃ nos diferentes TREs, foram realizados ensaios de co-transfecção transitória com plasmídeos de expressão para o TR e RXR nativo (2,0 µg), juntamente com 4,0 µg de um plasmídeo repórter contendo um dos diferentes TREs ligado a seqüências que codificam a enzima luciferase (LUC) em células promonocíticas humanas (U937) cultivadas na ausência ou presença de T₃.

A figura 23 mostra a comparação do efeito da co-transfecção de RXR na atividade do TR em células U937. O aumento dos níveis intracelulares de RXR apresentou pouca influência na atividade transcricional em DR-4 que teve uma ativação de 107.5% ± 19.2, por outro lado, a co-transfecção de RXR diminuiu a ativação da transcrição em aproximadamente 50%, tanto em F2 (46.5% ± 2.4), quanto em TREpal (51.8% ± 4.8).

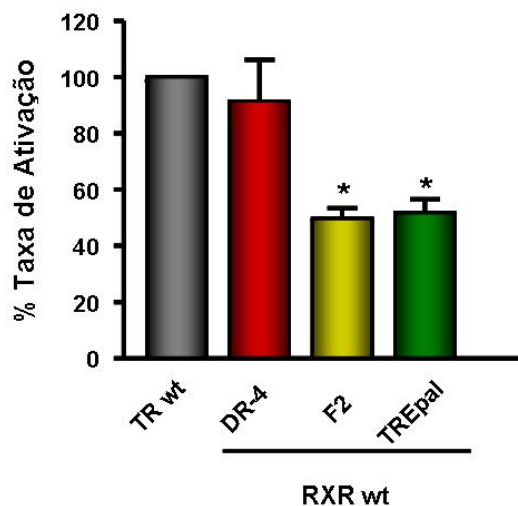


Figura 23: Resposta ao T_3 mediada pela adição de $2,0\mu\text{g}$ do vetor de expressão do hTR β 1wt e hRXR α wt, nos diferentes elementos responsivos (DR-4, F2 e TREpal). As células U937 foram co-transfectadas com $4\mu\text{g}$ do vetor para o gene repórter TRE-2TK-LUC e tratadas com etanol ou 100nM de T_3 . A atividade do gene repórter foi medida após 22h com a lise das células e os números representam o percentual da taxa de ativação em relação ao TR nativo. Este gráfico corresponde à média de no mínimo três experimentos realizados com cada um dos TREs. A análise estatística foi realizada pela análise de variância a 5% (ANOVA) seguida da comparação das médias pelo Teste de Newman-Keuls (* $p < 0.05$ vs TRwt).

Para verificar se essa inibição na atividade transcricional era dependente do aumento dos níveis intracelulares de RXR, foi examinada a resposta ao T_3 no elemento responsivo F2 utilizando quantidades crescentes do vetor de expressão para o RXR α humano ($0,00$; $0,25$; $0,50$; $1,00$; $2,00$ e $4,00\ \mu\text{g}$). A figura 24A mostra que a co-transfecção de RXR conduziu a uma diminuição progressiva na ativação da transcrição neste elemento responsivo.

Adicionalmente, para confirmar que o RXR estava sendo expresso de forma funcional, foram realizados experimentos de co-transfecção utilizando o seu elemento responsivo natural (DR-1) em resposta ao ácido 9-cis retinóico (9-cis-RA) com quantidades crescentes do vetor de expressão para o RXR α humano de $0,00$ a $8,00\ \mu\text{g}$ (figura 24B). Embora o RXR tenha mostrado um aumento significativo na ativação da transcrição em DR-1 somente a partir da co-transfecção de $4,00\ \mu\text{g}$ de RXR, a co-transfecção de $2,00\ \mu\text{g}$ deste receptor inibiu a ativação da transcrição mediada por T_3 de forma significativa em F2 e TREpal (figura 23).

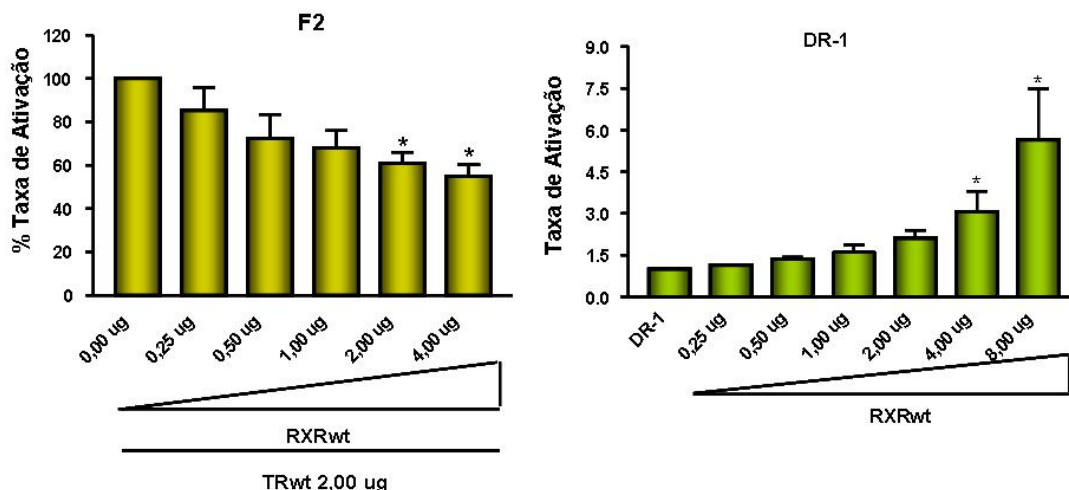


Figura 24: A) Resposta ao T₃ mediada pela adição de 2,0µg do vetor de expressão do hTRβ1wt e quantidades crescentes do vetor de expressão para o hRXRαwt (0,00; 0,25; 0,50; 1,00; 2,00 e 4,00 µg) no elemento responsivo F2; e B) Resposta ao ácido 9-cis retinóico mediada por quantidades crescentes do vetor de expressão para o hRXRα (0,00; 0,25; 0,50; 1,00; 2,00; 4,00 e 8,00 µg) no elemento responsivo DR-1. As células U937 foram co-transfectadas com 4µg do vetor para o gene repórter (F2-2TK-LUC em A e DR-1-2TK-LUC em B) e tratadas com etanol ou 100nM de T₃ (figura A) ou 9-cis-RA (figura B). A atividade do gene repórter foi medida após 22h com a lise das células e os números representam o percentual da taxa de ativação em relação ao TR nativo (figura A) ou os valores absolutos de taxa de ativação (figura B). Este gráfico corresponde à média de no mínimo três experimentos. A análise estatística foi realizada pela análise de variância a 5% (ANOVA) seguida da comparação das médias pelo Teste de Newman-Keuls (* p<0.05 vs TRwt).

Estes resultados mostraram que a inibição da atividade transcricional em F2 é dependente dos níveis intracelulares de RXR, o que nos levou a questionar qual o mecanismo utilizado pelo RXR para modular a ação mediada por TR nos elementos responsivos F2 e TREpal.

Avaliação dos mecanismos moleculares envolvidos na modulação do receptor do hormônio tireiodeano pelo RXR

A primeira possibilidade foi que o RXR estaria atrapalhando a ação do TR em F2 e TREpal pela ligação direta de heterodímeros (RXR/TR) ao DNA. Para responder a essa questão foram realizados ensaios de co-transfecção transitória com plasmídeos de expressão para o TR e RXR nativo (2,0 µg), e também de um vetor de expressão quimérico (GAL/RXR) que contém o domínio de ligação ao DNA (DBD) do fator de transcrição de leveduras GAL-4 fusionado ao domínio de ligação ao ligante (LBD) do RXR, juntamente

com a co-transfecção de 4,0 µg de um plasmídeo repórter contendo um dos diferentes TREs. Este vetor quimérico gera uma proteína capaz de dimerizar com o TR devido a sua superfície de dimerização no LBD, mas que é incapaz de se ligar aos elementos responsivos ao hormônio tireoideano (TREs).

A figura 25A mostra que a co-transfecção do vetor quimérico GAL/RXR inibiu ainda mais a ativação da transcrição no elemento responsivo F2 ($37.2\% \pm 2.7$), inclusive quando comparada com a inibição causada pelo RXR nativo ($63.0\% \pm 5.3$). Esse resultado sugere que a modulação na ativação da transcrição em F2 não é devido à ligação direta de heterodímeros ao DNA, uma vez que o vetor quimérico também diminuiu a ação do TR neste elemento.

Em TREpal, o RXR aparentemente está influenciando a atividade transcricional pela ligação direta de heterodímeros ao DNA, pois o vetor GAL/RXR restaurou a transcrição quando comparado com o RXR nativo ($155.8\% \pm 10.4$ versus $68.0\% \pm 7.7$), e surpreendentemente aumentou de forma significativa em mais de 50% a ativação da transcrição quando comparado com o TR nativo.

Para comprovar que o vetor de expressão quimérico GAL/RXR estava sendo expresso de forma funcional nós co-transfectamos esse vetor com o elemento responsivo do fator 4 de leveduras (GAL-ERE). Como podemos observar na figura 25B a adição de ácido 9-cis retinóico ativou a transcrição em 9.6 ± 3.9 .

Outra possibilidade para explicar o efeito modulatório do RXR na ação do TR seria o seqüestro de co-ativadores em solução, diminuindo a disponibilidade destas proteínas para atuar na ativação da transcrição. Para testar essa possibilidade foram realizados experimentos com a co-transfecção de um vetor de expressão para o co-ativador GRIP-1 (pSG-GRIP-1) na presença do vetor de expressão quimérico GAL/RXR. Esta estratégia aumentaria os níveis intracelulares do co-ativador e poderia restaurar o efeito modulatório negativo do RXR na ativação da transcrição em F2.

A co-transfecção do co-ativador GRIP-1 (COA) não modificou a inibição causada por GAL/RXR em F2 ($41\% \pm 3.2$). Por outro lado em TREpal, a co-transfecção do co-ativador manteve o aumento significativo na ativação da transcrição ($211.4\% \pm 13$) ocasionado pelo vetor quimérico GAL/RXR (figura 25A).

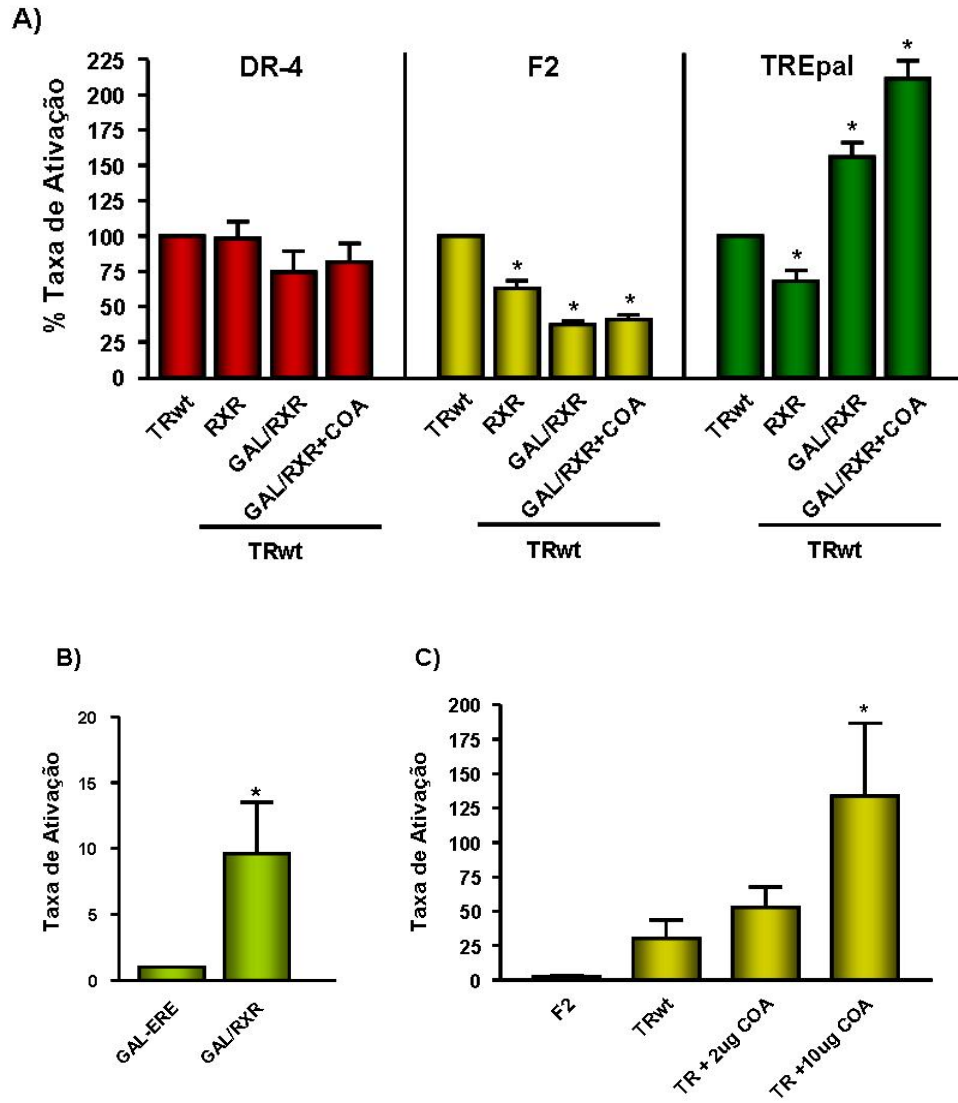


Figura 25: A) Resposta ao T_3 mediada pela adição de vetores de expressão (2,0µg) para o hTRβ1wt, o hRXRαwt, o vetor quimérico contendo o DBD do GAL e o LBD do RXR (GAL/RXR), e o vetor de expressão do co-ativador (pGS-GRIP-1 = COA) em diferentes elementos responsivos (DR-4, F2 e TREpal); B) Resposta ao T_3 mediada pela co-transfecção do vetor quimérico GAL/RXR e 4,00 µg do elemento responsivo para o fator de transcrição de leveduras GAL-4 (GAL-ERE); e C) Resposta ao T_3 mediada pela co-transfecção do vetor expressão para o hTRβ1wt e para o co-ativador (COA) em duas concentrações diferentes 2,00 e 10,00 µg em F2. As células U937 foram co-transfectadas com 4µg do gene repórter TRE-2TK-LUC (figuras A e C) e do gene repórter GAL-ERE-LUC (figura B) e tratadas com etanol ou 100nM de T_3 . A atividade do gene repórter foi medida após 22h com a lise das células e os números representam o percentual da taxa de ativação em relação ao TR nativo (figura A) ou os valores absolutos de taxa de ativação (figuras B e C). Este gráfico corresponde à média de no mínimo três experimentos. A análise estatística foi realizada pela análise de variância a 5% (ANOVA) seguida da comparação das médias pelo Teste de Newman-Keuls (* $p < 0.05$ vs TRwt).

Para confirmar a funcionalidade do co-ativador utilizado, foram realizados experimentos com TR nativo na presença da co-transfecção de 2 e 10 µg do vetor de

expressão para o co-ativador (pSG-GRIP-1). Estes experimentos, figura 25C, mostraram que a co-transfecção de 2 μ g do co-ativador (COA) aumentou a ativação da transcrição de 30.5 ± 13.5 (TRwt) para 52.8 ± 14.8 , e que a co-transfecção de 10 μ g do co-ativador aumentou significativamente a ativação da transcrição de 30.5 ± 13.5 para 133.8 ± 52.9 em F2. Além disso, a co-transfecção de GRIP-1 aumentou ainda mais a atividade transcricional do GAL-RXR no elemento responsivo TREpal, o que também sugere que o co-ativador está sendo expresso de forma funcional (figura 25A).

A próxima possibilidade analisada para explicar o efeito modulatório do RXR em F2 e TREpal foi o seqüestro de TR em solução. Para testar essa possibilidade foi utilizado um RXR mutante (LL419,420RR) que não forma heterodímeros com o TR ⁹⁷. Como mostrado na figura 26 a co-transfecção do RXR mutante restaurou a ativação da transcrição em F2 ($117.3\% \pm 5.9$) e TREpal ($120.0\% \pm 14.2$).

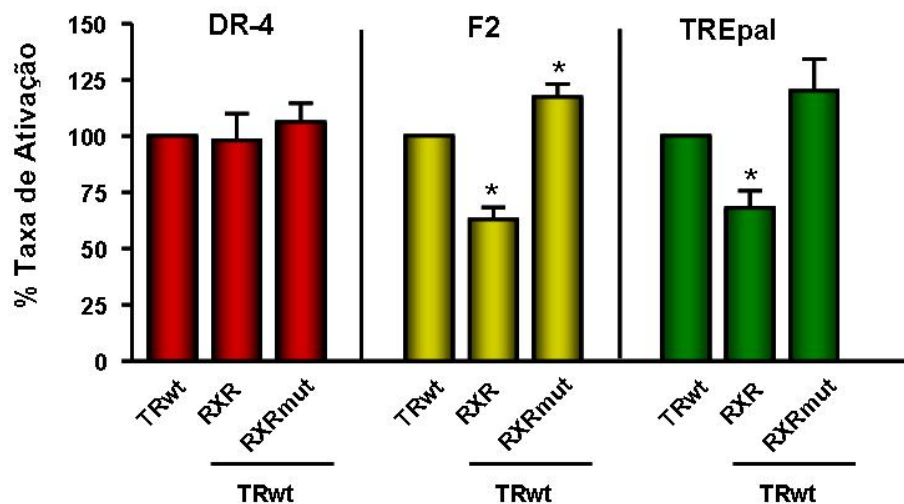


Figura 26: Resposta ao T_3 mediada pela adição de 2,0 μ g do vetor de expressão do hTR β 1wt e hRXR α wt ou do RXR mutante (LL419,420RR), nos diferentes elementos responsivos (DR-4, F2 e TREpal). As células U937 foram co-transfectadas com 4 μ g do vetor para o gene repórter TRE-2TK-LUC e tratadas com etanol ou 100nM de T_3 . A atividade do gene repórter foi medida após 22h com a lise das células e os números representam o percentual da taxa de ativação em relação ao TR nativo. Este gráfico corresponde à média de no mínimo três experimentos realizados com cada um dos TRES. A análise estatística foi realizada pela análise de variância a 5% (ANOVA) seguida da comparação das médias pelo Teste de Newman-Keuls (* $p < 0.05$ vs TRwt).

Juntos, os resultados corroboram nossos achados prévios que o contexto do DNA é importante para o recrutamento de diferentes complexos de TR ¹⁶⁵, pois sugerem que o

RXR seqüestra TR em solução diminuindo sua disponibilidade para se ligar como homodímeros em F2, por outro lado, o RXR apresentou pouco efeito em DR-4, talvez devido ao fato dos níveis intracelulares de RXR estarem em uma concentração suficiente para ativar a transcrição como heterodímeros.

Em TREpal, a co-transfecção de RXR prejudicou a atividade transcricional, tanto pela ligação direta de heterodímeros ao DNA, quanto indireta pelo seqüestro de TR em solução, e conseqüente diminuição deste para se ligar ao DNA. Desta forma, o TR estaria se ligando neste elemento responsivo como monômeros, corroborando a idéia que monômeros têm uma ligação preferencial em TREpal.

DISCUSSÃO

Importância da região de dobradiça na ligação do TR aos diferentes elementos responsivos

O modelo atual de dimerização sugere que resíduos idênticos no LBD do TR estão envolvidos na homodimerização ou heterodimerização com RXR. Além disso, estes dímeros ligam-se aos TREs, DR-4, F2 e TREpal, independente da orientação das bases AGGTCA. Porém, no TREpal a formação de homodímeros parece corresponder simplesmente a ligação de dois monômeros ao DNA ⁹⁷. Desta forma, para que os receptores se liguem especificamente aos TREs em diferentes orientações, especula-se a necessidade que os DBDs girem em até 180 graus em relação aos LBDs. Para isto, a região que conecta o DBD ao LBD deve atuar como uma dobradiça permitindo tal movimento de rotação ^{14; 24; 37; 59; 98; 99}.

Anteriormente, nós utilizamos a informação obtida com a estrutura cristalográfica do LBD do TR β 1 humano ⁷⁸, que sugeria que a região de dobradiça seria constituída alça localizada entre o final do DBD e a primeira hélice do LBD (aminoácidos 209 a 214). Entretanto, mesmo realizando três mutações nesta região (deletando, expandindo e enrijecendo) essas mutações não afetaram de forma significativa a ligação aos diferentes elementos responsivos, DR-4, F2 e TREpal, bem como a ativação da transcrição em resposta ao T₃ ¹³⁴.

Desta forma, com o objetivo de investigar outras regiões que poderiam corresponder à dobradiça foram realizadas mutações em duas diferentes regiões do TR β 1 e do RXR α humanos. Supõe-se que a deleção da região de dobradiça limitaria a ligação do TR apenas ao TRE que mantivesse a ligação específica entre as bases AGGTCA e os aminoácidos do DBD.

Para avaliar a capacidade dos mutantes em se ligar aos diferentes TREs e ativar a transcrição, plasmídeos de expressão dos TRs nativo e mutantes foram utilizados para a síntese *in vitro* de proteínas cuja função foi analisada por ensaios de ligação proteína-DNA e também por ensaios de co-transfecção transitória em células U937 e COS-1 utilizando diferentes elementos responsivos ligados ao gene da repórter luciferase.

A comparação da estrutura do DBD do receptor órfão Rev-erb com o DBD do TR mostrou que a hélice carboxi-terminal do DBD do receptor órfão se situa em uma posição oposta em relação ao TR¹³⁵, sugerindo que a alça de nove aminoácidos que precede esta hélice poderia atuar como uma dobradiça.

Porém, ao realizar mutações nesta região do TRβ1 humano, que corresponde à região conhecida como *T-box* (aminoácidos 175 a 180), nós observamos uma redução significativa na capacidade destes mutantes de se ligarem ao DNA na forma de heterodímeros e uma completa ausência da ligação de homodímeros. Apesar desse resultado, nós acreditamos que essa não seja a região de dobradiça, e sim, uma região importante para a ligação de homodímeros permitindo o posicionamento adequado da A-box e conseqüentemente seu contato com as bases na fenda menor do DNA^{70; 104}. Nos nossos estudos funcionais, a deleção da região T-box afetou a ativação da transcrição principalmente em F2 (diminuição de 70% quando comparado ao TR nativo), provavelmente isso se deve ao fato que a ativação nesse elemento responsivo ocorra principalmente via homodímeros¹⁶⁵.

Recentemente foi demonstrado que mutações nos aminoácidos serina S206 e isoleucina I207 na extensão carboxi-terminal (CTE) do DBD do TRβ1 inibiram especificamente a formação de homodímeros em elementos responsivos dispostos como palíndromos invertidos (F2) tanto *in vitro*, quanto *in vivo*. Entretanto, nem a formação de monômeros, nem de heterodímeros (TR/RXR) foi afetada. Além disso, as interações de TR e TR/RXR em DR-4 e TREpal também não foram afetadas¹⁰⁰. Estes resultados corroboram os encontrados por nós, onde mutações na T-box do TR (del T-box e pro T-box) aboliram a formação de homodímeros e a atividade transcrição principalmente em F2.

É sabido que a ligação ao hormônio ocasiona mudanças estruturais no LBD do TR⁵⁶. Em 2001, Pissios e colaboradores verificaram que a primeira hélice do LBD do TRβ1 interage fracamente com o restante do LBD na ausência do hormônio. Porém, essa interação é fortemente aumentada com a adição de T₃, sugerindo que H1 tem a função de estabilizar a estrutura do LBD. Desta forma, nós questionamos se a alça localizada entre as hélices H1 e H2 do LBD do hTRβ1 (aminoácidos 232 a 238) juntamente com o deslocamento de H1 do corpo do LBD poderia atuar como uma dobradiça¹³⁶. Novamente a deleção dessa região não atrapalhou a ligação do receptor aos TREs e ativação da transcrição nestes elementos.

A principal dificuldade para identificar a região de dobradiça é a ausência de uma estrutura cristalográfica do TR completo (*full lenght*) ou dos dois principais domínios conectados (DBD-LBD). Em nossos estudos nós testamos três diferentes regiões no hTR β 1 e o conjunto de dados obtidos com os experimentos realizados com as mutações nestas regiões sugere que não exista dobradiça neste receptor. A análise das estruturas cristalográficas disponíveis e a comparação da seqüência não indicam outra região com flexibilidade suficiente para atuar como uma dobradiça.

Os primeiros estudos com base na predição da estrutura secundária determinaram que a região de dobradiça do TR β 1 humano consistiria de duas estruturas helicais (D172-200Q e D211-230Q) separadas por uma seqüência de aminoácidos (K201-210T) que permitiria certa flexibilidade a estas estruturas¹³¹. Atualmente sabemos que esta região corresponde aos aminoácidos 205 a 215, que compreende uma das regiões estudada por nós (209 a 214). Entretanto, além da função de dobradiça Lin e colaboradores (1991) sugerem que os aminoácidos 205 a 215 seriam críticos para a ligação ao T₃¹³¹. A deleção desta região no TR α 1 de frangos também conduziu a uma diminuição da atividade total de ligação ao T₃¹⁷¹. Em nosso estudo, apesar de não termos realizado ensaios de ligação ao T₃ acreditamos que nossas mutações não influenciaram na ligação ao hormônio, pois nos estudos funcionais as taxas de ativação da transcrição dos mutantes (aminoácidos 209 a 214) foram semelhantes as do TR nativo.

Nascimento e colaboradores (2006) examinaram a conformação da suposta região de dobradiça do LBD do TR α (aminoácidos 148 a 410) e TR β (aminoácidos 202 a 461) em diferentes estruturas cristalográficas e propuseram uma explicação para as discrepâncias entre a dobradiça destes receptores demonstradas em estudos prévios. Os resultados encontrados sugerem que a suposta região de dobradiça, região conhecida como domínio D, tem potencial para sofrer rearranjos estruturais e adotar diferentes formas, dobrar-se em dois segmentos formando um DBD e LBD estendidos ou não se dobrar e constituir uma dobradiça não estruturada que facilitaria a flexibilidade rotacional entre o DBD e o LBD. As duas evidências suportam a noção que a região de dobradiça é importante para o reconhecimento seletivo do elemento responsivo¹⁰⁰.

Vários estudos têm investigado o local e outras funções da região de dobradiça, além da relacionada à permissão da movimentação do DBD em relação ao LBD.

Em experimentos de transfecção realizados em leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*), mutações na suposta região de dobradiça do TR β 1 de rato (aminoácidos 170-

237) resultaram na perda da ligação ao DNA e também diminuíram modestamente a atividade transcricional¹³³. No entanto, neste estudo a região estudada provavelmente se estende muito além da dobradiça, pois compreende uma porção do DBD o que conseqüentemente atrapalhou a ligação do TR ao DNA. Além disso, vários dos mutantes utilizados por Uppaluri e colaboradores (1995) estão localizados na terceira hélice do DBD do TR, região A-box, que é descrita como importante para a ligação ao elemento responsivo por fazer contatos na fenda menor DNA^{104; 133}. Ademais, o vetor de expressão para o RXR em leveduras não foi co-transfectado, e isto pode ter comprometido as conclusões uma vez que a atividade transcricional observada foi via homodímeros de TR β 1¹³³.

Walfish e colaboradores (1997) também utilizando leveduras verificaram a necessidade da co-transfecção de um co-ativador (GRIP-1), na ativação da transcrição pelo TR e RXR¹⁶⁶. Desta forma, a ausência da ativação da transcrição dos mutantes em leveduras pode também ser justificada pela ausência da co-transfecção do co-ativador.

Em outro estudo, Zhu e colaboradores (1998), sugerem que a região de dobradiça pode estar envolvida no direcionamento do TR para o núcleo, pois o TR além de exibir uma localização nuclear constitutiva, apresenta também uma localização nuclear dependente do hormônio. A análise da seqüência de aminoácidos do hTR β 1 identificou um possível sinal de localização nuclear (NLS) na A-box, a qual foi sugerida fazer parte de uma longa hélice (A-hélice) da região de dobradiça (184-KRLAKRK-190). Para estudar o tráfego de TR nas células, foi utilizado um TR fundido a GFP (*Green Fluorescent Protein*) e TRs contendo mutações na A-box. Os resultados mostraram que o mutante com substituição da lisina K184 e arginina R185 para alanina A184 e alanina A185 foi incapaz de se translocar do citoplasma para o núcleo na presença de T₃. Até o presente, não é possível determinar se a estrutura da A-hélice sofre mudanças conformacionais após a ligação ao hormônio, devido à ausência da determinação da estrutura cristalográfica do TR β 1 contendo todos os domínios funcionais¹⁰³. Além disso, nós acreditamos que essa região, que corresponde a terceira hélice do DBD, não tenha uma função de dobradiça devido o alto grau de homologia do domínio de ligação ao DNA (DBD) dos diversos receptores nucleares e a ausência de flexibilidade desta estrutura.

A região de dobradiça também foi sugerida ser responsável pela ligação do receptor a proteínas co-repressoras. Para identificar as seqüências no TR que eram necessárias para a interação com N-Cor, a região carboxi-terminal do N-Cor foi fusionada a GST

(Glutathione-S-Transferase) e testada para a sua interação com mutantes do TR β 1 humano. Estes experimentos revelaram que a região descrita como dobradiça (aminoácidos 203-230) é crítica para a ligação ao co-repressor, com contribuição adicional da porção amino-terminal do LBD (aminoácidos 230-260)⁵³. Além disso, mutações em três aminoácidos conservados (A228, H229 e T232 – AHT) dentro da *Cor-box* e um aminoácido que precede a hélice 1 do LBD do TR β (P214R) bloquearam a ligação a N-Cor e SMRT^{53; 101; 172; 173; 174}. Entretanto, estes aminoácidos, AHT e P214, encontram-se no interior da estrutura do TR ligado ao hormônio⁷², e mutações ou deleções da hélice 1 podem afetar a ligação do co-repressor por meio de mudanças conformacionais próximas ou distantes desta região⁹⁴. Ou seja, esta região na realidade corresponde mais a hélice 1 do que propriamente a suposta região de dobradiça.

Algumas mutações que ocorrem naturalmente em pacientes com resistência ao hormônio tireoideano (RTH) foram encontradas na região de dobradiça ou próxima a ela (A234T, R243Q e R243W). Estes mutantes se ligaram normalmente ao T₃, mas não se dissociaram de N-Cor prejudicando o recrutamento de SRC-1¹⁰². Isto ocorre principalmente devido ao fato da hélice 1 interagir com o domínio de interação com o receptor (RID) do co-repressor N-Cor⁹⁴.

Outra possibilidade explorada por nós é a de que não haveria região de dobradiça no TR, mas sim no RXR que é um componente crítico para a formação de heterodímeros com vários receptores nucleares gerando uma diversidade de respostas hormonais²⁴. O RXR é um receptor nuclear altamente promíscuo, que se liga a diferentes receptores nucleares como o TR, RAR, PPAR, VDR, PXR, CAR, FXR, LXR e NGFI-B, entre outros⁴⁴. A ligação destes receptores ao DNA ocorre com diferentes polaridades, isto é, com alguns receptores ele se liga no hexanucleotídeo situado na região 5' (*upstream*), o que ocorre na grande maioria das vezes, e com outros no hexanucleotídeo situado na região 3' (*downstream*) em elementos responsivos dispostos como DRs. Em DR-3, DR-4 e DR-5 o RXR ocupa o hexanucleotídeo localizado na posição 5' e o seu parceiro VDR, TR e RAR, respectivamente ocupa o hexanucleotídeo na posição 3'^{66; 98}. Em DR-1, o RXR pode ser ligar na forma de heterodímeros com o PPAR e o RAR, e também na forma de homodímeros (RXR/RXR). Com o RAR e o PPAR, a polaridade é reversa, ou seja, o RXR ocupa o hexanucleotídeo localizado na posição 3' e o RAR ou o PPAR ocupa a posição 5'. Em vários tipos celulares a consequência desta polaridade reversa de RAR/RXR é importante para a repressão da transcrição ativada pelo homodímero de RXR e seu ligante,

o ácido 9-cis-retinóico^{48; 49}. Em relação à ligação ao PPAR, esta orientação é devida à extensão carboxi-terminal (CTE) do DBD do PPAR que impede a sua ligação no hexanucleotídeo localizado na posição 3' em DR-1¹³⁵. Além disso, o PPAR necessita da região 5' flanqueadora para se ligar a DR-1¹³⁸.

Outro fato evidenciado com a ligação de RXR a DRs é que a simples mudança de um nucleotídeo no espaçador conduz a uma rotação de aproximadamente 36⁰ do RXR em torno da dupla hélice. Como consequência deste movimento, o RXR não poderia interagir com uma única interface de dimerização com cada um de seus parceiros²⁴. Entretanto, Ribeiro e colaboradores (2001), utilizando mutações na interface de dimerização do TR e do RXR demonstraram que pelo menos em relação ao heterodímeros RXR/TR há uma única interface de dimerização que envolve aminoácidos localizados nas hélices 10 e 11, como a leucina L422 e a metionina M423, que são conservados nos receptores RXR α , ER α , ER β e PPAR γ ⁹⁷.

Se considerarmos que a heterodimerização ocorre antes da ligação ao DNA, e que há uma única superfície de dimerização no RXR é necessário a realização de um movimento de rotação do DBD em relação ao LBD para que ocorra a ligação do RXR heterodimerizado em ambos os hexanucleotídeos dispostos como DRs, sugerindo a existência de uma região de dobradiça no RXR. Desta forma, a presença da dobradiça no RXR poderia também explicar a ligação do TR aos TREs contendo diferentes orientações sem a necessidade de uma dobradiça no TR.

Zhao e colaboradores (2000) verificaram que o RXR quando comparado ao TR e ao Rev-erb fez apenas três contatos com cada hexanucleotídeo, sugerindo que a fraca ligação de RXR deve ser derivada da substituição de um único aminoácido na hélice de reconhecimento do RXR de arginina R26 no TR/Rev-erb para lisina no RXR. Esta perda de contatos com os hexanucleotídeos indica que o RXR tem uma especificidade mais relaxada que os outros receptores nucleares. Esta idéia é amparada pela observação que elementos responsivos ao RXR que ocorrem naturalmente divergem significativamente da seqüência consenso¹³⁹. Considerando que o RXR é um parceiro importante para a ativação transcricional de vários outros receptores nucleares e que se liga de forma mais flexível ao DNA é possível que a presença de uma região de dobradiça neste receptor favoreça a ligação dos heterodímeros RXR/TR nos vários elementos responsivos.

A comparação do DBD do RXR livre em estudos de espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e do DBD do RXR dimerizado em DR-1

confirmou a idéia que há uma mudança na conformação da proteína após a ligação ao DNA ¹⁴⁰. A hélice *T-box* do RXR sofre uma transição estrutural que aumenta a habilidade do RXR em interagir favoravelmente com o DNA na forma de dímero. O remodelamento da *T-box* para uma conformação estendida reposiciona a glutamato E74 para fora da hélice de ligação ao DNA e permite que a arginina R30 e a lisina K26 interajam com as bases e os grupos fosfatos do DNA ¹³⁹.

Como a *T-box* (aminoácidos 201 a 209) apresenta certa flexibilidade, nós resolvemos testar se ela poderia corresponder à região de dobradiça do RXR. Além dessa região testamos também a alça que conecta o final do DBD ao início do LBD (aminoácidos 225 a 232) que corresponde a uma das regiões no TR estudadas anteriormente por nós.

Apesar de todas as indicações citadas de que o RXR necessitaria de uma maior flexibilidade para a ligação com diferentes receptores em elementos responsivos nas diversas orientações e polaridades, as deleções realizadas nas duas regiões do RXR α humano descritas acima não influenciaram na ligação e ativação da transcrição do complexo heterodimérico (TR/RXR) aos TREs em resposta ao T₃. Por outro lado, a deleção da região T-box do RXR resultou na diminuição da atividade transcricional no seu elemento responsivo natural (DR-1) em resposta ao ácido 9-cis retinóico. Essa região foi anteriormente descrita como sendo importante para a dimerização entre os DBDs do RXR dimerizados em DR-1 ⁷⁰. Além disso, mutações nesta região também podem atrapalhar o posicionamento adequado da A-box, impedindo desta forma, a sua interação com as bases e os grupos fosfatos do DNA ¹⁰⁴.

Nenhuma das regiões estudadas por nós, tanto no TR, quanto no RXR, corresponderam à região de dobradiça. Esses resultados sugerem que o TR e possivelmente o RXR, não apresentam uma região específica com função de dobradiça, e sim deve ocorrer uma adaptação global das proteínas de forma a permitir sua ligação aos elementos responsivos dispostos em diferentes orientações. Essa hipótese é fortalecida com nossos resultados, onde mesmo com a utilização dos dois receptores mutados (RXR e TR) ainda foi possível observar a ligação de heterodímeros *in vitro* ao DNA nos diferentes TREs. Além disso, a análise das estruturas cristalográficas do LBD do TR α e do TR β sugere que a suposta região de dobradiça tem potencial para sofrer rearranjos estruturais e adotar diferentes formas ¹⁰⁰.

Outra possibilidade é que não existe a necessidade de rotação do DBD em relação ao LBD para que ocorra a ligação aos diferentes TREs, pois os contatos proteína-DNA de

cada complexo (homo ou heterodímero) seriam específicos somente para um determinado TRE. Nos outros elementos responsivos, os contatos seriam ótimos em um dos hexanucleotídeos, enquanto no outro, o DBD se adaptaria ligando-se ao DNA de forma inespecífica ou mais fraca. Essa possibilidade é amparada pelo fato que, a ligação de homodímeros de TR é muito mais eficiente em F2, do que DR-4 e menos eficiente ainda em TREpal. Em DR-4, a ligação mais eficiente é na forma de heterodímeros com o RXR, ou seja, haveria uma ligação seletiva em cada um dos TREs^{45; 125; 130; 165}.

Utilizando ensaios de interferência nas guaninas e timinas do DNA, por meio da metilação desses nucleotídeos, Ikeda e colaboradores (1994) analisaram os pontos de contato dos complexos de TR α , como monômeros, homodímeros e heterodímeros (RXR/TR) em dois diferentes TREs, um DR-4 sintético e um palíndromo invertido encontrado no promotor do gene da lisozima de frango (F2). Os resultados sugeriram que os complexos se ligam a diferentes bases da seqüência consenso AGGTCA nos dois TREs. Tanto em DR-4, quanto em F2, monômeros de TR α fazem contatos com o hexanucleotídeo situado na posição 3' (*downstream*) e parte da região espaçadora; homodímeros fazem contatos com os dois hexanucleotídeos de forma equivalente, e heterodímeros também fazem contatos com os dois hexanucleotídeos, mas principalmente com o localizado na posição 3'¹⁷⁵.

Porém, quando comparamos a ligação de homodímeros de TR α e heterodímeros (RXR α / TR α) não é possível afirmar com exatidão se há contatos diferentes entre o mesmo complexo (homo ou hetero) nos dois elementos responsivos, pois não foram realizados os mesmos ensaios de interferência (guaninas e timinas) em DR-4 e F2. Caso os complexos de homodímeros e heterodímeros fizessem diferentes contatos em cada um dos TREs, nós poderíamos sugerir que não haveria necessidade da região de dobradiça. O que possibilitaria a confirmação de que os complexos, homo e heterodiméricos, fazem diferentes contatos em cada elemento responsivo seria a realização de amplos ensaios de interferência onde todas as bases pudessem ser analisadas.

Ikeda e colaboradores (1994) também observaram que os nucleotídeos localizados nas regiões flanqueadoras 5' (*upstream*) e 3' (*downstream*) e na região espaçadora dos sítios de ligação são importantes para a determinação de como irá ocorrer a ligação específica em cada um dos TREs¹⁷⁵. Porém, como as seqüências dos hexanucleotídeos são geralmente degeneradas e também há uma grande variação nas seqüências flanqueadoras e

espaçadoras dos TREs encontrados naturalmente nos promotores dos genes alvos seria muito difícil estabelecer um modelo que abrangesse os diversos elementos responsivos.

Além disso, não podemos também excluir a possibilidade de que a região de dobradiça possa estar localizada em outra região do TR e/ou do RXR. Desta forma, a compreensão definitiva de como os receptores nucleares, mais especificamente, o TR e o RXR, se ligam ao DNA em diferentes orientações só poderá ser confirmada com a obtenção de estruturas cristalográficas dos receptores completos (*full lenght*) ou dos domínios DBD-LBD conectados, na ausência e presença do elemento responsivo.

Influência do RXR no mecanismo de ação do TR nos diferentes elementos responsivos

A ligação do TR aos seus elementos responsivos (TREs) de modo específico é essencial para que o receptor exerça sua função regulatória no promotor dos genes alvos em resposta ao T₃. Os TRs podem se ligar ao DNA como monômeros, homodímeros, heterodímeros, e mais recentemente, foi descrita a sua ligação como trímeros^{36; 152; 176}.

Ensaio de ligação proteína-DNA têm mostrado que os heterodímeros RXR/TR se ligam mais fortemente ao DNA do que os homodímeros^{142; 177}. Esta diferença é especialmente marcante na presença de T₃, o qual desestabiliza o complexo de homodímeros ligados ao DNA^{125; 126; 130}. Desta forma, o modelo preconizado sugere que os heterodímeros RXR/TR são os responsáveis pela regulação da transcrição em resposta ao T₃.

Um achado que reforça este modelo é que a adição de T₃ *in vitro* suprime a formação de homodímeros de TR ligados ao DNA, particularmente em DR-4, sugerindo que a ação do TR ocorre via heterodímeros⁴⁵. Supõe-se que na ausência do hormônio, o TR esteja ligado ao DNA como homodímero associado a um complexo de proteínas co-repressoras que inibem a ativação da transcrição^{53; 123}. Após a ligação ao hormônio ocorre uma mudança na conformação do receptor favorecendo a sua dimerização com o RXR, dissociação das proteínas co-repressoras e associação do complexo às proteínas co-ativadoras que resultam na ativação da transcrição^{24; 56}. Atualmente este modelo do mecanismo molecular da ação do TR tem sido amplamente questionado, especialmente em

relação à função de outras formas oligoméricas do TR como monômeros, homodímeros, trímeros e tetrâmeros, encontrados tanto em solução, quanto ligados ao DNA ^{152; 163; 164; 165}.

Estudos prévios realizados em *Saccharomyces cerevisiae* demonstraram que em DR-4, a ativação da transcrição ocorre principalmente via heterodímeros (RXR/TR) e em F2 sob a forma de homodímeros de TR ¹⁶⁶. Estes dados sugerem que a natureza do elemento responsivo influencia a ligação das diferentes formas oligoméricas de TR.

Outro estudo em leveduras corrobora esta hipótese, demonstrando que o RXR é necessário para a expressão gênica em elementos responsivos compostos de hexanucleotídeos subóticos (NN-AGGTCA), ao passo que somente TRs são suficientes para ativar a expressão gênica máxima em elementos responsivos compostos de hexanucleotídeos ótimos ou octâmeros (TA-AGGTCA) ¹⁷⁸, ou seja, o contexto do DNA ditaria a ligação de cada complexo.

Recentemente, utilizando-se TR mutantes que atrapalham a dimerização do receptor, nós demonstramos que os heterodímeros RXR/TR não são as únicas formas oligoméricas capazes de transduzir os sinais em resposta ao T₃ em células de mamíferos. Os principais achados deste trabalho foram que o TR exibe uma forte necessidade da superfície de dimerização no LBD para se ligar em F2, excluindo a possibilidade de envolvimento de monômeros; que a deleção da região T-box do TR inibiu fortemente a formação de homodímeros, mas não de heterodímeros nos diferentes elementos responsivos, e conseqüentemente inibiu de forma seletiva a ação do TR em resposta ao T₃ em F2; e que a hiperexpressão do RXR inibiu a ação do TR em F2, sugerindo que a formação de heterodímeros inibe ativação da transcrição neste elemento ¹⁶⁵.

Simultaneamente, Diallo e colaboradores (2007) também demonstraram que a regulação da transcrição mediada por T₃ não depende necessariamente da presença do RXR. Empregando a técnica de RNA de interferência (siRNA) que inibiu especificamente a expressão de RXR endógeno em células pré-neurais de camundongos (Neuro2a), foi possível demonstrar que há uma hierarquia na necessidade de RXR entre os genes responsivos ao T₃ neste sistema, sugerindo que o TR pode atuar de diversas formas oligoméricas, como monômeros, homo-oligômeros ou hetero-oligômeros, dependendo do contexto dos genes alvo ¹⁶⁷.

O RXR como descrito anteriormente é considerado um receptor nuclear altamente promíscuo, capaz de formar heterodímeros com o TR, RAR, PPAR, VDR, PXR, LXR, entre outros, indicando sua plasticidade ²⁴. Desta forma, supõe-se que a heterodimerização

com o RXR aumente a atividade transcricional destes receptores, porém, não é sabido se isso ocorre em todos os elementos responsivos ou contextos celulares.

Castillo e colaboradores (2004) mostraram que o contexto celular pode ser crucial na determinação se um dado elemento responsivo pode conferir regulação por um ou ambos ligantes do heterodímero RXR/TR. Na estimulação do gene da prolactina, o RXR não atua como um parceiro silencioso para o TR, neste caso, o complexo RXR/TR atua como um heterodímero permissivo, permitindo a estimulação da transcrição pelos ligantes em ambas as subunidades do complexo. Este efeito foi demonstrado em células de pituitária e células HeLa transfectadas com o promotor heterólogo da prolactina PRL-TRE, mas o mesmo efeito não demonstrado em células CV-1 ¹⁴⁹.

É difícil precisar o papel do RXR no mecanismo de ação do TR em resposta ao T₃ devido ao fato de não haver células de mamíferos sem RXR endógeno. As transfecções realizadas nestas células com RXR geralmente só demonstram um aumento marginal na indução pelo T₃, o qual poderia sugerir que o RXR é relativamente pouco importante ou poderia indicar que é essencial, mas que os níveis endógenos são suficientes ¹⁶⁷.

Conforme mencionado anteriormente, nossos resultados prévios demonstraram que o excesso de RXR diminuiu a atividade transcricional de TRβ em ensaios transfecção e gene repórter realizados com o elemento responsivo F2 (palíndromo invertido), mas não em DR-4 (repetição direta) ¹⁶⁵. Porém, o mecanismo molecular envolvido nessa modulação não foi esclarecido. Por esse motivo, no presente trabalho, resolvemos investigar mais especificamente a importância da heterodimerização com o RXR, ligado ou não ao DNA, sobre a ativação da transcrição mediada por T₃ nos diferentes TREs.

Inicialmente, confirmamos os resultados prévios, ou seja, a co-transfecção de RXR inibiu a resposta mediada por T₃ em F2, mas não em DR-4. Mais ainda, este efeito modulador de RXR no elemento responsivo F2 foi dose-dependente. Além disso, essa inibição também foi demonstrada para o elemento responsivo TREpal (palíndromo). A confirmação de que o receptor RXR estava sendo expresso de forma funcional foi demonstrada com a co-transfecção de RXR que aumentou a resposta ao ácido 9-cis retinóico em DR-1.

Em seguida, considerando que em F2, o TRβ1 age preferencialmente como homodímero e em TREpal, como monômeros ¹⁶⁵, resolvemos examinar se o efeito modulador de RXR poderia ser via competição pela ligação de heterodímeros (RXR/TR) ao DNA ou pelo seqüestro de co-ativadores em solução. Para isso, co-transfectamos um

vetor quimérico, GAL/RXR, que não se liga aos TREs, mas é capaz de dimerizar com o TR, pois possui o DBD do fator de transcrição de leveduras GAL-4 ligado ao LBD do RXR; na ausência ou presença da co-transfecção do co-ativador GRIP-1 (COA). Foi interessante observar que o receptor quimérico continuou a inibir a atividade transcricional do TR β 1 em F2 e co-transfecção do co-ativador não corrigiu essa inibição. Esses resultados sugerem que o RXR não modula a ação do TR em F2 pela ligação direta de heterodímeros ao DNA, ou pelo seqüestro de co-ativadores em solução. Ao contrário, em TREpal, o receptor quimérico GAL/RXR, além de reverter o efeito inibitório de RXR, aumentou de forma significativa a transcrição mediada por T₃. Mais ainda, a co-transfecção do co-ativador potencializou esse efeito. Esses resultados sugerem que a presença de RXR ligado ao DNA em TREpal prejudica a ação de TR que é mediada por monômeros.

Por último, nós examinamos se o RXR estaria seqüestrando TR em solução utilizando um RXR mutante (LL419,420RR) que é incapaz de formar heterodímeros com o TR⁹⁷. Nossos resultados demonstraram que o RXR mutante restaurou a ativação da transcrição em F2 e TREpal, sugerindo que o RXR estava seqüestrando TR em solução, e diminuindo a sua disponibilidade para formar homodímeros em F2, ou diminuindo a disponibilidade de TR e favorecendo a ligação de monômeros de TR em TREpal¹⁶⁵.

Considerando que em TREpal, a co-transfecção de GAL/RXR aumentou significativamente a ativação da transcrição quando comparado com o TR nativo, tanto na ausência, quanto na presença do co-ativador (GRIP-1), e que o RXR mutante (LL419,420RR) reverteu o efeito inibitório de RXR na atividade transcricional, nós sugerimos que o efeito modulatório de RXR em palíndromos de dá tanto pela ligação direta de heterodímeros ao DNA, quanto pelo seqüestro de TR em solução.

Assim, os resultados obtidos neste estudo mostraram que o RXR pode modular a ação do TR e que esse efeito depende do elemento responsivo no qual complexo esteja atuando. O excesso de RXR inibe a atividade transcricional em elementos responsivos dispostos como palíndromos (TREpal) ou como palíndromos invertidos (F2). Além disso, é possível que os homodímeros de TR e os heterodímeros RXR/TR liguem-se a diferentes proteínas co-regulatórias, as quais providenciarium um mecanismo adicional de regulação da responsividade ao T₃ nos genes alvo em uma mesma linhagem celular.

Em resumo, a ligação das diferentes formas oligoméricas em cada um dos elementos responsivos é um mecanismo complexo e ainda não totalmente elucidado.

Atualmente, ainda não se conhecem todos os genes regulados por T_3 , o que dificulta prever qual a natureza do elemento responsivo (repetições diretas, palíndromos, palíndromos invertidos e elementos múltiplos) e qual forma oligomérica pode ser recrutada. A afinidade do receptor pelo DNA, pelo ligante e pelos co-reguladores provavelmente é diferente para cada complexo oligomérico. A compreensão de todos esses fatores pode no futuro contribuir para o desenvolvimento de estratégias farmacológicas que permitam o desenvolvimento de ligantes mais específicos e a ligação seletiva aos elementos responsivos, consequentemente limitando a ação do TR a determinados genes alvo.

CONCLUSÃO

Quanto à influência da região de dobradiça para a ligação do TR aos diferentes elementos responsivos, nós concluímos que as regiões estudadas correspondentes aos aminoácidos 175 a 180 e 233 a 238 do TR β 1 humano, e, 201 a 209 e 225 a 232 do RXR α humano, não são responsáveis pelo movimento de dobradiça do DBD em relação ao LBD permitindo que os complexos TR/TR e TR/RXR se liguem aos TREs dispostos em diferentes orientações.

Desta forma, nós sugerimos que não há uma região de dobradiça como vem sendo descrito na literatura, ou seja, o termo “dobradiça” não seria o mais adequado. Aparentemente não existe uma região específica com esta função, e o que na verdade ocorre é uma adaptação global das proteínas de forma a permitir a sua ligação aos diferentes elementos responsivos, o que também justificaria os complexos de homodímeros (TR/TR) e heterodímeros (TR/RXR) apresentarem uma ligação preferencial aos diferentes TREs.

Quanto à influência do RXR, nós demonstramos que dependendo do contexto do DNA, o RXR exerce um efeito modulatório sobre o mecanismo de ação do TR. Em F2, esse efeito modulatório aparentemente ocorre de forma indireta pelo seqüestro de TR em solução diminuindo a sua disponibilidade para se ligar como homodímeros nesse elemento responsivo. Por outro lado, em TRE_{pal} o efeito modulatório se daria tanto pela ligação direta de heterodímeros ao DNA, quanto indireta pelo seqüestro de TR em solução, ambos devido ao fato deste elemento responsivo ser o sítio preferencial para a ligação de monômeros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Utiger, R. D. (1995). The thyroid: physiology, thyrotoxicosis, hypothyroidism, and the painful thyroid. In *Endocrinology and Metabolism* (Felig, P. F., Baxter, J. D. & Frohman, C. A., eds.), pp. 435-519. MacGraw-Hill, New York.
2. Yen, P. M. (2001). Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Rev* 81, 1097-142.
3. Barra, G. B., Velasco, L. F., Pessanha, R. P., Campos, A. M., Moura, F. N., Dias, S. M., Polikarpov, I., Ribeiro, R. C., Simeoni, L. A. & Neves, F. A. (2004). [Molecular mechanism of thyroid hormone action]. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 48, 25-39.
4. Ribeiro, R. C. J., Apriletti, J. W., West, B. L., Wagner, R. L., Fletterick, R. J., Schaufele, F. & Baxter, J. D. (1995). The molecular biology of thyroid hormone action. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 758, 366-389.
5. Apriletti, J. W., Ribeiro, R. C. J., Wagner, R. L., Feng, W., Webb, P., Kushner, P. J., West, B. L., Nilsson, S., Scanlan, T. S., Fletterick, R. J. & Baxter, J. D. (1998). Molecular and Structural Biology of Thyroid Hormone Receptors. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 25.
6. Zhang, J. & Lazar, M. A. (2000). The mechanism of action of thyroid hormones. *Annu Rev Physiol* 62, 439-66.
7. Gullberg, H., Rudling, M., Forrest, D., Angelin, B. & Vennstrom, B. (2000). Thyroid hormone receptor beta-deficient mice show complete loss of the normal cholesterol 7alpha-hydroxylase (CYP7A) response to thyroid hormone but display enhanced resistance to dietary cholesterol. *Mol Endocrinol* 14, 1739-49.
8. Thompson, C. C. & Potter, G. B. (2000). Thyroid hormone action in neural development. *Cereb Cortex* 10, 939-45.
9. Mansen, A., Yu, F., Forrest, D., Larsson, L. & Vennstrom, B. (2001). TRs have common and isoform-specific functions in regulation of the cardiac myosin heavy chain genes. *Mol Endocrinol* 15, 2106-14.
10. Gloss, B., Trost, S., Bluhm, W., Swanson, E., Clark, R., Winkfein, R., Janzen, K., Giles, W., Chassande, O., Samarut, J. & Dillmann, W. (2001). Cardiac ion channel expression and contractile function in mice with deletion of thyroid hormone receptor alpha or beta. *Endocrinology* 142, 544-50.

11. Gullberg, H., Rudling, M., Salto, C., Forrest, D., Angelin, B. & Vennstrom, B. (2002). Requirement for thyroid hormone receptor beta in T3 regulation of cholesterol metabolism in mice. *Mol Endocrinol* 16, 1767-77.
12. Kohrle, J. (2000). The deiodinase family: selenoenzymes regulating thyroid hormone availability and action. *Cell Mol Life Sci* 57, 1853-63.
13. Larsen, P. R. (1997). Update on the human iodothyronine selenodeiodinases, the enzymes regulating the activation and inactivation of thyroid hormone. *Biochem Soc Trans* 25, 588-92.
14. Aranda, A. & Pascual, A. (2001). Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev* 81, 1269-304.
15. Flamant, F., Baxter, J. D., Forrest, D., Refetoff, S., Samuels, H., Scanlan, T. S., Vennstrom, B. & Samarut, J. (2006). International Union of Pharmacology. LIX. The pharmacology and classification of the nuclear receptor superfamily: thyroid hormone receptors. *Pharmacol Rev* 58, 705-11.
16. Mendel, C. M., Weisiger, R. A., Jones, A. L. & Cavalieri, R. R. (1987). Thyroid hormone-binding proteins in plasma facilitate uniform distribution of thyroxine within tissues: a perfused rat liver study. *Endocrinology* 120, 1742-9.
17. Cavalieri, R. R., Simeoni, L. A., Park, S. W., Baxter, J. D., Scharschmidt, B. F., Ribeiro, R. C. & Lomri, N. (1999). Thyroid hormone export in rat FRTL-5 thyroid cells and mouse NIH-3T3 cells is carrier-mediated, verapamil-sensitive, and stereospecific. *Endocrinology* 140, 4948-54.
18. Neves, F. A., Cavalieri, R. R., Simeoni, L. A., Gardner, D. G., Baxter, J. D., Scharschmidt, B. F., Lomri, N. & Ribeiro, R. C. (2002). Thyroid hormone export varies among primary cells and appears to differ from hormone uptake. *Endocrinology* 143, 476-83.
19. van der Putten, H. H., Friesema, E. C., Abumrad, N. A., Everts, M. E. & Visser, T. J. (2003). Thyroid hormone transport by the rat fatty acid translocase. *Endocrinology* 144, 1315-23.
20. Friesema, E. C., Ganguly, S., Abdalla, A., Manning Fox, J. E., Halestrap, A. P. & Visser, T. J. (2003). Identification of monocarboxylate transporter 8 as a specific thyroid hormone transporter. *J Biol Chem* 278, 40128-35.
21. Mitchell, A. M., Tom, M. & Mortimer, R. H. (2005). Thyroid hormone export from cells: contribution of P-glycoprotein. *J Endocrinol* 185, 93-8.
22. Lazar, M. A. (1993). Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities. *Endocr.Rev.* 14, 184-193.

23. Umesono, K. & Evans, R. M. (1989). Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. *Cell* 57, 1139-1146.
24. Mangelsdorf, D. J. & Evans, R. M. (1995). The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 83, 841-50.
25. Committee, N. (1999). A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily [letter]. *Cell* 97, 161-3.
26. Robinson-Rechavi, M., Carpentier, A. S., Duffraisse, M. & Laudet, V. (2001). How many nuclear hormone receptors are there in the human genome? *Trends Genet* 17, 554-6.
27. Robinson-Rechavi, M., Escriva Garcia, H. & Laudet, V. (2003). The nuclear receptor superfamily. *J Cell Sci* 116, 585-6.
28. Koelle, M. R., Talbot, W. S., Segraves, W. A., Bender, M. T., Cherbas, P. & Hogness, D. S. (1991). The Drosophila EcR gene encodes an ecdysone receptor, a new member of the steroid receptor superfamily. *Cell* 67, 59-77.
29. Mangelsdorf, D. J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schutz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P. & Evans, R. M. (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83, 835-9.
30. Escriva, H., Safi, R., Hanni, C., Langlois, M. C., Saumitou-Laprade, P., Stehelin, D., Capron, A., Pierce, R. & Laudet, V. (1997). Ligand binding was acquired during evolution of nuclear receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 6803-8.
31. Owen, G. I. & Zelent, A. (2000). Origins and evolutionary diversification of the nuclear receptor superfamily. *Cell Mol Life Sci* 57, 809-27.
32. Germain, P., Staels, B., Dacquet, C., Spedding, M. & Laudet, V. (2006). Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacol Rev* 58, 685-704.
33. Evans, R. M. (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240, 889-895.
34. Beato, M. (1991). Transcriptional control by nuclear receptors. *Faseb J* 5, 2044-51.
35. Naar, A. M., Boutin, J. M., Lipkin, S. M., Yu, V. C., Holloway, J. M., Glass, C. K. & Rosenfeld, M. G. (1991). The orientation and spacing of core DNA-binding motifs dictate selective transcriptional responses to three nuclear receptors. *Cell* 65, 1267-1279.

36. Ribeiro, R. C. J., Kushner, P. J. & Baxter, J. D. (1995). The nuclear hormone receptor gene superfamily. *Annu. Rev. Med.* 46, 443-453.
37. Glass, C. K. (1994). Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers. *Endocr Rev* 15, 391-407.
38. Khorasanizadeh, S. & Rastinejad, F. (2001). Nuclear-receptor interactions on DNA-response elements. *Trends Biochem Sci* 26, 384-90.
39. Kliewer, S., Leemann, J. M. & Willson, T. M. (1999). Orphan nuclear receptors: shifting endocrinology into reverse. *Science* 284, 757-760.
40. Benoit, G., Cooney, A., Giguere, V., Ingraham, H., Lazar, M., Muscat, G., Perlmann, T., Renaud, J. P., Schwabe, J., Sladek, F., Tsai, M. J. & Laudet, V. (2006). International Union of Pharmacology. LXVI. Orphan nuclear receptors. *Pharmacol Rev* 58, 798-836.
41. Levin, A. A., Sturzenbecker, L. J., Kazmer, S., Bosakowski, T., Huselton, C., Allenby, G., Speck, J., Kratzeisen, C., Rosenberger, M. & Lovey, A. (1992). 9-cis retinoic acid stereoisomer binds and activates the nuclear receptor RXR alpha. *Nature* 355, 359-361.
42. Giguere, V. (1999). Orphan nuclear receptors: from gene to function. *Endocr Rev* 20, 689-725.
43. Olefsky, J. M. (2001). Nuclear receptor minireview series. *J Biol Chem* 276, 36863-4.
44. Germain, P., Chambon, P., Eichele, G., Evans, R. M., Lazar, M. A., Leid, M., De Lera, A. R., Lotan, R., Mangelsdorf, D. J. & Gronemeyer, H. (2006). International Union of Pharmacology. LXIII. Retinoid X receptors. *Pharmacol Rev* 58, 760-72.
45. Ribeiro, R. C., Kushner, P. J., Apriletti, J. W., West, B. L. & Baxter, J. D. (1992). Thyroid hormone alters in vitro DNA binding of monomers and dimers of thyroid hormone receptors. *Mol. Endocrinol.* 6, 1142-1152.
46. Umesono, K., Murakami, K. K., Thompson, C. C. & Evans, R. M. (1991). Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D3 receptors. *Cell* 65, 1255-1266.
47. Mangelsdorf, D. J. (1994). Vitamin A receptors. *Nutr Rev* 52, S32-44.
48. Mangelsdorf, D. J., Umesono, K., Kliewer, S. A., Borgmeyer, U., Ong, E. S. & Evans, R. M. (1991). A direct repeat in the cellular retinol-binding protein type II gene confers differential regulation by RXR and RAR. *Cell* 66, 555-561.

49. Kurokawa, R., Soderstrom, M., Horlein, A., Halachmi, S., Brown, M., Rosenfeld, M. G. & Glass, C. K. (1995). Polarity-specific activities of retinoic acid receptors determined by a co-repressor [see comments]. *Nature* 377, 451-4.
50. Rastinejad, F. (2001). Retinoid X receptor and its partners in the nuclear receptor family. *Curr Opin Struct Biol* 11, 33-8.
51. Mangelsdorf, D. J., Ong, E. S., Dyck, J. A. & Evans, R. M. (1990). Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway. *Nature* 345, 224-229.
52. Baniahmad, A., Steiner, C., Kohne, A. C. & Renkawitz, R. (1990). Modular structure of a chicken lysozyme silencer: involvement of an unusual thyroid hormone receptor binding site. *Cell* 61, 505-514.
53. Horlein, A. J., Naar, A. M., Heinzl, T., Torchia, J., Gloss, B., Kurokawa, R., Ryan, A., Kamel, Y., Soderstrom, M., Glass, C. K. & Rosenfeld, M. G. (1995). Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* 377, 397-404.
54. Glass, C. K. & Rosenfeld, M. G. (2000). The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev* 14, 121-41.
55. Privalsky, M. L. (2004). The role of corepressors in transcriptional regulation by nuclear hormone receptors. *Annu Rev Physiol* 66, 315-60.
56. Feng, W., Ribeiro, R. C. J., Wagner, R. L., Nguyen, H., Apriletti, J. W., Fletterick, R. J., Baxter, J. D., Kushner, P. J. & West, B. L. (1998). Hormone-Dependent Coactivator Binding to a Hydrophobic Cleft on Nuclear Receptors. *Science* 280, 1747-1749.
57. McKenna, n. J., Lanz, R. B. & O'Malley, B. W. (1999). Nuclear receptor coregulators: Cellular and Molecular Biology. *The Endocrine Society* 20, 321-344.
58. Warnmark, A., Treuter, E., Wright, A. P. & Gustafsson, J. A. (2003). Activation functions 1 and 2 of nuclear receptors: molecular strategies for transcriptional activation. *Mol Endocrinol* 17, 1901-9.
59. Ribeiro, R. C. J., Apriletti, J. W., Wagner, R. L., West, B. L., Feng, W., Huber, R., Kushner, P. J., Nilsson, S., Scanlan, T. S., Fletterick, R. J., Schaufele, F. & Baxter, J. D. (1998). Mechanisms of Thyroid Hormone Action: Insights from X-ray Crystallographic and Functional Studies. *Recent Prog Horm Res* 53, 351-394.
60. Wu, Y., Xu, B. & Koenig, R. J. (2001). Thyroid hormone response element sequence and the recruitment of retinoid X receptors for thyroid hormone responsiveness. *J Biol Chem* 276, 3929-36.

61. Yen, P. M., Sugawara, A., Liu, Y., Whang, J. & Chin, W. W. (1995). Factors that enhance Escherichia coli-expressed TR beta binding to T3 and DNA. *Thyroid* 5, 309-13.
62. Zilliacus, J., Carlstedt-Duke, J., Gustafsson, J. A. & Wright, A. P. (1994). Evolution of distinct DNA-binding specificities within the nuclear receptor family of transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 4175-9.
63. Laudet, V. (1997). Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor. *J Mol Endocrinol* 19, 207-26.
64. Brent, G. A. (1994). The molecular basis of thyroid hormone action. *N Engl J Med* 331, 847-853.
65. Wilson, T. E., Paulsen, R. E., Padgett, K. A. & Milbrandt, J. (1992). Participation of non-zinc finger residues in DNA binding by two nuclear orphan receptors. *Science* 256, 107-10.
66. Perlmann, T., Rangarajan, P. N., Umesono, K. & Evans, R. M. (1993). Determinants for selective RAR and TR recognition of direct repeat HREs. *Genes Dev.* 7, 1411-1422.
67. Zechel, C., Shen, X. Q., Chambon, P. & Gronemeyer, H. (1994). Dimerization interfaces formed between the DNA binding domains determine the cooperative binding of RXR/RAR and RXR/TR heterodimers to DR5 and DR4 elements. *EMBO J* 13, 1414-24.
68. Zechel, C., Shen, X. Q., Chen, J. Y., Chen, Z. P., Chambon, P. & Gronemeyer, H. (1994). The dimerization interfaces formed between the DNA binding domains of RXR, RAR and TR determine the binding specificity and polarity of the full-length receptors to direct repeats. *EMBO J* 13, 1425-33.
69. Jiang, G. & Sladek, F. M. (1997). The DNA binding domain of hepatocyte nuclear factor 4 mediates cooperative, specific binding to DNA and heterodimerization with the retinoid X receptor alpha. *J Biol Chem* 272, 1218-25.
70. Lee, M. S., Kliewer, S. A., Provencal, J., Wright, P. E. & Evans, R. M. (1993). Structure of the retinoid X receptor alpha DNA binding domain: a helix required for homodimeric DNA binding. *Science* 260, 1117-1121.
71. Heery, D. M., Kalkhoven, E., Hoare, S. & Parker, M. G. (1997). A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature* 387, 733-6.

72. Wagner, R. L., Apriletti, J. W., McGrath, M. E., West, B. L., Baxter, J. D. & Fletterick, R. J. (1995). A structural role for hormone in the thyroid hormone receptor. *Nature* 378, 690-697.
73. McKenna, N. J. & O'Malley, B. W. (2002). Minireview: nuclear receptor coactivators--an update. *Endocrinology* 143, 2461-5.
74. Bourguet, W., Germain, P. & Gronemeyer, H. (2000). Nuclear receptor ligand-binding domains: three-dimensional structures, molecular interactions and pharmacological implications. *Trends Pharmacol Sci* 21, 381-8.
75. Nagy, L. & Schwabe, J. W. (2004). Mechanism of the nuclear receptor molecular switch. *Trends Biochem Sci* 29, 317-24.
76. Luisi, B. & Freedman, L. (1995). Nuclear receptors. Dimer, dimer binding tight. *Nature* 375, 359-60.
77. Ribeiro, R. C., Apriletti, J. W., Wagner, R. L., Feng, W., Kushner, P. J., Nilsson, S., Scanlan, T. S., West, B. L., Fletterick, R. J. & Baxter, J. D. (1998). X-ray crystallographic and functional studies of thyroid hormone receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol* 65, 133-41.
78. Wagner, R. L., Huber, B. R., Shiau, A. K., Kelly, A., Cunha Lima, S. T., Scanlan, T. S., Apriletti, J. W., Baxter, J. D., West, B. L. & Fletterick, R. J. (2001). Hormone selectivity in thyroid hormone receptors. *Mol Endocrinol* 15, 398-410.
79. Borngraeber, S., Budny, M. J., Chiellini, G., Cunha-Lima, S. T., Togashi, M., Webb, P., Baxter, J. D., Scanlan, T. S. & Fletterick, R. J. (2003). Ligand selectivity by seeking hydrophobicity in thyroid hormone receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 15358-63.
80. Nunes, F. M., Aparicio, R., Santos, M. A., Portugal, R. V., Dias, S. M., Neves, F. A., Simeoni, L. A., Baxter, J. D., Webb, P. & Polikarpov, I. (2004). Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of isoform alpha1 of the human thyroid hormone receptor ligand-binding domain. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60, 1867-70.
81. Renaud, J. P., Rochel, N., Ruff, M., Vivat, V., Chambon, P., Gronemeyer, H. & Moras, D. (1995). Crystal structure of the RAR-gamma ligand-binding domain bound to all-trans retinoic acid. *Nature* 378, 681-9.
82. Kammerer, S., Germain, P., Flaig, R., Peluso-Iltis, C., Mitschler, A., Rochel, N., Gronemeyer, H. & Moras, D. (2004). RARbeta ligand-binding domain bound to an SRC-1 co-activator peptide: purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60, 2048-50.

83. Germain, P., Kammerer, S., Perez, E., Peluso-Iltis, C., Tortolani, D., Zusi, F. C., Starrett, J., Lapointe, P., Daris, J. P., Marinier, A., de Lera, A. R., Rochel, N. & Gronemeyer, H. (2004). Rational design of RAR-selective ligands revealed by RARbeta crystal structure. *EMBO Rep* 5, 877-82.
84. Bourguet, W., Ruff, M., Chambon, P., Gronemeyer, H. & Moras, D. (1995). Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR-alpha. *Nature* 375, 377-382.
85. Egea, P. F., Mitschler, A., Rochel, N., Ruff, M., Chambon, P. & Moras, D. (2000). Crystal structure of the human RXRalpha ligand-binding domain bound to its natural ligand: 9-cis retinoic acid. *Embo J* 19, 2592-601.
86. Egea, P. F., Mitschler, A. & Moras, D. (2002). Molecular recognition of agonist ligands by RXRs. *Mol Endocrinol* 16, 987-97.
87. Rochel, N., Wurtz, J. M., Mitschler, A., Klaholz, B. & Moras, D. (2000). The crystal structure of the nuclear receptor for vitamin D bound to its natural ligand. *Mol Cell* 5, 173-9.
88. Tocchini-Valentini, G., Rochel, N., Wurtz, J. M. & Moras, D. (2004). Crystal structures of the vitamin D nuclear receptor liganded with the vitamin D side chain analogues calcipotriol and seocalcitol, receptor agonists of clinical importance. Insights into a structural basis for the switching of calcipotriol to a receptor antagonist by further side chain modification. *J Med Chem* 47, 1956-61.
89. Vanhooke, J. L., Benning, M. M., Bauer, C. B., Pike, J. W. & DeLuca, H. F. (2004). Molecular structure of the rat vitamin D receptor ligand binding domain complexed with 2-carbon-substituted vitamin D3 hormone analogues and a LXXLL-containing coactivator peptide. *Biochemistry* 43, 4101-10.
90. Rochel, N., Hourai, S., Perez-Garcia, X., Rumbo, A., Mourino, A. & Moras, D. (2007). Crystal structure of the vitamin D nuclear receptor ligand binding domain in complex with a locked side chain analog of calcitriol. *Arch Biochem Biophys* 460, 172-6.
91. Nolte, R. T., Wisely, G. B., Westin, S., Cobb, J. E., Lambert, M. H., Kurokawa, R., Rosenfeld, M. G., Willson, T. M., Glass, C. K. & Milburn, M. V. (1998). Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator- activated receptor-gamma. *Nature* 395, 137-43.
92. Uppenberg, J., Svensson, C., Jaki, M., Bertilsson, G., Jendeberg, L. & Berkenstam, A. (1998). Crystal structure of the ligand binding domain of the human nuclear receptor PPARgamma. *J Biol Chem* 273, 31108-12.

93. Cronet, P., Petersen, J. F., Folmer, R., Blomberg, N., Sjoblom, K., Karlsson, U., Lindstedt, E. L. & Bamberg, K. (2001). Structure of the PPARalpha and -gamma ligand binding domain in complex with AZ 242; ligand selectivity and agonist activation in the PPAR family. *Structure* 9, 699-706.
94. Marimuthu, A., Feng, W., Tagami, T., Nguyen, H., Jameson, J. L., Fletterick, R. J., Baxter, J. D. & West, B. L. (2002). TR surfaces and conformations required to bind nuclear receptor corepressor. *Mol Endocrinol* 16, 271-86.
95. Bourguet, W., Vivat, V., Wurtz, J. M., Chambon, P., Gronemeyer, H. & Moras, D. (2000). Crystal structure of a heterodimeric complex of RAR and RXR ligand-binding domains. *Molecular Cell* 5, 289-298.
96. Gampe, R. T., Montana, V. G., Lambert, M. H., Miller, A. B., Bledsoe, R. K., Milburn, M. V., Kliewer, S. A., Willson, T. M. & Xu, H. E. (2000). Asymmetry in the PPAR gamma/RXR alpha crystal structure reveals the molecular basis of heterodimerization among nuclear receptors. *Molecular Cell* 5, 545-555.
97. Ribeiro, R. C. J., Feng, W., Wagner, R. L., Cláudia H.R. M. Costa, Alexandre C. Oereira, James W. Apriletti, Fletterick, R. J. & Baxter, J. D. (2001). Definition of the surface in the Thyroid Hormone Receptor ligand binding domain for association as homodimers and heterodimers with retinoid X receptor. *JBC Journal of Biological Chemistry*.
98. Kurokawa, R., Yu, V. C., Naar, A., Kyakumoto, S., Han, Z., Silverman, S., Rosenfeld, M. G. & Glass, C. K. (1993). Differential orientations of the DNA-binding domain and carboxy-terminal dimerization interface regulate binding site selection by nuclear receptor heterodimers. *Genes Dev* 7, 1423-35.
99. Perlmann, T., Umesono, K., Rangarajan, P. N., Forman, B. M. & Evans, R. M. (1996). Two distinct dimerization interfaces differentially modulate target gene specificity of nuclear hormone receptors. *Mol Endocrinol* 10, 958-66.
100. Nascimento, A. S., Dias, S. M., Nunes, F. M., Aparicio, R., Ambrosio, A. L., Bleicher, L., Figueira, A. C., Santos, M. A., de Oliveira Neto, M., Fischer, H., Togashi, M., Craievich, A. F., Garratt, R. C., Baxter, J. D., Webb, P. & Polikarpov, I. (2006). Structural rearrangements in the thyroid hormone receptor hinge domain and their putative role in the receptor function. *J Mol Biol* 360, 586-98.
101. Chen, J. D. & Evans, R. M. (1995). A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* 377, 454-457.
102. Safer, J. D., Cohen, R. N., Hollenberg, A. N. & Wondisford, F. E. (1998). Defective release of corepressor by hinge mutants of the thyroid hormone receptor found in patients with resistance to thyroid hormone. *J Biol Chem* 273, 30175-82.

103. Zhu, X. G., Hanover, J. A., Hager, G. L. & Cheng, S. Y. (1998). Hormone-induced translocation of thyroid hormone receptors in living cells visualized using a receptor green fluorescent protein chimera. *J Biol Chem* 273, 27058-63.
104. Rastinejad, F., Perlmann, T., Evans, R. M. & Sigler, P. B. (1995). Structural determinants of nuclear receptor assembly on DNA direct repeats. *Nature* 375, 203-211.
105. Hollenberg, S. M., Weinberger, C., Ong, E. S., Cerelli, G., Oro, A., Lebo, R., Thompson, E. B., Rosenfeld, M. G. & Evans, R. M. (1985). Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature* 318, 635-41.
106. Green, S., Walter, P., Kumar, V., Krust, A., Bornert, J. M., Argos, P. & Chambon, P. (1986). Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* 320, 134-9.
107. Sap, J., Munoz, A., Damm, K., Goldberg, Y., Ghysdael, J., Leutz, A., Beug, H. & Vennstrom, B. (1986). The c-erb-A protein is a high-affinity receptor for thyroid hormone. *Nature* 324, 635-640.
108. Weinberger, C., Thompson, C. C., Ong, E. S., Lebo, R., Gruol, D. J. & Evans, R. J. (1986). The c-erb-A gene encodes a thyroid hormone receptor. *Nature* 324, 641-646.
109. Flamant, F. & Samarut, J. (2003). Thyroid hormone receptors: lessons from knockout and knock-in mutant mice. *Trends Endocrinol Metab* 14, 85-90.
110. Williams, G. R. (2000). Cloning and characterization of two novel thyroid hormone receptor beta isoforms. *Mol Cell Biol* 20, 8329-42.
111. Harvey, C. B., Bassett, J. H., Maruvada, P., Yen, P. M. & Williams, G. R. (2007). The rat thyroid hormone receptor (TR) Deltabeta3 displays cell-, TR isoform-, and thyroid hormone response element-specific actions. *Endocrinology* 148, 1764-73.
112. Shahrara, S., Drvota, V. & Sylven, C. (1999). Organ specific expression of thyroid hormone receptor mRNA and protein in different human tissues. *Biol Pharm Bull* 22, 1027-33.
113. Hodin, R. A., Lazar, M. A., Wintman, B. I., Darling, D. S., Koenig, R. J., Larsen, P. R., Moore, D. D. & Chin, W. W. (1989). Identification of a thyroid hormone receptor that is pituitary-specific. *Science* 244, 76-79.
114. Bradley, D. J., Towle, H. C. & Young, W. S. (1992). Spatial and temporal expression of alpha- and beta-thyroid hormone receptor mRNAs, including the beta

- 2-subtype, in the developing mammalian nervous system. *J.Neurosci.* 12, 2288-2302.
115. Ordentlich, P., Downes, M., Xie, W., Genin, A., Spinner, N. B. & Evans, R. M. (1999). Unique forms of human and mouse nuclear receptor corepressor SMRT. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 2639-44.
 116. Park, E. J., Schroen, D. J., Yang, M., Li, H., Li, L. & Chen, J. D. (1999). SMRTe, a silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors-extended isoform that is more related to the nuclear receptor corepressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 3519-24.
 117. Nagy, L., Kao, H. Y., Chakravarti, D., Lin, R. J., Hassig, C. A., Ayer, D. E., Schreiber, S. L. & Evans, R. M. (1997). Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A, and histone deacetylase. *Cell* 89, 373-80.
 118. Hartman, H. B., Yu, J., Alenghat, T., Ishizuka, T. & Lazar, M. A. (2005). The histone-binding code of nuclear receptor co-repressors matches the substrate specificity of histone deacetylase 3. *EMBO Rep* 6, 445-51.
 119. Chen, D., Huang, S. M. & Stallcup, M. R. (2000). Synergistic, p160 coactivator-dependent enhancement of estrogen receptor function by CARM1 and p300. *J Biol Chem* 275, 40810-6.
 120. Vo, N. & Goodman, R. H. (2001). CREB-binding protein and p300 in transcriptional regulation. *J Biol Chem* 276, 13505-8.
 121. Lan, K., R., C. G. & Chin, W. W. (2000). thyroid hormone receptor-binding protein, an LXXLL motif-containing protein, functions as a general coactivator. *PNAS* 97, 6212-6217.
 122. Chen, D., Ma, H., Hong, H., Koh, S. S., Huang, S. M., Schurter, B. T., Aswad, D. W. & Stallcup, M. R. (1999). Regulation of transcription by a protein methyltransferase. *Science* 284, 2174-7.
 123. Helmer, E. B., Raaka, B. M. & Samuels, H. H. (1996). Hormone-dependent and -independent transcriptional activation by thyroid hormone receptors are mediated by different mechanisms. *Endocrinology* 137, 390-9.
 124. Andersson, M. L., Nordstrom, K., Demczuk, S., Harbers, M. & Vennstrom, B. (1992). Thyroid hormone alters the DNA binding properties of chicken thyroid hormone receptors alpha and beta. *Nucleic.Acids.Res.* 20, 4803-4810.
 125. Yen, P. M., Darling, D. S., Carter, R. L., Forgione, M., Umeda, P. K. & Chin, W. W. (1992). Triiodothyronine (T3) decreases binding to DNA by T3-receptor

- homodimers but not receptor-auxiliary protein heterodimers. *J.Biol.Chem.* 267, 3565-3568.
126. Yen, P. M., Sugawara, A. & Chin, W. W. (1992). Triiodothyronine (T3) differentially affects T3- receptor/retinoic acid receptor and T3-receptor/retinoid X receptor heterodimer binding to DNA. *J.Biol.Chem.* 267, 23248-23252.
 127. Mitchell, P. J. & Tjian, R. (1989). Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science* 245, 371-8.
 128. Roeder, R. G. (1996). The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends Biochem Sci* 21, 327-35.
 129. Williams, G. R. & G.A., B. (1995). Thyroid Hormone Response Elements. In *Molecular Endocrinology: Basic Concepts and Clinical Correlations* (Weintraub, B. D., ed.), pp. 217-239. Raven Press. Ltd., New York.
 130. Ribeiro, R. C., Apriletti, J. W., Yen, P. M., Chin, W. W. & Baxter, J. D. (1994). Heterodimerization and deoxyribonucleic acid-binding properties of a retinoid X receptor-related factor. *Endocrinology* 135, 2076-85.
 131. Lin, K. H., Parkison, C., McPhie, P. & Cheng, S. Y. (1991). An essential role of domain D in the hormone-binding activity of human beta 1 thyroid hormone nuclear receptor. *Mol.Endocrinol.* 5, 485-492.
 132. Behr, M. & Loos, U. (1992). A point mutation (Ala229 to Thr) in the hinge domain of the c- erbA beta thyroid hormone receptor gene in a family with generalized thyroid hormone resistance. *Mol.Endocrinol.* 6, 1119-1126.
 133. Uppaluri, R. & Towle, H. C. (1995). Genetic dissection of thyroid hormone receptor beta: identification of mutations that separate hormone binding and transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 15, 1499-512.
 134. Pessanha, R. P. (2003). Estudo funcional da região que conecta os domínios de ligação ao DNA e ao ligante do receptor do hormônio tireoideano beta 1. Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília.
 135. Zhao, Q., Khorasanizadeh, S., Miyoshi, Y., Lazar, M. A. & Rastinejad, F. (1998). Structural elements of an orphan nuclear receptor-DNA complex. *Molecular Cell* 1, 849-861.
 136. Pissios, P., Tzamelis, I. & Moore, D. D. (2001). New insights into receptor ligand binding domains from a novel assembly assay. *J Steroid Biochem Mol Biol* 76, 3-7.

137. Pissios, P., Tzamelis, I., Kushner, P. & Moore, D. D. (2000). Dynamic stabilization of nuclear receptor ligand binding domains by hormone or corepressor binding. *Mol Cell* 6, 245-53.
138. IJpenberg, A., Jeannin, E., Wahli, W. & Desvergne, B. (1997). Polarity and specific sequence requirements of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)/retinoid X receptor heterodimer binding to DNA. A functional analysis of the malic enzyme gene PPAR response element. *J Biol Chem* 272, 20108-17.
139. Zhao, Q., Chasse, S. A., Devarakonda, S., Sierk, M. L., Ahvazi, B. & Rastinejad, F. (2000). Structural basis of RXR-DNA interactions. *J Mol Biol* 296, 509-20.
140. Holmbeck, S. M., Foster, M. P., Casimiro, D. R., Sem, D. S., Dyson, H. J. & Wright, P. E. (1998). High-resolution solution structure of the retinoid X receptor DNA-binding domain. *J Mol Biol* 281, 271-84.
141. Kliewer, S. A., Umesono, K., Mangelsdorf, D. J. & Evans, R. M. (1992). Retinoid X receptor interacts with nuclear receptors in retinoic acid, thyroid hormone and vitamin D3 signalling. *Nature* 355, 446-449.
142. Hallenbeck, P. L., Phyllaier, M. & Nikodem, V. M. (1993). Divergent effects of 9-cis-retinoic acid receptor on positive and negative thyroid hormone receptor-dependent gene expression. *J Biol Chem* 268, 3825-3828.
143. Leng, X., Blanco, J., Tsai, S. Y., Ozato, K., O'Malley, B. W. & Tsai, M. J. (1994). Mechanisms for synergistic activation of thyroid hormone receptor and retinoid X receptor on different response elements. *J Biol Chem* 269, 31436-42.
144. Kurokawa, R., DiRenzo, J., Boehm, M., Sugarman, J., Gloss, B., Rosenfeld, M. G., Heyman, R. A. & Glass, C. K. (1994). Regulation of retinoid signalling by receptor polarity and allosteric control of ligand binding. *Nature* 371, 528-31.
145. Forman, B. M., Umesono, K., Chen, J. & Evans, R. M. (1995). Unique response pathways are established by allosteric interactions among nuclear hormone receptors. *Cell* 81, 541-550.
146. Leblanc, B. P. & Stunnenberg, H. G. (1995). 9-cis retinoic acid signaling: changing partners causes some excitement. *Genes Dev* 9, 1811-6.
147. Li, D., Li, T., Wang, F., Tian, H. & Samuels, H. H. (2002). Functional evidence for retinoid X receptor (RXR) as a nonsilent partner in the thyroid hormone receptor/RXR heterodimer. *Mol Cell Biol* 22, 5782-92.
148. Li, D., Yamada, T., Wang, F., Vulin, A. I. & Samuels, H. H. (2004). 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* 279, 7427-37.

149. Castillo, A. I., Sanchez-Martinez, R., Moreno, J. L., Martinez-Iglesias, O. A., Palacios, D. & Aranda, A. (2004). 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* 24, 502-13.
150. Muscat, G. E., Griggs, R., Downes, M. & Emery, J. (1993). Characterization of the thyroid hormone response element in the skeletal alpha-actin gene: negative regulation of T3 receptor binding by the retinoid X receptor. *Cell Growth Differ* 4, 269-79.
151. Muscat, G. E., Mynett-Johnson, L., Dowhan, D., Downes, M. & Griggs, R. (1994). Activation of myoD gene transcription by 3,5,3'-triiodo-L-thyronine: a direct role for the thyroid hormone and retinoid X receptors. *Nucleic Acids Res* 22, 583-91.
152. Mengeling, B. J., Pan, F. & Privalsky, M. L. (2005). Novel mode of deoxyribonucleic acid recognition by thyroid hormone receptors: thyroid hormone receptor beta-isoforms can bind as trimers to natural response elements comprised of reiterated half-sites. *Mol Endocrinol* 19, 35-51.
153. Ye, Z. S., Forman, B. M., Aranda, A., Pascual, A., Park, H. Y., Casanova, J. & Samuels, H. H. (1988). Rat growth hormone gene expression. Both cell-specific and thyroid hormone response elements are required for thyroid hormone regulation. *J Biol Chem* 263, 7821-9.
154. Brent, G. A., Harney, J. W., Chen, Y., Warne, R. L., Moore, D. D. & Larsen, P. R. (1989). Mutations of the rat growth hormone promoter which increase and decrease response to thyroid hormone define a consensus thyroid hormone response element. *Mol Endocrinol* 3, 1996-2004.
155. Brent, G. A., Larsen, P. R., Harney, J. W., Koenig, R. J. & Moore, D. D. (1989). Functional characterization of the rat growth hormone promoter elements required for induction by thyroid hormone with and without a co-transfected beta type thyroid hormone receptor. *J Biol Chem* 264, 178-82.
156. Norman, M. F., Lavin, T. N., Baxter, J. D. & West, B. L. (1989). The rat growth hormone gene contains multiple thyroid response elements. *J Biol Chem* 264, 12063-73.
157. Williams, G. R., Harney, J. W., Forman, B. M., Samuels, H. H. & Brent, G. A. (1991). Oligomeric binding of T3 receptor is required for maximal T3 response. *J Biol Chem* 266, 19636-44.
158. Chen, H. & Privalsky, M. L. (1995). Cooperative formation of high-order oligomers by retinoid X receptors: an unexpected mode of DNA recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 422-6.

159. Lin, B. C., Wong, C. W., Chen, H. W. & Privalsky, M. L. (1997). Plasticity of tetramer formation by retinoid X receptors. An alternative paradigm for DNA recognition. *J Biol Chem* 272, 9860-7.
160. Kersten, S., Kelleher, D., Chambon, P., Gronemeyer, H. & Noy, N. (1995). Retinoid X receptor alpha forms tetramers in solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 8645-9.
161. Chen, Z. P., Iyer, J., Bourguet, W., Held, P., Mioskowski, C., Lebeau, L., Noy, N., Chambon, P. & Gronemeyer, H. (1998). Ligand- and DNA-induced dissociation of RXR tetramers. *J Mol Biol* 275, 55-65.
162. Fischer, H., Dias, S. M., Santos, M. A., Alves, A. C., Zanchin, N., Craievich, A. F., Apriletti, J. W., Baxter, J. D., Webb, P., Neves, F. A., Ribeiro, R. C. & Polikarpov, I. (2003). Low resolution structures of the retinoid X receptor DNA-binding and ligand-binding domains revealed by synchrotron X-ray solution scattering. *J Biol Chem* 278, 16030-8.
163. Figueira, A. C., Dias, S. M., Santos, M. A., Apriletti, J. W., Baxter, J. D., Webb, P., Neves, F. A., Simeoni, L. A., Ribeiro, R. C. & Polikarpov, I. (2006). Human thyroid receptor forms tetramers in solution, which dissociate into dimers upon ligand binding. *Cell Biochem Biophys* 44, 453-62.
164. Figueira, A. C., Neto Mde, O., Bernardes, A., Dias, S. M., Craievich, A. F., Baxter, J. D., Webb, P. & Polikarpov, I. (2007). Low-resolution structures of thyroid hormone receptor dimers and tetramers in solution. *Biochemistry* 46, 1273-83.
165. Velasco, L. F., Togashi, M., Walfish, P. G., Pessanha, R. P., Moura, F. N., Barra, G. B., Nguyen, P., Rebong, R., Yuan, C., Simeoni, L. A., Ribeiro, R. C., Baxter, J. D., Webb, P. & Neves, F. A. (2007). Thyroid hormone response element organization dictates the composition of active receptor. *J Biol Chem* 282, 12458-66.
166. Walfish, P. G., Yoganathan, T., Yang, Y. F., Hong, H., Butt, T. R. & Stallcup, M. R. (1997). Yeast hormone response element assays detect and characterize GRIP1 coactivator-dependent activation of transcription by thyroid and retinoid nuclear receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 3697-702.
167. Diallo, E. M., Wilhelm, K. G., Jr., Thompson, D. L. & Koenig, R. J. (2007). Variable RXR requirements for thyroid hormone responsiveness of endogenous genes. *Mol Cell Endocrinol* 264, 149-56.
168. Chiellini, G., Apriletti, J. W., Yoshihara, H. A., Baxter, J. D., Ribeiro, R. C. & Scanlan, T. S. (1998). A High Affinity Subtype-Selective Agonist Ligand for the Thyroid Hormone Receptor. *Chemistry and Biology* 5, 299-306.

169. Sambrook, J. F., E. F.; Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3, 16.66-16.67.
170. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-5.
171. Horowitz, Z. D., Yang, C. R., Forman, B. M., Casanova, J. & Samuels, H. H. (1989). Characterization of the domain structure of chick c-erbA by deletion mutation: in vitro translation and cell transfection studies. *Mol.Endocrinol.* 3, 148-156.
172. Sande, S. & Privalsky, M. L. (1996). Identification of TRACs (T3 receptor-associating cofactors), a family of cofactors that associate with, and modulate the activity of, nuclear hormone receptors. *Mol Endocrinol* 10, 813-25.
173. Tagami, T., Madison, L. D., Nagaya, T. & Jameson, J. L. (1997). Nuclear receptor corepressors activate rather than suppress basal transcription of genes that are negatively regulated by thyroid hormone. *Mol Cell Biol* 17, 2642-8.
174. Nagaya, T., Fujieda, M. & Seo, H. (1998). Requirement of corepressor binding of thyroid hormone receptor mutants for dominant negative inhibition. *Biochem Biophys Res Commun* 247, 620-3.
175. Ikeda, M., Rhee, M. & Chin, W. W. (1994). Thyroid hormone receptor monomer, homodimer, and heterodimer (with retinoid-X receptor) contact different nucleotide sequences in thyroid hormone response elements. *Endocrinology* 135, 1628-38.
176. Tsai, M. J. & O'Malley, B. W. (1994). Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem* 63, 451-86.
177. Leid, M., Kastner, P., Lyons, R., Nakshatri, H., Saunders, M., Zacharewski, T., Chen, J. Y., Staub, A., Garnier, J. M., Mader, S. & et al. (1992). Purification, cloning, and RXR identity of the HeLa cell factor with which RAR or TR heterodimerizes to bind target sequences efficiently. *Cell* 68, 377-95.
178. Olson, D. P. & Koenig, R. J. (1997). 5'-flanking sequences in thyroid hormone response element half-sites determine the requirement of retinoid X receptor for receptor-mediated gene expression. *J Biol Chem* 272, 9907-14.

ANEXO 1

Thyroid Hormone Response Element Organization Dictates the Composition of Active Receptor*

Received for publication, November 17, 2006, and in revised form, February 15, 2007. Published, JBC Papers in Press, February 20, 2007, DOI 10.1074/jbc.M610700200

Lara F. R. Velasco^{†1}, Marie Togashi^{†§1}, Paul G. Walfish[¶], Rutinéia P. Pessanha[‡], Fanny N. Moura[‡], Gustavo B. Barra[‡],
Phuong Nguyen[§], Rachelle Rebong[§], Chaoshen Yuan, Luiz A. Simeoni[‡], Ralf C. J. Ribeiro^{†‡}, John D. Baxter^{§2},
Paul Webb^{§3}, and Francisco A. R. Neves^{†4}

From the [‡]Molecular Pharmacology Laboratory, Department of Pharmaceutical Sciences, School of Health Sciences, University of Brasilia, Brasilia, DF, Brazil, the [§]Diabetes Center and Department of Medicine, University of California, San Francisco, California 94143, and the [¶]Department of Medicine, Endocrine Division, Mount Sinai Hospital, University of Toronto Medical School, Toronto, Ontario M5G 1X5, Canada

Thyroid hormone (triiodothyronine, T₃) is known to activate transcription by binding heterodimers of thyroid hormone receptors (TRs) and retinoid X receptors (RXRs). RXR-TRs bind to T₃ response elements (TREs) composed of direct repeats of the sequence AGGTCA spaced by four nucleotides (DR-4). In other TREs, however, the half-sites can be arranged as inverted palindromes and palindromes (Pal). Here we show that TR homodimers and monomers activate transcription from representative TREs with alternate half-site placements. TR β activates transcription more efficiently than TR α at an inverted palindrome (F2), and this correlates with preferential TR β homodimer formation at F2 *in vitro*. Furthermore, reconstruction of TR transcription complexes in yeast indicates that TR β homodimers are active at F2, whereas RXR-TRs are active at DR-4 and Pal. Finally, analysis of TR β mutations that block homodimer and/or heterodimer formation reveal TRE-selective requirements for these surfaces in mammalian cells, which suggest that TR β homodimers are active at F2, RXR-TRs at DR-4, and TR monomers at Pal. TR β requires higher levels of hormone for activation at F2 than other TREs, and this differential effect is abolished by a dimer surface mutation suggesting that it is related to composition of the TR-TRE complex. We propose that interactions of particular TR oligomers with different elements play unappreciated roles in TRE-selective actions of liganded TRs *in vivo*.

Thyroid hormone receptors (TR α ⁵ and TR β) modulate gene expression by binding to thyroid hormone response elements (TREs) in target gene promoters (1–5). TR activity is primarily regulated by thyroid hormone (as 3,5,3'-triiodo-L-thyronine (T₃)), which alters the conformation of the receptor C-terminal ligand-binding domain (LBD) to promote dissociation of corepressors and association of coactivators (6). Nevertheless, TR activity is also influenced by the sequence, arrangement, and promoter context of the TRE (2, 3). Liganded TRs activate transcription from some TREs and repress transcription at others (reviewed in Ref. 3 and see Refs. 7 and 8). In addition, TRE sequence and arrangement influence the magnitude of response to unliganded and liganded TRs, T₃ concentration dependence, dominant negative activities of mutants that arise in resistance to thyroid hormone syndrome, and the direction and extent of response to TR β isoform-selective ligands (9–13). Improved understanding of the molecular basis of these effects could help us to harness these selective activities.

TRs bind to DNA either as heterodimers with the closely related retinoid X receptor (RXR) or as homodimers and monomers, and each species exhibits preferences for different TREs (reviewed in Refs. 1 and 2). TREs are composed of degenerate repeats of the sequence AGGTCA, with the half-sites arrayed as direct repeats spaced by four nucleotides (DR-4), inverted repeats spaced by four to six nucleotides (IPs) or palindromes (Pal). Heterodimers of RXRs and TRs bind each of these elements, with a strong preference for DR-4. In contrast, TR β homodimers bind strongly to IP elements, weakly to DR-4, and not all to Pal (9, 14–17), and TR α homodimers bind TREs, at best, only weakly (18, 19). Finally, both TRs can bind to DNA elements as monomers. The fact that different oligomeric forms of TR bind to DNA and exhibit clear preferences for different TREs raises the possibility that the nature of the response element could influence TR action and T₃ response by recruitment of distinct TR transcription complexes with unique activities.

It is clear that RXR-TRs are important mediators of T₃ action. TR binding to RXRs *in vivo* has been verified by obser-

* This work was supported by Brazilian Research Council Grants CNPq/PADCT SBIO 620003/02-2 and CNPq 40.00.43/02-5, National Institutes of Health Grants DK41482, DK51281, and DK61468 (to J. D. B.), Canadian Institutes of Health Operational Grant MOP-49448, The Mount Sinai Hospital Foundation of Toronto and Department of Medicine Research Funds, and The Julius Kuhl and Temmy Latner/Dynacare Family Foundations (to P. G. W.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

[†] Deceased.

¹ Both authors contributed equally to this work.

² Consultant to Karo Bio AB, a biotechnology company with commercial interests in nuclear receptors.

³ To whom correspondence may be addressed. Tel.: 415-476-6789; Fax: 415-564-5813; E-mail: pwebb@diabetes.ucsf.edu.

⁴ To whom correspondence may be addressed: Laboratório de Farmacologia Molecular, Dept. de Ciências Farmacêuticas, Universidade de Brasília, Caixa Postal 4473, 70919-970, Brasília DF, Brazil. Tel.: 55-61-3072098; Fax: 55-61-3474622; E-mail: chico@unb.br.

⁵ The abbreviations used are: TR, thyroid hormone receptor; T₃, triiodothyronine; RXR, retinoid X receptor; TRE, T₃ response element; IP, inverted palindrome; LBD, ligand-binding domain; DBD, DNA-binding domain; CTE, C-terminal extension; Pal, palindrome; NR, nuclear receptor.

ations that TRs consistently copurify as complexes with RXRs from cell and tissue extracts (1, 3). Moreover, analysis of RXR knock-out mice reveals defective T_3 responses (3, 20), and RXRs and TRs synergize at direct repeats in cotransfection experiments in some cell types (21, 22). Furthermore, native TREs are often comprised of DR-4 elements, which bind preferentially to RXR-TRs (1, 3), and *in vitro* DNA binding properties of RXR-TRs are consistent with roles in T_3 response; RXR-TRs form stable complexes with DNA that persist in the presence of hormone (23–25). Finally, chromatin immunoprecipitation analysis confirms that RXR-TRs occupy DR-4 elements in the *Xenopus laevis* TR β and thyroid hormone/bZIP promoters at late stages of embryogenesis (26).

Potential roles of other TR oligomers are not as well understood. An RXR gene knock-out fails to affect TR action in ear development, implying that alternate TR species could regulate this process (27). Moreover, the fact that unliganded TRs repress transcription more efficiently at IP elements than DR-4 elements has been attributed to preferential recruitment of homodimers, which bind corepressors more efficiently than RXR-TRs (9, 10, 28–30). Accordingly, it has been shown that TR can bind to an unusual TRE in the human immunodeficiency virus type 1 in the absence of RXR in the frog oocyte chromatin assembly system (31). Roles of alternate forms of TR in T_3 activation are even less clear. Although the fact that TR homodimers dissociate rapidly from cognate TREs and T_3 suppresses homodimer formation on DNA has been taken as an argument against a role for this species in T_3 activation (1), other studies reveal that TR-TR-DNA complexes are stabilized by coactivators (32) and that T_3 response at IP-6 elements is often independent of coexpressed RXR in transfections (9, 33). Most strikingly, a recent study revealed that RXR expression was only required for optimal T_3 response at subsets of positively regulated genes in a mouse preneuronal cell line (34). Thus, there are several indications that alternate TR oligomers contribute to T_3 induction.

Study of the actions of different TR oligomers in mammalian cells is often complicated by endogenous expression of RXR and NR coregulators. To overcome this difficulty, we (35–38) and others (39) have examined TR action in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. This species is devoid of known NRs and NR coregulators and can be used to reconstruct defined TR transcription complexes in a eukaryotic cell background. These studies indicate that TRs indeed activate transcription at selected TREs in the absence of RXR (35, 39) and that the extent of TR homodimer formation to different DR-4 elements *in vitro* correlates with T_3 response (39).

RXR-TR heterodimer and TR homodimer surfaces have also been defined. There are contacts between respective LBDs and DBDs of RXRs and TRs (1), whereas TR homodimer formation at DR-4 and IP-6 relies exclusively on LBD-LBD contacts (14, 40–42). We used x-ray structure-directed mutagenesis to define these surfaces and showed that RXR-TR β heterodimer and TR β homodimer formation requires a small hydrophobic patch at the junction of helices (H) 10 and H11 in the LBD (17, 43). This surface (LBD dimer surface) resembles those seen in x-ray structures of other NR LBD heterodimers and homodimers (reviewed in Ref. 2). The TR β interface (DBD het-

erodimer surface) that contacts the RXR DBD was detected in an x-ray structure of an RXR-TR β DBD complex on a DR-4 element (44), and mutation of this surface inhibits RXR-TR heterodimer formation at DR-4 *in vitro* (17). The same structure reveals another difference between TRs and RXRs; the TR β DBD contains an α -helical C-terminal extension (CTE) that is absent from RXR and mediates additional DNA contacts (44). The requirements for these surfaces in T_3 response *in vivo* are not known.

In this study, we compare actions of wild type and mutant TRs at different TREs in yeast and in mammalian cells. Although the data confirm that RXR-TRs activate transcription at DR-4, they suggest that TR β homodimers and monomers mediate T_3 response at IP-6 and Pal, respectively. We propose that TRE half-site orientation dictates the composition of the active form of TR *in vivo* and that this effect should be considered in analysis of TR activity and design of selective TR modulators.

MATERIALS AND METHODS

Plasmids—The following plasmids have been described previously: T_3 -inducible β -galactosidase reporters for yeast transcription assays, TRE-F2x1, TRE-DR-4x1, and TRE-Palx1 and yeast (YEp56) expression vectors for wild type TR β , RXR, and GRIP1 (35–38); T_3 -inducible reporters containing two copies of each TRE driving luciferase expression and a similar 9-*cis*-retinoic acid-responsive reporter containing two copies of a DR-1 element and mammalian (pCMX) expression vectors for TR β , TR β L422R, and RXR (17).

New TR mutants reported in these studies (pCMX vectors TR β 4XDBD (D104A, Y117A, R120A, and D177A), TR β 3XLBD (L400R, L422R, and M423R), TR β 4XDBD3XLBD, TR β T-box deletion (deletion of 6 amino acids from 175 to 180 in the T-box region, -ATDLVL) and the yeast Yep56 vector TR β L422R were created in existing vectors using QuikChange site-directed mutagenesis kits (Stratagene). The presence of the mutation(s) was verified by DNA sequencing using Sequenase kits (Stratagene). FLAG and Myc-tagged TR expression vectors were created by PCR amplification of the TR β cDNA and insertion into FLAG and Myc vectors (Clontech) at appropriate restriction sites.

Mammalian Cell Culture, Electroporation, and Luciferase Assays—Human promonocyte U937, HEK, HeLa, and U2-OS cells were maintained at 37 °C, 5% CO₂ subcultured in media RPMI 1640 with 10% newborn bovine serum, 2 mM glutamine, 50 units/ml penicillin, and 50 μ g/ml streptomycin. Transfections were carried out as described previously (45). After incubation for 24 h at 37 °C with ethanol or T_3 , cells were collected by centrifugation, and the pellets were solubilized by addition of 150 μ l of 0.25 M Tris-HCl, pH 7.6, containing 0.1% Triton X-100. Luciferase activity was analyzed by standard methods (luciferase assay system, Promega).

Gel Shifts—For Fig. 1, TRs were labeled with [³⁵S]methionine, and complex formation was measured at unlabeled TREs in a 20- μ l reaction with 1 μ g of poly(dI-dC) (Amersham Biosciences) (17). The binding buffer contained 25 mM HEPES, 50 mM KCl, 1 mM dithiothreitol, 10 μ M ZnSO₄, 0.1% Nonidet P-40, 5% glycerol. After 30 min at room temperature, the mixture was

Thyroid Hormone Receptor Dimerization

loaded onto a 5% nondenaturing polyacrylamide gel that was previously run for 30 min at 200 V. TR and RXR·TR·DNA complexes were visualized as follows: the gel was run at 4 °C for 120–180 min at 200 V in a running buffer containing 45 mM Tris borate, pH 8.0, and 1 mM EDTA, fixed, dried, and exposed to autoradiography. For other figures, binding of TRs and RXR-TRs to DNA was assayed as described previously (43), by mixing 20 fmol of TRs ± RXRs with 300,000 cpm of [γ - 32 P]ATP-radiolabeled TRE oligonucleotide.

Yeast Strains and Transcriptional Analysis—The *S. cerevisiae* strain YPH499 (*MAT α* , *ura3*, *lys2*, *ade2*, *trp1*, *his3*, *leu2*) was used for most transformations. For reporter assays, transformants were grown in minimal medium (0.67% yeast nitrogen base, 2% glucose) supplemented with adenine and lysine (both at 40 mg/liter), as described previously (35–38). The yeast transformants were isolated and grown in the appropriate minimal medium with added supplements as required. Cells were grown overnight with T_3 at a final concentration of 1 μ M, harvested, washed, resuspended in Z buffer, and lysed with glass beads (425–600 μ m) before centrifugation. The supernatant was collected, and the protein concentration was determined by the Lowry method using bovine serum albumin as a standard. Twenty micrograms of protein were used for the β -galactosidase assay, and transcriptional activities were expressed as Miller units/mg of protein, as described previously (35–38). Data shown were pooled from three independent experiments and calculated as the means \pm S.E.

Cell Extracts, Immunoprecipitation, and Western Blotting—HeLa cells were cotransfected with 5 μ g of pCMV-Myc-TR β 1 and 5 μ g of pCMV-Tag2B-FLAG-TR β 1 by electroporation at 240 V and 950 microfarads. 24 h after transfection, cells were washed with phosphate-buffered saline and harvested. Samples of whole cell extracts were lysed in RIPA buffer (50 mM Tris, pH 8.1, 150 mM NaCl, 0.2% SDS, 1% sodium deoxycholate, 1% Nonidet P-40, 5 mM EDTA) containing protease inhibitor mixture (Calbiochem) and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride at 4 °C for 1 h, sonicated, and then centrifuged at 20,000 \times g for 15 min. 100 μ l (400 μ g of total protein) of supernatant was diluted with 500 μ l of phosphate-buffered saline, and 4 μ g of rabbit anti-FLAG antibody (Rockland, Inc.) was added. After incubation overnight at 4 °C, 50 μ l of protein G-Sepharose beads (Amersham Biosciences) were added to each sample, and the lysates were incubated for 1 h at 4 °C. The beads then were washed six times with TBS-T (Tris-buffered saline; 25 mM Tris, pH 8.3, 192 mM glycine, containing 0.05% Tween 20), suspended in 2 \times SDS sample buffer containing 5% β -mercaptoethanol, heated for 10 min at 95 °C, and resolved on 8% denaturing polyacrylamide gels. After transferring to Immun-Blot polyvinylidene difluoride membranes (Bio-Rad), the membranes were blocked with 5% nonfat milk in TBS-T and incubated with primary antibody, mouse Myc-TR β 1 antibody (Clontech), at 1:1000 (w/v) dilution in 1% nonfat milk in TBS-T. After washing with TBS-T, immunoblots were incubated with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse-IgG (Santa Cruz Biotechnology) in 1% TBS-T, and proteins were visualized using enhanced chemiluminescence according to the manufacturer's instructions (Amersham Biosciences).

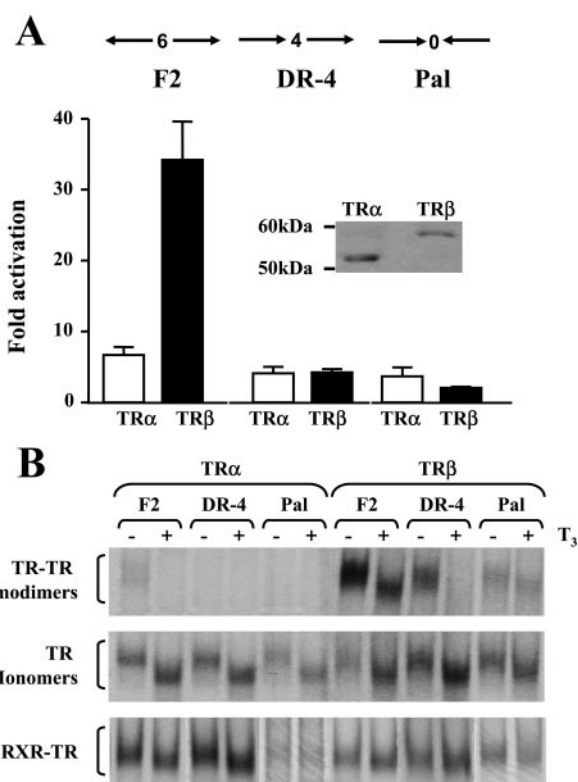


FIGURE 1. TR β activates transcription strongly at F2 and binds as a homodimer. *A*, results of transfection analysis in U2-OS cells, comparing action of both TR isoforms at different TREs. *Inset* shows an image of a nylon membrane blot of an SDS-polyacrylamide gel used to separate transfected cell extracts and probed with an anti-FLAG tag antibody by Western blot. *B*, x-ray autoradiographic image of non-denaturing gels used to separate [35 S]methionine-labeled TRs and RXR-TRs in complex with response element oligonucleotides, F2, DR-4, and Pal. Images of TR-TR homodimers and TR monomers are derived from different positions in the same gel. RXR-TR is from a separate gel shift experiment run in parallel. Results are representative of more than five experiments.

RESULTS

TR β , but Not TR α , Is Superactive at an IP-6 Element (F2)—First, we first compared the actions of two major hormone-binding TR isoforms (TR α 1 and TR β 1) at TRE-dependent reporters in cell culture (Fig. 1A). TR β gave significantly larger T_3 responses at an IP-6 element (F2) than TR α , 30–40-fold versus 6-fold. By contrast, the two TR isoforms gave comparable T_3 responses at a DR-4 element (4–5-fold), and T_3 responses were weaker with TR β at Pal (2–3-fold versus 4–5-fold for TR α). Western blotting of transfected cell extracts with an antibody against an N-terminal FLAG tag in both TRs revealed similar expression levels (Fig. 1A, *inset*). Moreover, varying the amounts of TR expression vector confirmed that differential effects were not related to differences in amounts of TR required for optimal activation at each element (not shown).

Analysis of DNA binding preferences of TRs and RXR-TRs confirms that TR β homodimerizes on DNA *in vitro* and that TR α does not (Fig. 1B). TR β homodimers bind strongly to F2 and, to a lesser extent, to DR-4. As expected, T_3 inhibited TR β homodimer formation at both elements, although significant residual binding of liganded TR β at F2 was detected in the presence of hormone. In the same gels, TR β and TR α bound weakly to all three TREs as monomers. Moreover, in parallel, both TRs

formed heterodimers with RXR at all three TREs, with preferential binding to DR-4 (DR-4 > F2 > Pal). Thus, TR β activates transcription more efficiently at F2 than TR α , and this correlates with enhanced homodimer formation at F2 *in vitro*.

TR β Homodimers Activate Transcription at F2 in Yeast—To determine the extent to which different TR β oligomers activate transcription in eukaryotes, we assembled different TR transcription complexes in yeast stably transfected with TRE-dependent reporters and examined the effects of a mutation in the TR LBD dimer surface (TR β L422R) in each context (17).

TR β homodimers and RXR-TRs were both active in yeast but exhibited distinct TRE preferences (Fig. 2, A–C). In accordance with our previous results, TR β gave weak T₃ response at all three elements, regardless of the presence of coexpressed RXR, and these responses were enhanced by GRIP1 (35). With TR β and GRIP1, large T₃ responses were obtained at F2, and these were inhibited by the TR β L422R mutation (Fig. 2A). By contrast, T₃ responses obtained with TR β and GRIP1 at DR-4 and Pal were smaller and were enhanced by the same mutation (Fig. 2, B and C). Thus, TR-TR homodimers are active at F2, whereas homodimer formation places a constraint on T₃ response at other elements. Although RXR did not enhance T₃ response at F2 (Fig. 2A), it potentiated T₃ response about 7-fold at DR-4 (Fig. 2B) and about 2-fold at Pal (Fig. 2C). This RXR-dependent effect required the TR β LBD dimer surface, as RXR failed to enhance activity of the TR β L422R mutant. Thus, RXR-TRs are active at DR-4, and heterodimer formation provides a moderate advantage for T₃ response at Pal *versus* TR monomers.

It is unlikely that the TR β L422R mutation inhibits T₃ response via indirect effects on hormone binding or cofactor recruitment. TR β L422R does not exhibit reduced affinity for T₃ (17) and bound strongly to GRIP1 and other coactivators *in vitro* (not shown). Thus, our data suggest that TR β homodimers are active at F2 in yeast and that RXR-TR heterodimers are active at DR-4 and, to some extent, at Pal. In addition, the fact that TR β L422R displays moderate activity at all three TREs in the presence of GRIP1 implies that TR monomers have the potential to activate transcription.

TRE-specific Requirements for TR β LBD Dimer Surface in Mammalian Cells—Next, we examined the role of the TR β LBD dimer interface at different TREs in mammalian cells. For these experiments, we compared the effects of transfected TR β and TR β L422R at different TREs in U937 monocytes, which do not express significant levels of TRs (45). We examined T₃ response with a range of quantities of transfected TR β and TR β L422R expression vectors to ensure detection of optimal TR activity.

Wild type TRs exhibited a similar activation profile at each TRE (Fig. 3, A–C). Peak induction of 30-fold at F2, 15-fold at DR-4, and 7-fold at Pal was obtained with 0.5–1.0 μ g of transfected TRs. Moreover, higher levels of TRs led to auto-inhibition (squenching), although the extent of this effect varied. Unliganded TRs do not repress transcription at these minimal promoters to a measurable degree in these conditions (not shown).

In contrast, the effects of the TR β L422R mutation were different at each TRE. TR β L422R exhibited markedly reduced activity relative to wild type TR β at F2, at all levels of transfected vector (Fig. 3A). The mutant also exhibited reduced activity at

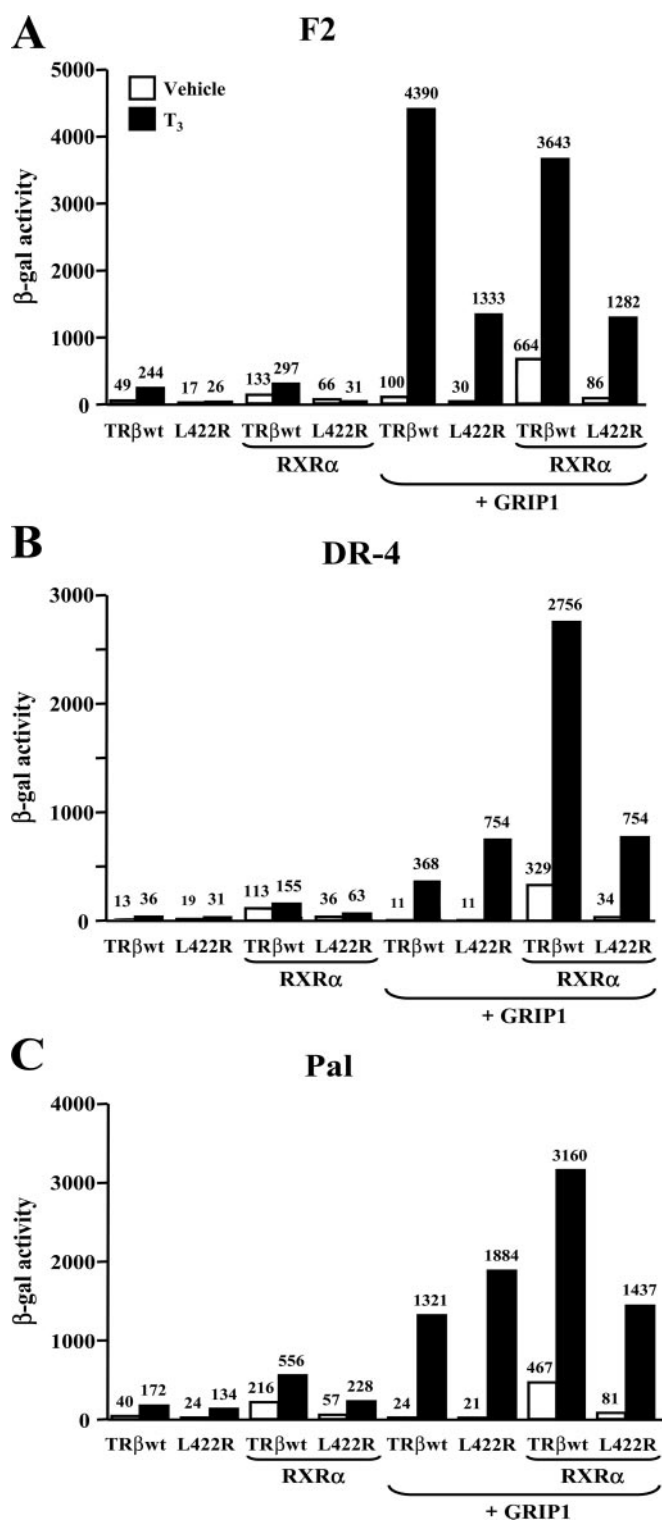


FIGURE 2. TR homodimers activate transcription at F2 in yeast. A shows β -galactosidase activities detected in extracts of yeast transformants stably transfected with an F2-regulated reporter and, as indicated, TR β , TR β L422R, RXR α , and GRIP1 and treated with vehicle or 1 mM T₃ (black bars). β -Galactosidase activity is expressed as Miller units/mg protein. The data show a single determination that is representative of the average of at least three experiments. B and C, as in A, using a DR-4-regulated reporter (B) and Pal-regulated reporter (C).

DR-4, but this defect was overcome with higher amounts of transfected TR β L422R vector (Fig. 3B). Finally, TR β L422R activated transcription as efficiently as wild type TR at Pal, and

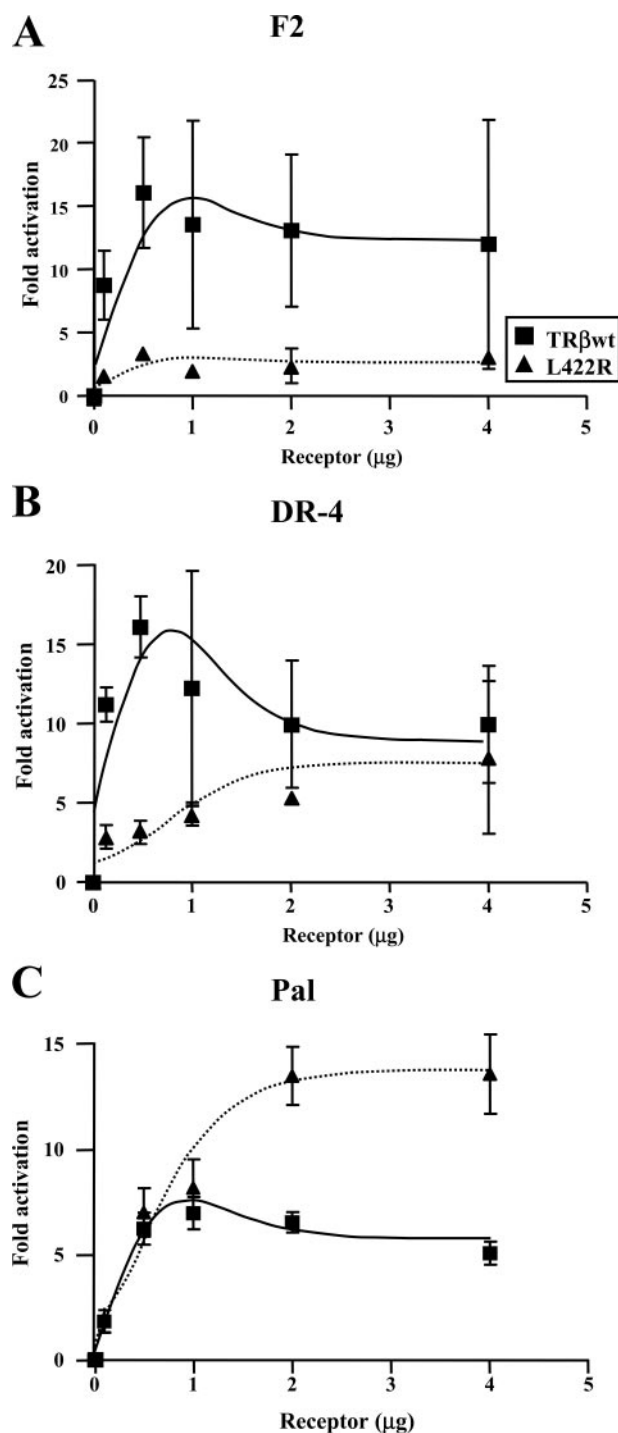


FIGURE 3. Requirements for the TR LBD dimer surface in mammalian cells. A, F2. U937 cells were cotransfected with 4 μg of F2 luciferase and increasing concentrations (0.1, 0.5, 1.0, 2.0, and 4.0 μg) of TR β or TR β L422R expression vectors and treated with vehicle or 100 nM T_3 . Data represent fold T_3 inductions obtained at each amount of TR expression vector and represent the average of six experiments. B, as above, with DR-4-luciferase. Data were from six experiments. C, as above, with Pal-luciferase. Data were from four experiments.

possibly even more efficiently at higher levels of transfected vector (Fig. 3C). Similar results were also obtained with TR β in several other cell types, including HeLa, HEK, and U2-OS (not shown).

To our knowledge, the data in Fig. 3 represent the first demonstration that the TR β LBD dimer surface is needed for opti-

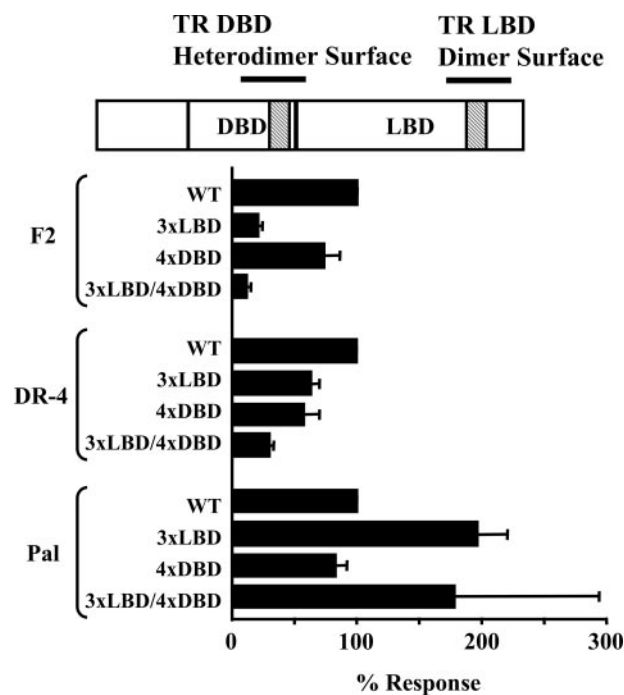


FIGURE 4. DBD heterodimer surface is required for TR action at DR-4. Relative positions of TR DBD heterodimer and LBD dimer surfaces are shown in schematic at top. Panels represent luciferase activities assayed in U937 cells transfected with respective TRE-regulated reporters (4 μg) and TR β or TR β mutant expression vectors (2 μg) and treated $\pm 10^{-6}$ M T_3 , as in Fig. 4. The data show the average of five experiments. WT, wild type.

mal T_3 response in mammalian cells. Nevertheless, the fact that there are TRE-selective requirements for this surface implies that homodimer or heterodimer formation is required for optimal response at F2 and DR-4 but not at Pal.

TRE-specific Requirements for TR β DBD Heterodimer Surface—Next, we assessed requirements for the TR DBD surface that contacts the RXR DBD. To do this, we performed transfections, as above, with vectors for TRs bearing mutations at key residues in the DBD heterodimer surface (4XDBD) (44), alone or in combination with a triple Arg substitution affecting hydrophobic residues in the LBD dimer surface (3XLBD) (17). We used relatively high levels of transfected TRs (2 μg) to highlight different requirements for the LBD dimer surface at different TREs; in these conditions, TR β L422R exhibits reduced activity at F2, significant residual activity at DR-4, and elevated activity at Pal (see Fig. 3).

Contributions of the DBD heterodimer surface and LBD dimer surface vary at each TRE. TR action at F2 was absolutely dependent upon the LBD dimer surface (TR β 3XLBD), and mutation of the DBD heterodimer interface had little effect (Fig. 4A). By contrast, optimal TR action at DR-4 requires both interfaces (Fig. 4B), mutation of the DBD heterodimer surface (TR β 4XDBD) or LBD dimer surface (TR β 3XLBD) inhibited TR activity by 35%, and mutation of both interfaces (TR β 4XDBD and 3XLBD) inhibited TR activity by 70%. Finally, neither interface was required for T_3 response at Pal (Fig. 4C).

Several conclusions can be derived from these studies. First, the TR LBD dimer surface is required for T_3 response at F2, but the DBD heterodimer surface is not. Thus, TR homodimers are active or RXR-TRs activate transcription in a configuration that

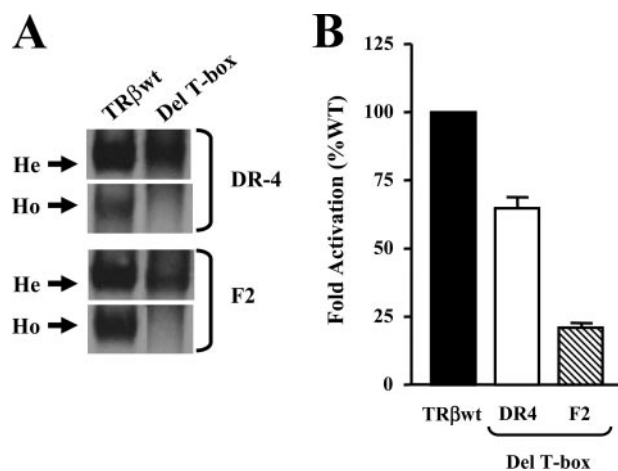


FIGURE 5. Deletion of the TRβ T-box blocks homodimer formation on DNA and inhibits TR action at F2. *A* shows a gel shift assay comparing binding of TRβ and TRβ T-box deletion mutant to DR-4 and F2, as homodimers (Ho) and heterodimers (He) with RXR. *B*, results of transfection analysis comparing TRβ and TRβ T-box deletion mutant activity at DR-4 and F2 elements in U937 monocytes, average of six experiments.

does not rely upon DBD-DBD contacts. Second, TR action at DR-4 requires both surfaces, consistent with the notion that RXR-TRs are active, with their respective DBDs engaged in interactions similar to those in the RXR-TR DBD x-ray structure (44). Finally, the fact that T₃ response at Pal is independent of both interfaces suggests that homo- and heterodimer formation is not needed for T₃ response at this element and that monomers are active.

Evidence for TRβ Homodimer Activity and Formation in Mammalian Cells—The TRβ DBD CTE, which makes auxiliary contacts with DNA (44), was required for homodimer formation and T₃ response at F2. Deletion of part of the TRβ DBD CTE (the T-box) abolished TR homodimer formation at F2 and DR-4, but only weakly inhibited RXR-TR heterodimer formation (Fig. 5A). In transfections, the T-box deletion inhibited T₃ response at F2, where homodimer formation is preferred, but exhibited a lesser effect at DR-4, where RXR-TR formation is preferred (Fig. 5B).

Transfected RXR was not compatible with T₃ response at F2 (Fig. 6). RXR did not affect T₃ response at DR-4, but inhibited T₃ response at F2 by about 50%. Similar results were also obtained in other cell types (not shown). RXR did enhance the activity of a reporter that contained an RXR response element (DR-1) in the presence of RXR ligand (9-*cis*-retinoic acid), confirming that it is expressed in functional form. The fact that RXR overexpression reduces T₃ response at F2 represents further suggestive evidence that RXR-TRs are not active at this element and that TR-TR homodimers are active.

We also confirmed that TR can self-associate in transfected cells. We introduced expression vectors for TRs with in-frame N-terminal FLAG and Myc peptide tags into U2-OS cells. Fig. 7 shows that the TRβ Myc epitope is detectable after precipitation of transfected cell extracts with an anti-FLAG antibody. This finding indicates that TR-TR interactions can occur in living cells.

Mutation of the LBD Dimer Surface Affects T₃ Sensitivity—Finally, we examined the relationships between requirements for the LBD dimerization surface at different TREs and response

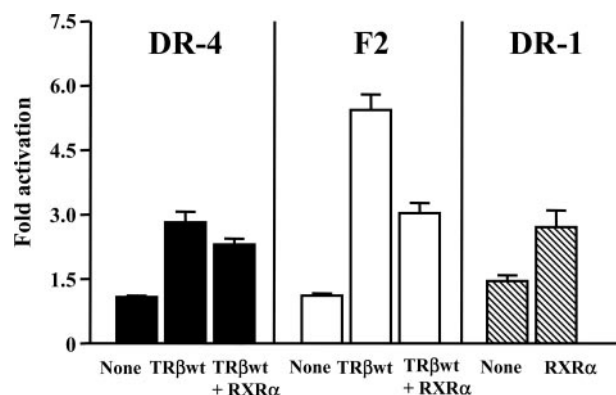


FIGURE 6. RXR inhibits T₃ response at F2. Fold T₃ activation obtained at different TREs in the presence of transfected TRβ ± RXR in U937 monocytes. In parallel, RXR action at a cognate DR-1-driven reporter is shown.

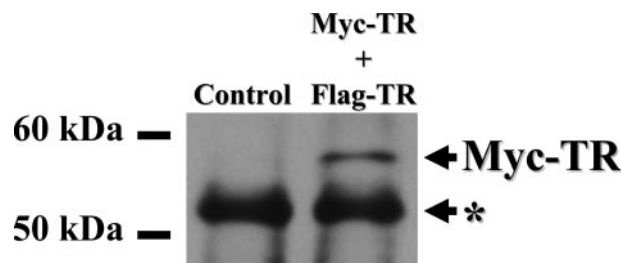


FIGURE 7. TR self-associates in transfected cells. Blot of an SDS-polyacrylamide gel used to separate extracts of cells transfected with FLAG ± Myc-tagged TRs and probed with an anti-Myc antibody after immunoprecipitation with anti-FLAG antibody is shown. The 52-kDa species marked with an asterisk is present in nontransfected cell extracts and does not correspond to TR.

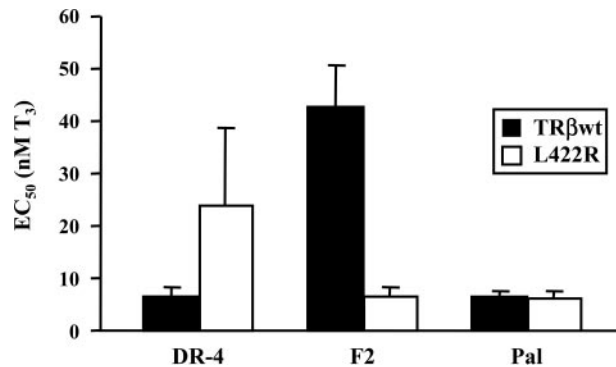


FIGURE 8. Differential T₃ concentration sensitivity at different reporters is reversed by a dimer surface mutation. Average dose of T₃ that is required for half-maximal activation (EC₅₀) at DR-4, F2, and Pal in U937 cell transfections performed with 2 μg of TRβ or TRβL422R expression vector.

element-selective effects on T₃ dose response. Analysis of the amounts of T₃ required for the half-maximal response at each TRE confirms that TRβ action at F2 exhibits a higher EC₅₀ than at DR-4 (9) and extends these studies to show that similar amounts of T₃ are required for half-maximal response at DR-4 and Pal (Fig. 8). The same data show that mutation of the TRβ LBD dimer surface enhanced T₃ sensitivity at F2 and reduced T₃ sensitivity at DR-4. Thus, interactions at the LBD dimer surface influence T₃ dose response even though this mutation does not affect the affinity of TR for T₃ (17). Because RXR-TR heterodimers are active at DR-4, TR monomers at Pal, and TRβ homodimers at F2, we propose that different TR oligomers exhibit differential sensitivity to T₃ in mammalian cells, with RXR-TRs and TR monomers > TR homodimers.

DISCUSSION

The findings reported in this study indicate that RXR-TRs are not the only species of TR that is capable of transducing T_3 signals in eukaryotic cells; homodimers and monomers also play a role. We stress that our data support the notion that RXR-TRs are important players in T_3 response (1–4, 25, 46–53). RXR-TRs mediate T_3 activation at DR-4 in yeast, and T_3 activation at DR-4 in mammalian cells is uniquely dependent on the LBD dimer surface and the TR DBD heterodimer surface, consistent with the notion that heterodimers are active (Figs. 3 and 4). This does not seem to be the case at other TREs. $TR\beta$ activates transcription strongly at F2 in mammalian cells, but $TR\alpha$ does not, correlating with the extent of homodimer formation *in vitro*. Moreover, $TR\beta$ homodimers are active at F2 in yeast; $TR\beta$ activates transcription from this element in the presence of GRIP1 and the absence of RXR, and these effects require the LBD dimer surface. Finally, in mammalian cells: 1) TRs exhibit a strong requirement for the LBD dimer surface at F2, excluding the possibility that monomers are involved; 2) a $TR\beta$ T-box deletion that strongly inhibits homodimer formation but not heterodimer formation on DNA selectively inhibits TR action at F2; and 3) RXR inhibits T_3 response at F2, suggesting that heterodimer formation inhibits T_3 response at this element. Together, these findings suggest that TR-TR homodimers are active at F2, and accordingly, TR-TR homodimer formation can be detected in coimmunoprecipitation experiments with tagged TRs from extracts of living cells.

There may also be roles for monomers. A mutant version of TR that only forms monomers, $TR\beta L422R$, activates transcription with moderate efficiency at all three TREs in the presence of GRIP1 in yeast, and almost as efficiently RXR-TRs at Pal in this cell type. Furthermore, T_3 response at Pal in mammalian cells is completely independent of the LBD dimer and DBD heterodimer surfaces.

Our results complement recent findings of another group (34). Here, knockdown of endogenous RXR expression with specific short interfering RNA only impaired transcription of a subset of T_3 -regulated genes in a murine preneuroblastoma cell line, suggesting that RXR requirements of endogenous genes are quite variable and that other TR species must be active.

Although the data reveal significant correlation between DNA binding preferences of different TR oligomers and their respective roles in transcriptional activation from different response elements, our data also suggest that unknown influences must favor $TR\beta$ homodimer and monomer interactions with their preferred TREs in mammalian cells. The fact that $TR\beta$ homodimers and RXR-TRs activate transcription from F2 and DR-4 in yeast and mammalian cells and the ability of TR monomers to activate transcription at Pal in mammalian cells correlates well with observed DNA binding preferences of each species *in vitro*. Nevertheless, RXR-TRs predominate in mammalian cell extracts, bind a variety of TREs *in vitro*, and even activate transcription at Pal in yeast, so it is somewhat puzzling that RXR-TRs only appear able to activate from the DR-4 element in mammalian cell transfections. One obvious explanation is that TR transfection alters the TR/RXR ratio to highlight

effects of homodimers and monomers. We find, however, that the $TR\beta$ CTE mutant that is defective in homodimer formation exhibits impaired T_3 response at low levels of transfected receptor (Fig. 5) (data not shown) and that even low amounts of TRs function as monomers at Pal (Fig. 3). Thus, actions of $TR\beta$ homodimers and monomers seem to be favored at particular TREs over the predominant RXR-TR species by unspecified mammalian cell factors. Perhaps stabilizing effects of coregulators on TR DNA binding activity contribute to this effect (32).

What is the physiological importance of our findings? Although we believe that it is likely that RXR-TRs mediate many or even most T_3 responses in living cells, our data raise the interesting possibility that alternate TR species play special roles at subsets of TREs and that these influences could expand the range and complexity of physiological responses to T_3 . For example, the fact that TR-TR homodimers are active at F2, coupled with results described herein and in previous publications (9), suggests that this species must be both resistant to hormone activation and highly active in the presence of saturating levels of T_3 . Thus, $TR\beta$ homodimers may confer a large dynamic range of responses to high levels of T_3 on particular subsets of target genes with F2-like elements. Our data have not yet revealed similar selective actions for TR monomers; T_3 responses at Pal are qualitatively similar to those at DR-4, but it remains possible that TRE-selective actions of monomers will also be observed at some Pal elements or at variant TREs with single AGGTCA half-sites (54).

We recognize that our findings only indicate that contributions of different oligomeric forms of TR are possible and that direct proof that RXR-TRs, TR-TR homodimers, and TR monomers are active at particular genes in particular contexts awaits further analysis. It will be particularly instructive to bring chromatin immunoprecipitation to bear on this question. It is already established that RXR-TRs occupy promoters of T_3 -activated genes with DR-4 elements in the frog but that TRs can occupy an unusual human immunodeficiency virus type 1 in the absence of RXRs in a frog oocyte chromatin assembly assay (26, 31). It nevertheless remains important to examine this question in the context of mammalian genes. It may be possible to determine whether variable RXR dependence of endogenous T_3 -responsive genes in mouse preneuroblastoma cells correlates with the lack of RXR recruitment to target promoters or particular TRE sequence organization (34). More generally, it will be interesting to determine the degree of overlap between chromosomal TR- and RXR-binding sites using a chromatin immunoprecipitation approach combined with nested oligonucleotides that span the genome, as demonstrated with estrogen receptors (55).

Finally, we stress that our studies do not exclude the possibility that the TRE sequence could influence TR activity in other ways. Half-site placement could influence TR activity via effects on TR conformation; it is known that TR-TR homodimers bind quite strongly to subsets of DR-4 elements (39), and examination of likely orientations of the TR DBDs at IP-6 and DR-4 elements indicates that one DBD must swivel to contact DNA at DR-4 (1). These conformational adaptations

could exert profound influences on TR activity. Variations in half-site spacing could also play a role (22, 56). Altered half-site spacing can reverse the direction of retinoid response from activation to repression by altering the polarity of RXR-retinoic acid receptor pairs (57). Although analogous effects have not been seen for TRs, it is known that differences in half-site spacing of inverted palindromic TREs do affect ligand response. The SERCa2 promoter contains a DR-4 element that is important for T₃ activation (TRE1) and two auxiliary inverted palindromic elements (TRE2, IP-4 and IP-6, TRE3) (12). When TR activity is assayed in isolation at the SERCa2 IPs, T₃ activates transcription from TRE3 but not TRE2, and the TRβ isoform-selective modulator GC-1 exhibits strong aberrant antagonist activity at TRE3 and weak antagonist activity at TRE2. Finally, DNA contacts are known to exert allosteric influences on nuclear receptor DNA binding domains that can then be propagated to neighboring transactivation functions (58). Thus, degenerate TRE sequences could influence receptor conformation and activity, even within the context of a standard TRE organization.

In summary, however, our findings confirm that the effects of TRE half-site placement on TR oligomer recruitment is at least one important factor that should be considered in the regulation of T₃ responsiveness *in vivo*. It is noteworthy that unusual actions of TRβ isoform-selective modulators have been detected at IP elements (11, 12); GC-1 represses transcription from IP elements in the SERCa2 promoter, and GC-24 is specifically superactive at F2. It will be interesting to examine the possibility that these effects are related to preferential homodimer recruitment, and whether it will be possible to develop TRE-selective modulators by targeting drugs toward particular TR species.

Acknowledgments—We thank Dr. F. Schaufele for critical reading of the manuscript and Y.-F. Yang and R. Y. Wang for yeast assay technical assistance.

REFERENCES

- Desvergne, B. (1994) *Mol. Cell. Endocrinol.* **100**, 125–131
- Laudet, V., and Gronemeyer, H. (2002) *The Nuclear Receptor Facts Book*, 1st Ed., pp. 87–112, Academic Press, London
- Yen, P. M. (2001) *Physiol. Rev.* **81**, 1097–1142
- Zhang, J., and Lazar, M. A. (2000) *Annu. Rev. Physiol.* **62**, 439–466
- Ribeiro, R. C., Apriletti, J. W., Wagner, R. L., Feng, W., Kushner, P. J., Nilsson, S., Scanlan, T. S., West, B. L., Fletterick, R. J., and Baxter, J. D. (1998) *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **65**, 133–141
- Glass, C. K., and Rosenfeld, M. G. (2000) *Genes Dev.* **14**, 121–141
- Shibusawa, N., Hollenberg, A. N., and Wondisford, F. E. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 732–738
- Santos, G. M., Afonso, V., Barra, G. B., Togashi, M., Webb, P., Neves, F. A., Lomri, N., and Lomri, A. (2006) *Mol. Pharmacol.* **70**, 793–800
- Williams, G. R., Zavacki, A. M., Harney, J. W., and Brent, G. A. (1994) *Endocrinology* **134**, 1888–1896
- Yoh, S. M., and Privalsky, M. L. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 16857–16867
- Borngraeber, S., Budny, M. J., Chiellini, G., Cunha-Lima, S. T., Togashi, M., Webb, P., Baxter, J. D., Scanlan, T. S., and Fletterick, R. J. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 15358–15363
- Gloss, B., Giannocco, G., Swanson, E. A., Moriscot, A. S., Chiellini, G., Scanlan, T., Baxter, J. D., and Dillmann, W. H. (2005) *Endocrinology* **146**, 4926–4933
- Meier, C. A., Parkison, C., Chen, A., Ashizawa, K., Meier-Heusler, S. C., Muchmore, P., Cheng, S. Y., and Weintraub, B. D. (1993) *J. Clin. Investig.* **92**, 1986–1993
- Kurokawa, R., Yu, V. C., Naar, A., Kyakumoto, S., Han, Z., Silverman, S., Rosenfeld, M. G., and Glass, C. K. (1993) *Genes Dev.* **7**, 1423–1435
- Andersson, M. L., Nordstrom, K., Demczuk, S., Harbers, M., and Vennstrom, B. (1992) *Nucleic Acids Res.* **20**, 4803–4810
- Miyamoto, T., Suzuki, S., and DeGroot, L. J. (1993) *Mol. Endocrinol.* **7**, 224–231
- Ribeiro, R. C., Feng, W., Wagner, R. L., Costa, C. H., Pereira, A. C., Apriletti, J. W., Fletterick, R. J., and Baxter, J. D. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 14987–14995
- Lazar, M. A., Berrodin, T. J., and Harding, H. P. (1991) *Mol. Cell. Biol.* **11**, 5005–5015
- Darling, D. S., Carter, R. L., Yen, P. M., Welborn, J. M., Chin, W. W., and Umeda, P. K. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 10221–10227
- O'Shea, P. J., and Williams, G. R. (2002) *J. Endocrinol.* **175**, 553–570
- Leng, X., Blanco, J., Tsai, S. Y., Ozato, K., O'Malley, B. W., and Tsai, M. J. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 31436–31442
- Liang, F., Webb, P., Marimuthu, A., Zhang, S., and Gardner, D. G. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 15073–15083
- Yen, P. M., Darling, D. S., Carter, R. L., Forgione, M., Umeda, P. K., and Chin, W. W. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 3565–3568
- Ribeiro, R. C., Kushner, P. J., Apriletti, J. W., West, B. L., and Baxter, J. D. (1992) *Mol. Endocrinol.* **6**, 1142–1152
- Yen, P. M., Sugawara, A., and Chin, W. W. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 23248–23252
- Sachs, L. M., and Shi, Y. B. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 13138–13143
- Barros, A. C., Erway, L. C., Krezel, W., Curran, T., Kastner, P., Chambon, P., and Forrest, D. (1998) *Neuroreport* **9**, 2933–2937
- Hollenberg, A. N., Monden, T., Madura, J. P., Lee, K., and Wondisford, F. E. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 28516–28520
- Liu, Y., Takeshita, A., Misiti, S., Chin, W. W., and Yen, P. M. (1998) *Endocrinology* **139**, 4197–4204
- Cohen, R. N., Putney, A., Wondisford, F. E., and Hollenberg, A. N. (2000) *Mol. Endocrinol.* **14**, 900–914
- Hsia, S. C., and Shi, Y. B. (2002) *Mol. Cell. Biol.* **22**, 4043–4052
- Diallo, E. M., Thompson, D. L., and Koenig, R. J. (2005) *Protein Expression Purif.* **40**, 292–298
- Piedrafita, F. J., Bendik, I., Ortiz, M. A., and Pfahl, M. (1995) *Mol. Endocrinol.* **9**, 563–578
- Diallo, E. M., Wilhelm, K. G., Jr., Thompson, D. L., and Koenig, R. J. (2007) *Mol. Cell. Endocrinol.* **264**, 149–156
- Walfish, P. G., Yoganathan, T., Yang, Y. F., Hong, H., Butt, T. R., and Stallcup, M. R. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 3697–3702
- Anafi, M., Yang, Y. F., Barlev, N. A., Govindan, M. V., Berger, S. L., Butt, T. R., and Walfish, P. G. (2000) *Mol. Endocrinol.* **14**, 718–732
- Meng, X., Yang, Y. F., Cao, X., Govindan, M. V., Shuen, M., Hollenberg, A. N., Mymryk, J. S., and Walfish, P. G. (2003) *Mol. Endocrinol.* **17**, 1095–1105
- Meng, X., Webb, P., Yang, Y. F., Shuen, M., Yousef, A. F., Baxter, J. D., Mymryk, J. S., and Walfish, P. G. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 6267–6272
- Wu, Y., Xu, B., and Koenig, R. J. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 3929–3936
- Zechel, C., Shen, X. Q., Chen, J. Y., Chen, Z. P., Chambon, P., and Gronemeyer, H. (1994) *EMBO J.* **13**, 1425–1433
- Zechel, C., Shen, X. Q., Chambon, P., and Gronemeyer, H. (1994) *EMBO J.* **13**, 1414–1424
- Perlmann, T., Umeson, K., Rangarajan, P. N., Forman, B. M., and Evans, R. M. (1996) *Mol. Endocrinol.* **10**, 958–966
- Togashi, M., Nguyen, P., Fletterick, R., Baxter, J. D., and Webb, P. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 25665–25673
- Rastinejad, F., Perlmann, T., Evans, R. M., and Sigler, P. B. (1995) *Nature* **375**, 203–211
- Leitman, D. C., Costa, C. H., Graf, H., Baxter, J. D., and Ribeiro, R. C. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 21950–21955
- Burnside, J., Darling, D. S., and Chin, W. W. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 2500–2504

Thyroid Hormone Receptor Dimerization

47. Murray, M. B., and Towle, H. C. (1989) *Mol. Endocrinol.* **3**, 1434–1442
48. Kliewer, S. A., Umesono, K., Noonan, D. J., Heyman, R. A., and Evans, R. M. (1992) *Nature* **358**, 771–774
49. Leid, M., Kastner, P., Lyons, R., Nakshatri, H., Saunders, M., Zacharewski, T., Chen, J. Y., Staub, A., Garnier, J. M., Mader, S., and Chambon, P. (1992) *Cell* **68**, 377–395
50. Marks, M. S., Hallenbeck, P. L., Nagata, T., Segars, J. H., Appella, E., Nikodem, V. M., and Ozato, K. (1992) *EMBO J.* **11**, 1419–1435
51. Yu, V. C., Delsert, C., Andersen, B., Holloway, J. M., Devary, O. V., Naar, A. M., Kim, S. Y., Boutin, J. M., Glass, C. K., and Rosenfeld, M. G. (1991) *Cell* **67**, 1251–1266
52. Zhang, X. K., Hoffmann, B., Tran, P. B., Graupner, G., and Pfahl, M. (1992) *Nature* **355**, 441–446
53. Ribeiro, R. C., Apreletti, J. W., Yen, P. M., Chin, W. W., and Baxter, J. D. (1994) *Endocrinology* **135**, 2076–2085
54. Katz, R. W., and Koenig, R. J. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 18915–18920
55. Carroll, J. S., Meyer, C. A., Song, J., Li, W., Geistlinger, T. R., Eeckhoutte, J., Brodsky, A. S., Keeton, E. K., Fertuck, K. C., Hall, G. F., Wang, Q., Bekiranov, S., Sementchenko, V., Fox, E. A., Silver, P. A., Gingeras, T. R., Liu, X. S., and Brown, M. (2006) *Nat. Genet.* **38**, 1289–1297
56. Shin, D. J., Plateroti, M., Samarut, J., and Osborne, T. F. (2006) *Nucleic Acids Res.* **34**, 3853–3861
57. Jepsen, K., Hermanson, O., Onami, T. M., Gleiberman, A. S., Lunyak, V., McEville, R. J., Kurokawa, R., Kumar, V., Liu, F., Seto, E., Hedrick, S. M., Mandel, G., Glass, C. K., Rose, D. W., and Rosenfeld, M. G. (2000) *Cell* **102**, 753–763
58. Lefstin, J. A., Thomas, J. R., and Yamamoto, K. R. (1994) *Genes Dev.* **8**, 2842–2856



ANEXO 2

Effects of Retinoid X Receptor (RXR) upon Thyroid Hormone Action: influence of thyroid response elements and RXR concentration in solution

Rutn eia de Paula Pessanha¹, Karime Bicas Rocha¹, Ranieri Rodrigues de Oliveira¹, Marie Togashi^{1,2}, John D. Baxter², Paul Webb^{2,*}, Francisco de Assis Rocha Neves^{1,*}.

From the ¹Molecular Pharmacology Laboratory, Department of Pharmaceutical Sciences, School of Health Sciences, University of Brasilia, Brasília, DF, Brazil; ²Diabetes Center and Department of Medicine, University of California, San Francisco, CA 94143, USA.

*Correspondence to F. A. R. Neves, M.D., Ph.D., Laboratório de Farmacologia Molecular, Departamento de Ciências Farmac uticas, Universidade de Brasília, Caixa Postal 4473, CEP – 70.919-970, Brasília – DF, Brazil, tel. +55 61 33072098, fax +55 61 33474622, e-mail: chico@unb.br and to P. Webb, Ph.D, Diabetes Center & Department of Medicine, University of California, San Francisco CA 94122, USA, tel. 1-415-476-6789, fax 1-415-564-5813, e-mail: pwebb@diabetes.ucsf.edu

Abstract: Thyroid hormone receptors (TRs) are transcription factors that bind to thyroid hormone responsive elements (TREs) in the regulatory regions of target genes. TR can bind to TREs as monomers and homodimers, although it is thought to activate transcription primarily as heterodimers with retinoid X receptors (RXRs). Unliganded and liganded TR have a higher affinity to heterodimerize to RXR than to self-associate into homodimers. Therefore, in solution the mainly oligomeric state of TR is complexed to RXR. Recently, our group demonstrated that thyroid responsive element organization is essential to determinate the active thyroid complex, as monomer, homodimer or heterodimer. Interestingly, we showed that the RXR overexpression impaired the transcriptional activity on F2, but not on DR-4. However, the mechanism evolved in this action is not clear. To investigate the role of RXR heterodimerization, bound or not to DNA, upon TR transcription activation on the different TREs, we performed transient transfection assays with TR β 1, RXR α (wild type and mutant) and reporter plasmids for different TREs: a direct repeat (DR-4), a palindrome (PAL) and an inverted palindrome (F2) into promonocyte human cells (U937). Our results showed that RXR overexpression did not change the TR transcriptional activity on DR-4; on F2, RXR decreased TR activity to 46.5%; and on PAL, it reduced to 52%. The effect on F2 was RXR dose-dependent. In addition, the co-transfection of chimeric vector, GAL4-DBD/RXR-LBD, which is not able to bind to TREs, but it forms heterodimers with TR in solution, also impaired TR activity on F2, but not on DR-4. The co-transfection of an excess of the coactivator expression vector (GRIP-1) did not change the GAL4-DBD/RXR-LBD impairment effect on F2, suggesting that RXR-LBD was not sequestering coactivators. In contrast, on PAL, this chimeric protein (GAL/RXR) increased significantly the fold activation, in the absence or the presence of the coactivator co-transfection. Lastly, we performed co-transfections with a RXR dimerization mutant (RXR LL419,420RR) which does not dimerized with TR in solution. This RXR mutant completely reversed the inhibitory effect of RXR on F2 and PAL. Our data showed that RXR interacts with TR in solution and decreases TR availability to induce transcription activation on F2 as homodimers. These results imply that in solution, but not bound to DNA, the excess of RXR can prevent TR binding to DNA, mainly on F2. The results with the responsive element PAL showed that the RXR modulator effect occurs by direct binding of heterodimers on DNA or by TR sequester in solution, decreasing its availability, and consequently, increasing the possibility of monomers bound in this responsive element and to activate the transcription.

1. Introduction

The thyroid hormone actions (T3) are mediated by binding to nuclear thyroid hormone receptors (TRs). TRs are ligand-dependent transcription factors which regulate the transcription by binding to thyroid responsive elements (TREs) in target genes promoter¹. TREs are constituted of at least two copies, in general degenerated, of the hexanucleotide AGGTCA². This sequence can be disposed as direct repeats spaced by four nucleotides (DR-4), palindrome sequences (PAL) or inverted palindromes spaced by six nucleotides (F2)^{3,4}.

TRs, as well as many other nuclear receptors, bind to DNA preferentially as heterodimers with retinoid X receptor (RXRs). Heterodimerization strongly increases binding to TRE and transcriptional activity⁵⁻⁷. Although TR showed an apparently preference in form heterodimers with the RXR, it also forms monomers, homodimers and trimers^{4, 8-10}.

The heterodimers (TR/RXR) are seen in solution or bound to DNA, however the TR homodimers formation occurs mainly when they are bound to DNA. This information indicated that heterodimers are more stable than homodimers and, thus molecular interactions that promotes the homodimers formation are different of those promotes the heterodimers formation¹¹.

Due as the ability of the form heterodimers with many nuclear receptors, the RXR has a primordial function in the hormone signaling. This receptor also can be act as homodimer binding on a direct repeat element (DR-1) and activate transcription in response to 9-cis-retinoic acid (9-cis-RA)¹²⁻¹⁴.

TR and RXR can form oligomeric complex in solution. RXR has been reported to exist either as a mixed population of monomers, dimers and tetramers in solution. The addition of ligand or DR-1 to RXR tetramers in solution leads to their rapid dissociation into homodimers¹⁵⁻¹⁷. TR β 1 also can form homotetramers in solution, which is favored by high protein concentrations and constrained by ligand binding¹⁸. Although the physiological relevance of these oligomeric organizations is not completely understood, tetramer formation can provide an additional level of control of TR activity by sequestering excess of unliganded RXR or TR into inactive pools within the cell^{17, 18}.

Thus, the dynamic equilibrium between nuclear receptor oligomers is influenced by receptor concentrations, ligand and DNA presence¹⁷.

Other important factor to be considered is the functional diversity of the TREs naturally found as palindromes, inverted palindromes and direct repeats, and the different number of the bases between the hexanucleotides. Moreover, these sequences are in general degenerated, suggesting that the DNA context can be determinant in the TR binding and regulation the transcriptional activity as monomers, homodimers or heterodimers¹⁹.

Ribeiro *et al.* (1992) demonstrated the first evidence about TR oligomers bound in a preferential way to different TREs. Gel Shift Assays showed that the T3 presence abolished the homodimers on DR-4, but only decrease these complexes on F2, suggesting that homodimers are bound in a more stable way in this responsive element. On the other hand, the T3 presence did not have influence in the heterodimers complexes bound to DNA¹⁹⁻²¹.

The evidence that corroborate the TR preferential binding to the different responsive elements was demonstrated in experiments performed in *Saccharomyces cerevisiae*. In the experiments performed on DR-4, the transcriptional activity occurs mainly with the heterodimers binding (RXR/TR). In contrast, on the responsive elements, F2 and PAL, the homodimers and heterodimers showed similar transcriptional activation²².

Recently, we demonstrated that TR β activated transcription more efficiently than TR α on F2, and that this correlates with preferential TR β homodimer formation on this element *in vitro*. Moreover, the analysis of effects of TR β mutations that block homodimers and/or heterodimers formation revealed TRE-selective requirements for these surfaces in mammalian cells which suggest that TR β homodimers are active on F2, heterodimers (RXR/TR) on DR-4 and TR monomers on PAL²³.

Interestingly, RXR overexpression in U937 cells reduced the T3 response on F2 about 50%, but did not affect the T3 response on DR-4²³. The mechanisms evolved in this impairment could be: 1) competition by DNA binding as RXR/TR heterodimers; 2) sequestration of coactivators; and 3) sequestration of TR in solution.

The aim of this study was to investigate the role of RXR heterodimerization, bound or not to DNA, upon TR transcription activation on different thyroid response elements. Our data showed that RXR interacts with TR in solution and decreases TR availability to induce transcriptional activation as homodimers mainly on F2. These results imply that, the

excess of RXR can modulate T3 effect in solution, but not bound to DNA. Moreover, on PAL we showed that an expression of a chimeric protein GAL4-DBD/RXR-LBD sequestered TRs in solution decreasing their availability, and consequently, increasing the possibility of monomers bound to this element and increase the transcriptional activity. Nevertheless, the physiological relevance of these findings needs to be investigated.

2. Materials and Methods

Expression vectors and reporter genes:

The reporter genes are from the vector pUC19 (New England Biolabs) and each one plasmid had two copies of the synthetic responsive elements: DR-4 5'-ttcAGGTCAcaggAGGTCAgag-3', F2 5'-ttcTGACCCcattggAGGTCAgag-3', PAL 5'-attcAGGTCATGACCTgaat-3' and DR-1: 5'- ttcAGGTCAcAGGTCAgag-3'. These responsive elements were cloned immediately upstream of a minimal thymidine kinase (TK) promoter (-32/+45) from the herpes simplex virus linked to luciferase coding sequences²⁴. Plasmids with the cytomegalovirus promoter (pCMV) linked to sequences that codify the human nuclear receptors TR β 1, RXR α and a RXR α dimerization double mutant (LL419,420RR) were used as expression vectors in the transfection assays. In many experiments we used a chimeric plasmid contained the DNA-binding domain (DBD) of the yeast transcription factor GAL-4 fused to the ligand-binding domain (LBD) of the human RXR α (DBD-GAL/RXR-LBD) and an expression vector to the full-length coactivator GRIP-1 (pSG5-GRIP-1). The reporter gene for chimeric receptor contained five GAL binding sites upstream of the adenovirus E1b minimal promoter linked to luciferase coding sequences.

Cells culture, transfection assays and luciferase enzyme assays:

The transfection assays were performed with human promonocyte cells (U937). The cells were maintained in culture in RPMI 1640 medium as previously described²⁴. For transfection assays, cells were collected by centrifugation and resuspended in a transfection solution (0.5 mL/ 1.5×10^7 cells) containing PBS, 100 mM calcium and 0.1% dextrose and mixed with 2 μ g of human nuclear hormone receptors (TR β 1 and/or RXR α wild type or mutant) expression vector, 4 μ g of the responsive element luciferase reporter and 500 ng

control β -galactosidase vector. The cells were transferred to a cuvette and electroporated using a Bio-Rad gene pulser at 300 V and 950 μ F. Immediately after electroporation, the cells were transferred to fresh RPMI 1640 medium and plated in 12-well dish (1 mL/well) and treated in triplicates with 1 μ L of T3 10^{-7} M or 9-cis-RA 10^{-7} M and ethanol (vehicle). After 24h, cells were collected by centrifugation, lysed by the addition of 100 μ L of a lysis buffer (0,25 M Tris-HCl pH 7.6, 0,1% Triton X-100) and assayed for luciferase (Promega) and β -galactosidase activities. All transfection experiments were performed at least three times. The fold activations were calculated by the ration between the cells activity indused by the hormone and cells treated with vehicle. The graphics were performed by the Prism 3.0 (GraphPad Software, Inc.).

Statistics Analisis:

Data were analyzed by ANOVA followed by Newman-Keuls Test when applicable and $P < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

Recently we showed that the RXR co-transfection impaired the TR transcription activity in the responsive element F2²³. To confirm this result we performed the experiments with the thyroid responsive elements DR-4 and F2, and we including the palindrome responsive element (PAL).

The figure 1 shows the comparison of the RXR co-transfection effect in the TR activity in U937 cells. The excess of RXR did not have influence on DR-4, the fold activation was $107.5\% \pm 19$, but it impaired the transcription activity on F2 decreasing the fold activation to $46.5\% \pm 2.4$, and on PAL decreasing the transcription activation to $52\% \pm 5$.

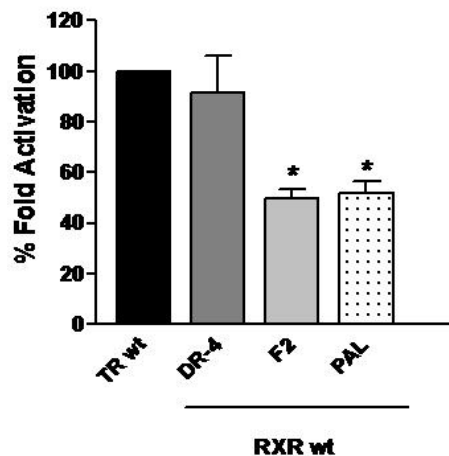


Figure 1: The T3 response mediated by the co-transfection of expression vectors (2 μ g) to the hTR β 1wt and hRXR α wt receptors on the different thyroid responsive elements (DR-4, F2 and PAL). The U937 cells were co-transfected with 4 μ g of a gene reporter TRE-2TK-LUC and treated with ethanol or 100 nM de T3. The gene reporter activity was measured after 24h with the lyses of the cells and the numbers represents the transcription fold activation. These graphics correspond to three experiments performed individually ($P < 0.05$ versus TRwt).

To verify whether the prejudice in the transcriptional activity was dependent of the increase of intracellular levels of RXR, we examined T3 response in U937 cells transfected with the responsive element F2 (4 μ g), an expression vector to TR β 1 (2 μ g) and increasing concentrations (0,00; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0 and 4,0 μ g) of an expression vector to RXR α . The figure 2A shows that the co-transfection of 2,0 and 4,0 μ g of RXR decreased in 40% and 45% the transcription activity on this element, showing that the RXR effect was dose-dependent.

In addition, to confirm that the RXR was been expressed in a functional form, we performed experiments with its natural responsive element (DR-1) and analyzed the response mediated by 9-cis retinoic acid (9-cis-RA) with increasing concentrations (0,00; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 and 8,0 μ g) of RXR. The figure 2B shows that the increase in the RXR concentration leads to an increase in the transcriptional activity dose-dependent, demonstrating that the RXR was expressed in a functional form.

Although the RXR showed a increase in the transcription activity statistically significant only since of 4,0 μ g on DR-1, the co-transfection of 2,0 μ g of RXR, on F2 and PAL, decreased the transcription activation significantly (figure 1 and 2A).

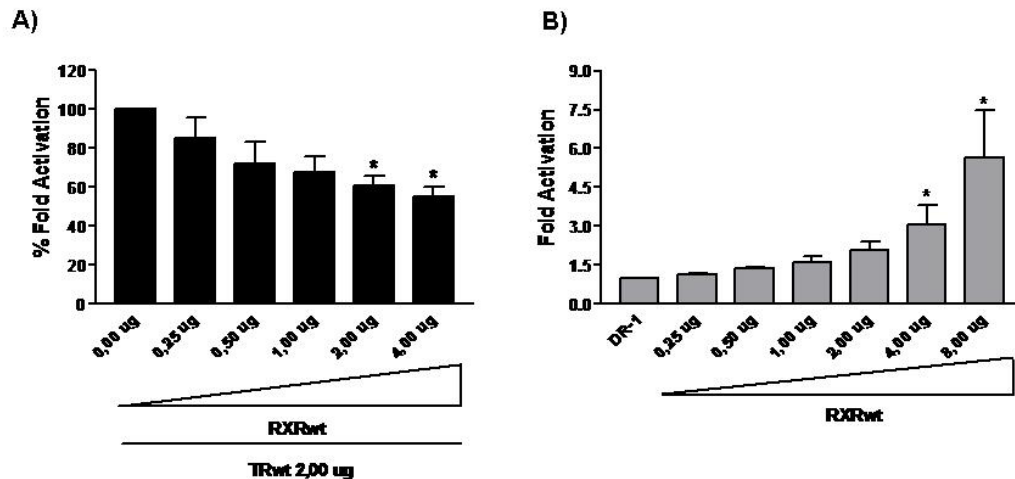


Figure 2: A) T3 response mediated by the co-transfection of expression vectors hTR β 1wt (2 μ g) and increased amounts of hRXR α wt (0.00; 0.25; 0.50; 1.00; 2.00 and 4.00 μ g) on F2. U937 cells were co-transfected with 4 μ g of a gene reporter F2-2TK-LUC and treated with ethanol or 100 nM de T3. B) 9-cis retinoic acid response mediated by increased amounts of hRXR α wt expression vector (0.00; 0.25; 0.50; 1.00; 2.00; 4.00 and 8.00 μ g) co-transfection and 4 μ g of a reporter gene DR-1-2TK-LUC and treated with ethanol or 100 nM de 9-cis retinoic acid. The gene reporter activity was measured after 24h with the lyses of the cells and the numbers represents the transcription fold activation. These graphics correspond to three experiments performed individually.

These results showed that the inhibition in the transcription activity on F2 is dependent of intracellular levels of RXR, thus, our question was what mechanism RXR use to impair the transcription activation on F2 and PAL. One possibility thought was RXR would be disrupted the transcription activity by direct binding of RXR/TR heterodimers on these elements. To answer this question, we co-transfected a chimeric expression vector with a DNA binding domain (DBD) of the yeast transcription factor GAL-4 fused to the ligand binding domain (LBD) of the RXR (figure 3A). This vector generate a protein able to dimerize with TR due to the dimerization surface on LBD, but not able to bind on thyroid response elements (TREs).

The GAL/RXR co-transfection inhibited more the transcription activation on F2 ($37\% \pm 3$) including when we compared the inhibition caused by RXR ($63\% \pm 5$), but on the other hand, it increased the transcription activity on PAL ($156\% \pm 10$). Thus, RXR did not disrupt the transcription on F2 by direct binding to DNA, but apparently, RXR is affected the transcription on PAL by direct binding of heterodimers on DNA because the GAL/RXR restored the transcriptional activity on this element (figure 3A). Surprisingly,

the chimeric vector GAL/RXR increased significantly the transcription activity when compared with TR wild type.

Another possibility to explain the RXR influence in the transcriptional activity could be because the coactivators sequester in solution. To test whether RXR would be sequestering coactivators and consequently impairing the transcriptional activity, we performed experiments co-transfected an expression vector to the coactivator GRIP-1 (pGS-GRIP-1) in the presence of the expression vector to GAL/RXR. This strategy would increase the coactivator intracellular levels and could to correct the RXR negative effect in the transcriptional activity on F2 and PAL. The co-transfection of an excess of coactivator (COA) did not affect the transcription on DR-4, however did not modify the inhibition caused by GAL/RXR on F2 ($41\% \pm 3$), and surprising leads to an increase in the transcription activity on PAL (211.4 ± 13) (figure 3A).

In the figure 3B, we demonstrated that the chimeric vector, GAL/RXR, was expressed in a functional form with the co-transfection of its responsive element (GAL-ERE) and treatment of the cells with 9-cis retinoic acid leads to an increase of 10 ± 4 in the fold activation.

In order to confirm the coactivator function we performed experiments with TRwt and co-transfection of an excess of the coactivator vector (2,0 and 10,0 μg). These experiments showed that a transcription of 10 μg of the coactivator increased the transcriptional activity significantly, as seen in the figure 3C.

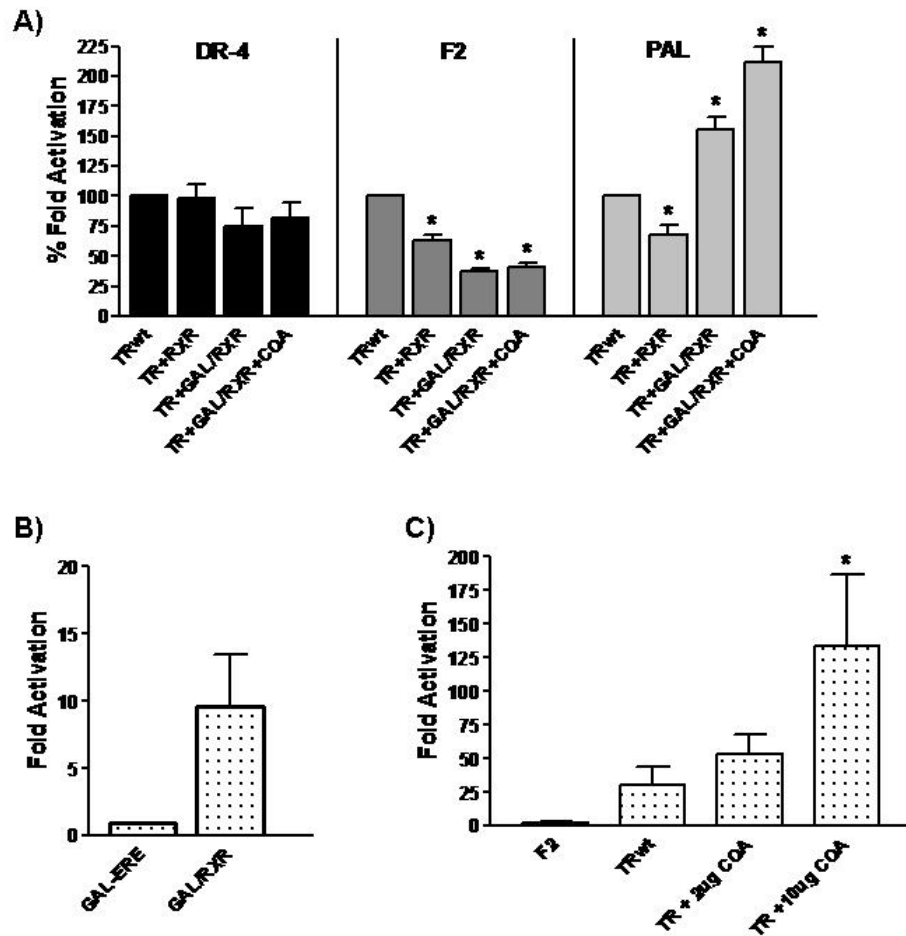


Figure 3: The T3 response mediated by the co-transfection of expression vectors (2 µg) to the nuclear receptors: hTRβ1wt, hRXRαwt, GAL/RXR, and the coactivator COA (pGS-GRIP-1) on the different responsive elements. The U937 cells were co-transfected with 4 µg of a reporter gene TRE-2TK-LUC and treated by ethanol or 100 nM de T3; and B) The T3 response mediated by the co-transfection of chimeric expression vector to GAL/RXR (GAL4 DBD and RXR LBD) and 4 µg the response element for the GAL-4 yeast transcription factor (GAL-ERE); and C) The T3 response mediated by the co-transfection of expression vector to hTRβ1wt and the coactivator in two concentrations (2 and 10 µg) on the response element F2. The gene reporter activity was measured after 22h with the lyses of the cells and the numbers represents the transcription fold activation. These graphics correspond to three experiments performed individually (*P<0.05 versus TRwt).

Lastly we examined the possibility of RXR would be affect the transcription on F2 and PAL by sequestrers of TR in solution. To test this hypothesis we used a RXR mutant (LL419,4120RR) that didn't form heterodimers with TR²⁴. As shown in the figure 4, the RXR mutant recovered the transcription activation on F2 and PAL, and demonstrated transcription values very similar to TR wild type. Besides, on F2 the RXR mutant increases the transcriptional activity significantly when compared with TR wild type.

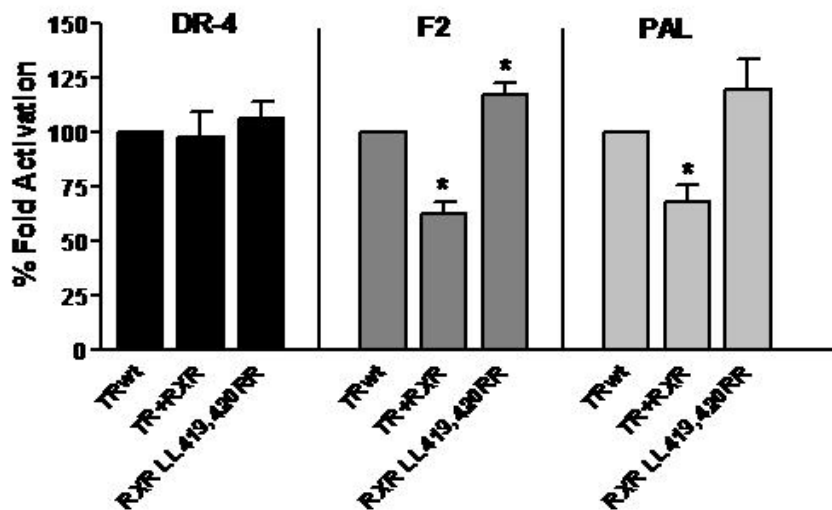


Figure 4: The T3 response mediated by the co-transfection of expression vectors (2 μ g) to the nuclear receptors (hTR β 1wt, hRXR α wt and a RXR dimerization mutant LL419,420RR) on the different responsive elements. The U937 cells were co-transfected with 4 μ g of a reporter gene TRE-2TK-LUC and treated by ethanol or 100 nM de T3. The gene reporter activity was measured after 22h with the lyses of the cells and the numbers represents the transcription fold activation. These graphics correspond to three experiments performed individually (P<0.05 versus TRwt).

Taken together, our results suggest that DNA context is important to recruit the different TR complexes. On F2, RXR sequester TR in solution decreasing its availability to binding as homodimers. On the other hand, the RXR co-transfection on PAL could impair the transcriptional activity by direct binding as heterodimer RXR/TR or by sequester of TR in solution. The experiments performed where GAL/RXR co-transfection increased the transcriptional activity in this element, the TR sequestration could be decreasing its availability and consequently increasing the possibility of monomers binding to DNA. Thus, our data confirm that there is a TR preferential binding to its responsive elements, with DR-4 as a preferential site to heterodimers (RXR/TR) and F2 a preferential site to homodimers (TR/TR) and PAL preferential to TR monomers.

4. Discussion

The binding of TR to the responsive elements (TREs) in a specific manner is essential to the TR exerts its regulatory function in the genes target promoter T3-dependent. TRs have been shown to bind DNA as monomers, homodimers, heterodimers, and more recently as trimers^{3, 10, 25}.

Gel Shift Assays have been shown that RXR-TR heterodimers generally are found to bind TREs more strongly than TR homodimers^{6, 25, 26}. This difference is especially striking in the presence T3, which destabilizes the TR homodimer-DNA complex^{20, 21}. Thus, it has generally been assumed that RXR-TR heterodimers mediate the regulation of transcription by T3.

The evidence that reinforcement this model is that the addition of T3 in vitro suppressed the TR homodimers binding on DNA, mainly on DR-4, suggesting that the main TR action in this is as RXR-TR heterodimers¹⁹. It is supposed that in the hormone absence, the TR is bound to DNA as homodimer associated with a complex of corepressor proteins that inhibited the transcriptional activity^{27, 28}. After hormone binding, there is a conformational change in the receptor allowing its dimerization with RXR, dissociation of corepressor proteins and association with coactivator proteins and consequently the transcriptional activation^{14, 29}. Actually this model of the molecular mechanism of TR action has been largely asked, especially in relation of the function of the other TR oligomeric forms like monomers, homodimers, trimers and tetramers, found than in solution, as bound on DNA^{18, 23, 30}.

Previous studies performed in *Saccharomyces cerevisiae* demonstrated that on DR-4 the transcription activation occurs mainly in the heterodimer form, however on F2 the transcription activation occurs in the homodimer form²². These data suggested that the nature of the responsive element influences the binding of the different TR oligomers.

Other study in yeast cells corroborated this hypothesis; it demonstrated that the RXR is required for gene expression from responsive elements composed of suboptimal half-sites (NNAGGTCA) whereas only thyroid hormone receptors are sufficient to activate gene expression maximally from response elements containing optimal half-sites constituted by the two octamers (TA-AGGTCA)³¹.

Recently, using TR mutants that disrupted the dimerization, we demonstrated that RXR/TRs are not the only species of TR that is capable of transducing T3 signals in mammalian cells; homodimers and monomers also play a role. The main findings of this work was that TRs exhibit a strong requirement for the LBD dimmer surface at F2,

excluding the possibility that monomers are involved; a TR β 1 T-box deletion that strongly inhibits homodimer but not heterodimer formation on DNA selectively inhibits TR action at F2; and RXR over expression inhibits T3 response at F2, suggesting that heterodimer formation inhibits transcriptional activity at this element²³.

Simultaneously, Diallo *et al.* (2007) demonstrated that the regulation of the transcription mediated by T3 not depend exclusively of the RXR presence. Employed a RNA interference approach (siRNA) to specifically inhibit RXR activity in a mouse pre-neuronal cell line (Neuro2a) was possible to demonstrate that there is a hierarchy of RXR requirement among endogenous T3 responsive genes in this system, suggesting that TR could be act by diverse oligomeric forms, as monomers, homo-oligomers, or hetero-oligomers, dependent of target genes context³².

The RXR is considered a promiscuous nuclear receptor; it binds to many nuclear hormone receptors like TR, RAR, PPAR, VDR, PXR, LXR and NGFI-B, indicating its plasticity¹⁴. It is supposed that the heterodimerization with RXR increase the transcriptional activity of these receptors, however it isn't known whether it occurs in all responsive elements sequences or cellular contexts.

Castillo *et al.* (2004) showed that the cellular context can be crucial in determining whether a given element can confer regulation by one or both ligands of the RXR/TR heterodimer. In stimulation of prolactin (PRL) gene expression, RXR does not act as a silent partner for TR, RXR/TR can act as a permissive heterodimer, allowing stimulation of transcription by the ligands of both subunits of the heterodimer. This effect was demonstrated in pituitary cells and HeLa cells transfected with the heterologous promoter PRL-TRE, but not in CV-1 cells³³.

The precise role of RXR in T3 action has been difficult to define in part because there are no RXR-null mammalian cells. Transfection of mammalian cells with RXR generally only marginally increases T3 induction, which could suggest that RXR is relatively unimportant or could indicate that it is essential but that endogenous RXR is sufficient³².

According to mentioned previously, our results demonstrated that the RXR over expression decrease the TR β 1 transcriptional activity in transfection and gene reporter assays performed with the responsive element F2, but not on DR-4²³. However, the mechanism evolved in this modulation was not clarified. Because that, in the present work,

we resolved investigate, specifically the importance of the heterodimerization with RXR, bound or not to DNA, upon the transcription mediated by TR in the different TREs.

Initially, we confirmed the previous results, and newly the RXR co-transfection inhibits the response mediated by T3 on F2, but not on DR-4. We also demonstrated that this effect on F2 is dose-dependent. Besides, this inhibition was demonstrated on the palindrome responsive element (PAL). Moreover, the RXR co-transfection increases the 9-cis-retinoic acid responses on DR-1, confirming that the receptor was been expressed in a functional form.

Afterwards, considering that on F2, TR β 1 act preferentially as homodimer and on PAL, as monomers²³, we resolved to evaluate whether the RXR modulator effect could be due as the competition by heterodimers bound to DNA or by coactivator sequester in solution. To confirm this, we co-transfected a chimeric vector, GAL/RXR, that don't bind to the TREs, but it is able to form dimers with the TR, in the absence or presence of the coactivator GRIP-1 (COA). This chimeric vector has a DBD of the yeast transcription factor GAL-4 fused to the LBD of the RXR. Interestingly, the chimeric receptor continued to inhibits the TR β 1 transcriptional activity on F2 and the coactivator co-transfection did not correct this effect. These results suggest that RXR did not modulate the TR action on F2 by direct bound of heterodimers on the DNA, or by sequester of coactivators in solution. On the other hand, on PAL, the chimeric receptor (GAL/RXR) reverted the RXR negative effect and increased significantly the transcription mediated by T3, and the coactivator co-transfection increased powerfully this effect. These results suggested that the RXR presence bound to DNA on PAL impaired the TR action by monomers.

Lastly we examined if RXR was sequestering TR in solution using a RXR dimerization mutant (LL419,420RR) that is not able to form heterodimers²⁴. Our results demonstrated that the RXR mutant recovered the transcriptional activity on F2, suggesting that RXR was sequestering TR in solution, and decreasing its availability to form homodimers and binding on DNA. In this way, our data are consistent with the notion that TR homodimers have an important role in the transcription activation on F2.

On PAL, the RXR mutant also recovered the activation, suggesting that TR sequester in solution by RXR, decrease the TR availability and consequently increase the possibility of monomers bound on DNA. The results on PAL suggesting that the RXR modulator effect occurs as by direct bound of heterodimers on DNA, than by sequester of TR in solution.

It is important to emphasize that the results obtained in our study showed that RXR can modulate TR action and this effect is dependent of the responsive element. It is possible that TR homodimers and RXR-TR heterodimers may prefer to bind different coregulatory proteins, which would provide an additional mechanism to differentially regulate the T3 responsiveness of target genes within the same cell.

In summary, the binding of different oligomeric forms in each one responsive element is a mechanism complex and not totally elucidate yet. Actually, we not know all genes regulated by T3, in this way, is difficult to foresee the nature of the responsive element (direct repeats, palindromes, inverted palindromes and reiterate half-sites) and what oligomeric form would be recruited. The receptor affinity by the DNA, ligand and the coregulators probably is different to each one oligomeric complex. The comprehension of all these factors could in the future contributed to development of pharmacology strategies that allow the design of specific ligands and the selective binding to the responsive elements, and consequently limiting the TR action to specific genes target.

5. References

1. Zhang J, Lazar MA. The mechanism of action of thyroid hormones. *Annu Rev Physiol* 2000;**62**:439-66.
2. Williams GR, G.A. B. Thyroid Hormone Response Elements. In: Weintraub BD, ed. *Molecular Endocrinology: Basic Concepts and Clinical Correlations*. New York: Raven Press. Ltd., 1995;217-239.
3. Ribeiro RCJ, Kushner PJ, Baxter JD. The nuclear hormone receptor gene superfamily. *Annu. Rev. Med.* 1995;**46**:443-453.
4. Glass CK. Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers. *Endocr Rev* 1994;**15**(3):391-407.
5. Kliewer SA, Umesono K, Mangelsdorf DJ, *et al.* Retinoid X receptor interacts with nuclear receptors in retinoic acid, thyroid hormone and vitamin D3 signalling. *Nature* 1992;**355**:446-449.
6. Hallenbeck PL, Phyllaier M, Nikodem VM. Divergent effects of 9-cis-retinoic acid receptor on positive and negative thyroid hormone receptor-dependent gene expression. *J.Biol.Chem.* 1993;**268**:3825-3828.

7. Leng X, Blanco J, Tsai SY, *et al.* Mechanisms for synergistic activation of thyroid hormone receptor and retinoid X receptor on different response elements. *J Biol Chem* 1994;**269**(50):31436-42.
8. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, *et al.* The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 1995;**83**(6):835-9.
9. Ribeiro RCJ, Apriletti JW, Wagner RL, *et al.* Mechanisms of Thyroid Hormone Action: Insights from X-ray Crystallographic and Functional Studies. *Recent Prog Horm Res* 1998;**53**:351-394.
10. Mengeling BJ, Pan F, Privalsky ML. Novel mode of deoxyribonucleic acid recognition by thyroid hormone receptors: thyroid hormone receptor beta-isoforms can bind as trimers to natural response elements comprised of reiterated half-sites. *Mol Endocrinol* 2005;**19**(1):35-51.
11. Apriletti JW, Ribeiro RCJ, Wagner RL, *et al.* Molecular and Structural Biology of Thyroid Hormone Receptors. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1998;**25**.
12. Heyman RA, Mangelsdorf DJ, Dyck JA, *et al.* 9-cis retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor. *Cell* 1992;**68**(2):397-406.
13. Levin AA, Sturzenbecker LJ, Kazmer S, *et al.* 9-cis retinoic acid stereoisomer binds and activates the nuclear receptor RXR alpha. *Nature* 1992;**355**:359-361.
14. Mangelsdorf DJ, Evans RM. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 1995;**83**(6):841-50.
15. Kersten S, Kelleher D, Chambon P, *et al.* Retinoid X receptor alpha forms tetramers in solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;**92**(19):8645-9.
16. Chen ZP, Iyer J, Bourguet W, *et al.* Ligand- and DNA-induced dissociation of RXR tetramers. *J Mol Biol* 1998;**275**(1):55-65.
17. Fischer H, Dias SM, Santos MA, *et al.* Low resolution structures of the retinoid X receptor DNA-binding and ligand-binding domains revealed by synchrotron X-ray solution scattering. *J Biol Chem* 2003;**278**(18):16030-8.
18. Figueira AC, Dias SM, Santos MA, *et al.* Human thyroid receptor forms tetramers in solution, which dissociate into dimers upon ligand binding. *Cell Biochem Biophys* 2006;**44**(3):453-62.
19. Ribeiro RC, Kushner PJ, Apriletti JW, *et al.* Thyroid hormone alters in vitro DNA binding of monomers and dimers of thyroid hormone receptors. *Mol. Endocrinol.* 1992;**6**:1142-1152.

20. Yen PM, Darling DS, Carter RL, *et al.* Triiodothyronine (T3) decreases binding to DNA by T3-receptor homodimers but not receptor-auxiliary protein heterodimers. *J.Biol.Chem.* 1992;**267**:3565-3568.
21. Yen PM, Sugawara A, Chin WW. Triiodothyronine (T3) differentially affects T3-receptor/retinoic acid receptor and T3-receptor/retinoid X receptor heterodimer binding to DNA. *J.Biol.Chem.* 1992;**267**:23248-23252.
22. Walfish PG, Yoganathan T, Yang YF, *et al.* Yeast hormone response element assays detect and characterize GRIP1 coactivator-dependent activation of transcription by thyroid and retinoid nuclear receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;**94**(8):3697-702.
23. Velasco LF, Togashi M, Walfish PG, *et al.* Thyroid hormone response element organization dictates the composition of active receptor. *J Biol Chem* 2007;**282**(17):12458-66.
24. Ribeiro RCJ, Feng W, Wagner RL, *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 Journal of Biological Chemistry* 2001.
25. Tsai MJ, O'Malley BW. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem* 1994;**63**:451-86.
26. Leid M, Kastner P, Lyons R, *et al.* Purification, cloning, and RXR identity of the HeLa cell factor with which RAR or TR heterodimerizes to bind target sequences efficiently. *Cell* 1992;**68**(2):377-95.
27. Horlein AJ, Naar AM, Heinzl T, *et al.* Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* 1995;**377**(6548):397-404.
28. Helmer EB, Raaka BM, Samuels HH. Hormone-dependent and -independent transcriptional activation by thyroid hormone receptors are mediated by different mechanisms. *Endocrinology* 1996;**137**(2):390-9.
29. Feng W, Ribeiro RCJ, Wagner RL, *et al.* Hormone-Dependent Coactivator Binding to a Hydrophobic Cleft on Nuclear Receptors. *Science* 1998;**280**(5370):1747-1749.
30. Figueira AC, Neto Mde O, Bernardes A, *et al.* Low-resolution structures of thyroid hormone receptor dimers and tetramers in solution. *Biochemistry* 2007;**46**(5):1273-83.
31. Olson DP, Koenig RJ. 5'-flanking sequences in thyroid hormone response element half-sites determine the requirement of retinoid X receptor for receptor-mediated gene expression. *J Biol Chem* 1997;**272**(15):9907-14.

32. Diallo EM, Wilhelm KG, Jr., Thompson DL, *et al.* Variable RXR requirements for thyroid hormone responsiveness of endogenous genes. *Mol Cell Endocrinol* 2007;**264**(1-2):149-56.
33. Castillo AI, Sanchez-Martinez R, Moreno JL, *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* 2004;**24**(2):502-13.