



Universidade Federal do Rio de Janeiro

Centro de Ciências Matemáticas e da Natureza –CCMN

Instituto de Química - IQ

Departamento de Bioquímica

Carolina Lixa Victor Neves

**PROTEÍNA CELULAR LIGANTE DE ÁCIDO RETINOICO 2 (CRABP2):
DINÂMICA MOLECULAR E INTERAÇÃO COM ÁCIDO RETINOICO**

Rio de Janeiro



Universidade Federal do Rio de Janeiro

Centro de Ciências Matemáticas e da Natureza –CCMN

Instituto de Química - IQ

Departamento de Bioquímica

Carolina Lixa Victor Neves

**PROTEÍNA CELULAR LIGANTE DE ÁCIDO RETINOICO 2 (CRABP2):
DINÂMICA MOLECULAR E INTERAÇÃO COM ÁCIDO RETINOICO**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica, Instituto de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências – Bioquímica.

Orientador: Anderson de Sá Pinheiro

Rio de Janeiro

CIP - Catalogação na Publicação

L788p Lixa , Carolina
PROTEÍNA CELULAR LIGANTE DE ÁCIDO RETINOICO 2
(CRABP2): DINÂMICA MOLECULAR E INTERAÇÃO COM ÁCIDO
RETINOICO / Carolina Lixa . -- Rio de Janeiro, 2019.
111 f.

Orientador: Anderson de Sá Pinheiro.
Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio
de Janeiro, Instituto de Química, Programa de Pós
Graduação em Bioquímica, 2019.

1. CRABP2. 2. Proteínas Intracelulares Ligantes
de Lipídeos. 3. Ácido Retinoico. 4. Ressonância
Magnética Nuclear. 5. Dinâmica de Proteínas. I. de Sá
Pinheiro, Anderson , orient. II. Título.

**PROTEÍNA CELULAR LIGANTE DE ÁCIDO RETINOICO 2 : DINÂMICA
MOLECULAR E INTERAÇÃO COM ÁCIDO RETINOICO**

Carolina Lixa Victor Neves
Orientador: Anderson de Sá Pinheiro

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Instituto de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências - Bioquímica.

Aprovada por:

Dr. Anderson de Sá Pinheiro (Presidente)
Instituto de Química - UFRJ

Dra. Bianca Cruz Neves
Instituto de Química - UFRJ

Dra. Ayla Sant Ana da Silva
Instituto Nacional de Tecnologia – INT/MCTIC

Dra. Ana Paula Valente
Instituto de Bioquímica Médica - UFRJ

Dra. Débora Foguel
Instituto de Bioquímica Médica - UFRJ

Dr. Rafael Dias Mesquita (Suplente interno)
Instituto de Química - UFRJ

Dra. Luzineide Wanderley Tinoco (Suplente externo)
Instituto de Pesquisas de Produtos Naturais Walter Mors - UFRJ

Rio de Janeiro
Setembro de 2019

À querida amiga Márcia Dias (in memoriam).

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer:

- A Deus, por ser bom o tempo todo!
- Aos meus pais Robson e Gláucia, por todo amor, apoio, incentivo, dedicação e atenção!
- Ao meu irmão Lucas, pela amizade sincera, pelas risadas compartilhadas e por sempre me ouvir!
- Aos meus avós Lena, Jorge (*In Memoriam*), Celina (*In Memoriam*) e Acydinir (*In Memoriam*), por todo o afeto e dedicação!
- Ao meu orientador Anderson, por todas as oportunidades de crescimento e aprendizado, pela confiança, por sempre considerar a minha opinião, pelo carinho e pela parceria nesses últimos 8 anos!
- Aos amigos do LaBMOL! À Carol, minha irmãzinha querida, por todas as dicas *fitness*, todos os papos cabeça regados a risadas e lágrimas. Ao Danielzinho, por ser tão especial e por estar sempre pronto para me abraçar quando eu preciso. Ao Igor, pelo seu exagerado bom-humor matinal que sempre consegue arrancar um sorriso meu. À Luiza e à Nathália, por terem conquistado o meu coração com tão pouco tempo de convivência. À Karina e à Clara pela convivência amigável no laboratório.
- À toda família LaBEP! Professoras Lúcia, Dani e Cris pela amizade, apoio e conversas regadas a café quentinho! Ao Gui e ao Léo, meus fiéis escudeiros desde a graduação, pela parceria incondicional na bancada e na vida. À Bia por iluminar meu dia com suas rabugices e fofuras. Ao Luisão, por sempre me contagiar com a sua alegria de viver. Ao Luisinho, meu filhote mimadinho, por ser a luz da nossa família poliamor. À querida Bruna, por sempre arrumar as melhores caronas para Niterói. Ao João, por ser o diabético mais falcatra desse mundo. À Ariana, por ser a pessoa mais arretada que eu conheço.
- Aos colegas do PetiPage lab! Aos professores Rebecca e Wolfgang, por terem me recebido, orientado e deixado as portas do laboratório abertas para o meu retorno. Ao Everton, pela amizade sincera, pelo carinho e pelos cafés diários no Luce. Aos meus colaboradores Sparky e Thomas, por toda a ajuda com o artigo da CRABP2.
- Às minhas colaboradoras, Nathália, Maísa e Maria Sandra, muito obrigada pela parceria científica e pela amizade fora do laboratório.
- A todos colegas e professores do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química, por serem sempre tão receptivos e atenciosos. Obrigada por toda a ajuda!

- Aos queridos colegas do CNRMN, obrigada pela receptividade, pela ajuda e pelos papos animados entre um HSQC e outro!
- Ao amigo Anwar, por todos os ensinamentos compartilhados, por toda a ajuda durante o desenvolvimento desta tese e por ser um exemplo de dedicação!
- Ao querido Charles, meu presente de Tucson, por ser um parceiro tão atencioso e apaixonado!
- À toda minha família, tios Fátima, Zé, Ivanilda, Cláudio, Ana, Léa, Hanna, Márcio, Toco, Rita, Boy, Fernanda, Claudinha, Edilson e aos meus primos Fábio, Elis, Ana, Kaio, Paola, Pâmela, Tati, Mimi, Biel, Maria, Pedro, Luisa, Victor e Gabi, por todo incentivo e por sempre compreenderem as minhas ausências devido aos compromissos acadêmicos!
- À Patota querida, Felipe, Karina, Carol, Diogo e Bianca, por tere o poder de me fazer sentir uma menina de 15 anos, mesmo que eu já tenha o dobro dessa idade, sempre que nos encontramos. Patota pra vida!
- A todos os meus amigos queridos por fazerem a minha vida tão iluminada! Dani Regina, Andressa, Jaque & Manu, Nayara, Livia, Cleiton e Rhods.
- À minha terapeuta Ana Cristina, minha nutricionista Ana Paula e minha endocrinologista Juliana, pela ajuda tão valiosa durante o período conturbado do doutorado!
- Aos membros que compõe esta banca examinadora, professoras Ana Paula Valente, Débora Foguel, Ayla Sant Ana, Bianca Neves, Rafael Mesquita e Luzineide Tinoco, por contribuírem para a evolução deste trabalho.

*“A felicidade não se resume na ausência de problemas,
mas sim na sua capacidade de lidar com eles.”*

Albert Einstein

RESUMO

O ácido retinoico (AR), o principal metabólito ativo da vitamina A, é capaz de regular a transcrição gênica através da ativação dos seus receptores nucleares cognatos. A Proteína Celular Ligante de AR 2 (CRABP2) atua como coativadora neste processo, transportando AR do citoplasma para o núcleo e o entregando diretamente aos Receptores de Ácido Retinoico (RARs). A ativação de RARs induz a transcrição de genes relacionados a apoptose e inibição do crescimento, o que confere a CRABP2 o *status* de proteína antioncogênica com potencial terapêutico para os casos de câncer onde a resistência a AR é observada. Devido à similaridade entre as estruturas tridimensionais de CRABP2 livre (apo) e ligada a AR (holo), os mecanismos responsáveis por mediar a formação do complexo AR:CRABP2 e a interação da proteína com diferentes parceiros moleculares ainda não foram elucidados. O presente trabalho teve como objetivo a caracterização da interação entre CRABP2 e AR e da dinâmica da proteína na presença e na ausência de ligante, utilizando Ressonância Magnética Nuclear (RMN) como principal ferramenta. Os experimentos de RMN foram coletados em espectrômetros Bruker 600MHz/800MHz/900MHz, a 25 °C e utilizando amostras ^{15}N e/ou ^{13}C -CRABP2 livre ou ligada a AR. A dinâmica rápida e intermediária de CRABP2 livre e na presença de AR foi derivada das taxas de relaxação longitudinal (R_1) e transversal (R_2) do núcleo ^{15}N e do ^{15}N - $\{^1\text{H}\}$ NOE e de experimentos de dispersão de relaxação via ^{15}N -CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill), respectivamente. A interação entre CRABP2 e AR foi investigada pela combinação de experimentos de titulação por RMN, Fluorimetria Diferencial de Varredura (DSF) e Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR). Na presença de ligante, a dinâmica térmica das alças βC - βD e βE - βF de CRABP2 foi suprimida. Além disso, o aumento dos valores de R_2 concomitante a diminuição de R_1 observado para o complexo AR:CRABP2 indicou autoassociação da proteína induzida por AR. A superfície de autoassociação de CRABP2, mapeada por experimentos de titulação por RMN, envolve resíduos localizados na região do portal ($\alpha 1$ -alça- $\alpha 2$ / βC - βD / βE - βF) e nas fitas βI - βA . A superfície de dimerização de holo-CRABP2 em solução foi a mesma observada no dímero cristalográfico do complexo AR:CRABP2 (PDF 2FR3). Um grande número de resíduos de CRABP2 apresentou troca conformacional na escala de μs - ms na ausência de AR. Dezesesseis resíduos constituíram o grupo principal de resíduos em troca conformacional por apresentaram valores de k_{ex} e p_B semelhantes entre si ($k_{ex} = 320 \pm 40\text{s}^{-1}$ / $p_B = 0.2 \pm 0.03$). Os eventos de troca conformacional observados para a proteína livre foram suprimidos com a ligação a AR. Um grupo menor de resíduos apresentou uma flutuação rápida na presença de AR ($k_{ex} > 2000\text{s}^{-1}$ / $p_B \sim 0.05$) que é independente dos eventos de troca conformacional em apo-CRABP2. Apesar de haver sobreposição entre os resíduos que apresentaram CSP na presença e na ausência de AR e resíduos que mostraram dinâmica lenta na proteína livre, esses dois efeitos não puderam ser relacionados de forma estatisticamente relevante, indicando que o estado de maior energia de CRABP2 é estruturalmente distinto do complexo AR:CRABP2. Além disso, os experimentos de SPR utilizados para a caracterização dos parâmetros cinéticos da interação CRABP2:AR mostraram que a ligação do AR a CRABP2, bem como a liberação do AR do sítio de interação ocorrem em tempos de escala não condizentes com a interconversão entre os estados livre e ligado da proteína caracterizados por CPMG, indicando que esta não pode ser a etapa limitante para a ligação/liberação do AR. Os resultados obtidos neste trabalho indicam que o sítio de interação de CRABP2 com AR encontra-se pré-formado e que a interação com o ligante leva a estabilização da superfície de dimerização de holo-CRABP2 e de outras regiões funcionalmente importantes para a interação com parceiros moleculares. Devido à similaridade entre as estruturas de apo e holo-CRABP2, a execução das funções específicas a cada estado de CRABP2 (livre e ligado) nas células deve ser modulada pela entropia conformacional, incluindo a regulação da interação entre a proteína e seus diferentes parceiros moleculares.

ABSTRACT

Retinoic acid (RA), the major vitamin A active metabolite, regulates gene transcription through the activation of its cognate nuclear receptors. Cellular RA-Binding Protein 2 (CRABP2) is a coactivator of the RA-controlled gene expression, translocating RA from the cytoplasm to the nucleus and directly channeling it to Retinoic Acid Receptors (RARs). RARs activation induce the transcription of apoptosis-related and growth inhibition genes, pointing at CRABP2 as anti oncogenic protein and a potential target for therapy of RA-resistant cancers. Due to similarities between free (apo) and RA-bound (holo) CRABP2 tridimensional structures, the mechanisms in charge of RA:CRABP2 complex formation and CRABP2 recognition by its molecular partners remain unknown. The goal of this work was to characterize the interaction between CRABP2 and RA as well as free and RA-bound CRABP2 dynamics using Nuclear Magnetic Resonance (NMR) as the main tool. NMR spectra were collected on ^{15}N and/or ^{13}C -labeled CRABP2 samples at 25 °C on Bruker 600MHz/800MHz/900MHz spectrometers. Fast and slow backbone dynamics of free and RA-bound CRABP2 were derived from ^{15}N longitudinal (R_1), transverse (R_2) relaxation rates and ^{15}N - $\{^1\text{H}\}$ NOE, and ^{15}N Carr-Purcell-Meiboom-Gill relaxation dispersion (CPMG)-based experiments, respectively. The interaction between CRABP2 and RA was characterized by a combination of NMR titration experiments, Differential Scanning Fluorimetry (DSF) and Surface Plasmon Resonance Spectroscopy (SPR). In RA presence, loops βC - βD and βE - βF fast dynamics was quenched. Besides that, the R_2 values increasing associated with the decrease in R_1 values for the AR: CRABP2 complex suggested CRABP2 self-association triggered by RA. Holo-CRABP2 self-association interface mapped by NMR titration experiments concerns residues clustered on the CRABP2 portal region($\alpha 1$ -loop- $\alpha 2$ / βC - βD / βE - βF) and on β -strands βI - βA . Holo-CRABP2 dimerization surface in solution correlates well with the interface mediating RA:CRABP2 self-association in RA:CRABP2 crystallographic dimer structure (PDB 2FR3). Numerous residues of apo-CRABP2 displayed conformational exchange dynamics in the μs -ms time scale. Sixteen residues constituted the core group that showed the most similar fluctuation parameters ($k_{ex} = 320 \pm 40\text{s}^{-1} / p_B = 0.2 \pm 0.03$). Apo-CRABP2 conformational exchange events were suppressed upon RA:CRABP2 complex formation. A smaller subset of residues showing fast exchange fluctuation, which is independent of apo-CRABP2 intermediate timescale dynamics, was identified in holo-CRABP2 ($k_{ex} > 2000\text{s}^{-1} / p_B \sim 0.05$). Even though residues showing CSPs in RA presence and absence agree well with the ones showing intermediate timescale dynamics in apo-CRABP2, both effects could not be correlated in a statistically relevant way, indicating that CRABP2 higher-energy state is structurally distinct from the RA:CRABP2 complex. In addition, SPR experiments used to characterize the kinetic parameters of RA binding to CRABP2 showed that RA-binding to CRABP2 and release from the binding cavity occur in a different timescale than the fluctuation characterized by CPMG and cannot be the rate-limiting step in both cases. Our findings indicate that the RA-binding site is pre-formed and that ligand interaction lead to stabilization of CRABP2 dimerization interface and of other surfaces that mediate protein interaction with different molecular partners. Due to the similarity between apo and holo-CRABP2 tridimensional structures conformational entropy may play a key role in free and RA-bound CRABP2 diverse cellular functions, including protein interaction with different molecular partners.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	VITAMINA A E SEUS METABÓLITOS	17
1.2	ABSORÇÃO E METABOLISMO DE VITAMINA A	18
1.3	SINALIZAÇÃO CELULAR VIA ÁCIDO RETINOICO (AR)	21
1.3.1	Regulação da Transcrição Gênica por AR via RARs e PPARβ/δ	22
1.3.1.1	Receptores Nucleares	22
1.3.1.1.1	Estrutura e Mecanismo de ação	23
1.3.1.2	Elementos de DNA	26
1.3.1.3	Proteínas Intracelulares Ligantes de Lipídeos	26
1.3.1.3.1	Estrutura e Mecanismo de ação	27
1.4	PROTEÍNA CELULAR LIGANTE DE ÁCIDO RETINOICO 2 (CRABP2)	32
1.4.1.	Transativação de RARs	32
1.4.2	Localização subcelular	33
1.4.3	Estrutura e interação com AR	34
1.4.4	Papel na patogênese do câncer	37
2	OBJETIVOS	43
2.1	OBJETIVO PRINCIPAL	43
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
3	MATERIAL E MÉTODOS	44
3.1	MATERIAL	44
3.1.1	Meios de cultura	44
3.1.2	Cepas bacterianas	44
3.1.3	Vetor de expressão	44
3.2	MÉTODOS	46
3.2.1	Produção de CRABP2 recombinante	46
3.2.1.1	Transformação bacteriana	46
3.2.1.2	Expressão heteróloga de CRABP2	46
3.2.1.3	Purificação de CRABP2	46
3.2.1.3.1	Lise bacteriana	46
3.2.1.3.2	Primeira cromatografia de afinidade a níquel	47
3.2.1.3.3	Diálise e clivagem com TEV	47
3.2.1.3.4	Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS PAGE)	48

3.2.1.3.5 Dosagem de proteínas	48
3.2.1.3.6 Segunda cromatografia de afinidade a níquel	48
3.2.1.3.7 Cromatografia de exclusão molecular	49
3.2.1.3.8 Produção do complexo AR:CRABP2.	49
3.2.2 Fluorimetria Diferencial de Varredura (DSF)	50
3.2.3 Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR)	50
3.2.4 Assinalamento sequencial das ressonâncias da cadeia principal de CRABP2 livre e ligada a AR	52
3.2.5 Medida dos parâmetros de relaxação R_1 , R_2 e $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N NOE	53
3.2.6 Análise dos dados de relaxação R_1 , R_2 e $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N NOE	54
3.2.7 Estimativa do tempo de correlação rotacional (τ_c)	55
3.2.8 Dispersão de relaxação via CPMG (^{15}N)	55
3.2.9 Análise dos dados de dispersão de relaxação via CPMG (^{15}N)	57
3.2.10 Medidas de perturbação de deslocamento químico (CSP)	57
3.2.11 Análise das medidas de perturbação de deslocamento químico (CSP)	58
4 RESULTADOS	59
4.1 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE CRABP2	59
4.2 ASSINALAMENTO SEQUENCIAL DAS RESSONÂNCIAS DE CRABP2 LIVRE E DO COMPLEXO AR:CRABP2	62
4.3 PREDIÇÃO DA ESTRUTURA SECUNDÁRIA DE APO E HOLO-CRABP2	67
4.4 CARACTERIZAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE CRABP2 E AR	69
4.5 CARACTERIZAÇÃO DA DINÂMICA RÁPIDA (ps-ns) de CRABP2 LIVRE E DO COMPLEXO AR:CRABP2 POR RMN	74
4.6 INVESTIGAÇÃO DA AUTOASSOCIAÇÃO DE CRABP2 INDUZIDA POR AR	77
4.7 CARACTERIZAÇÃO DA DINÂMICA INTERMEDIÁRIA (μs -ms) de CRABP2 LIVRE E DO COMPLEXO AR:CRABP2 POR RMN	82
5 DISCUSSÃO	96
6 CONCLUSÃO	100
REFERÊNCIAS	91

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química da vitamina A (retinol), retinal, ácido retinoico e 11-cis-retinal.	18
Figura 2: Absorção e metabolismo intestinal e hepático da Vitamina A.	19
Figura 3: Absorção e metabolismo extra-hepático de Vitamina A.	20
Figura 4: Elementos centrais na regulação genômica da transcrição via AR.	22
Figura 5: Estrutura tridimensional de NRs e complexo quaternário com DNA.	25
Figura 6: Estrutura canônica e regiões características de iLBPs.	29
Figura 7: Sítio de ligação anfipático e orientação do ligante em iLBPs.	30
Figura 8: Semelhanças entre as estruturas de apo- e holo-iLBPs.	31
Figura 9: Resíduos que medeiam a interação entre CRABP2 e RARs.	33
Figura 10: NLS de CRABP2.	34
Figura 11: Sítio de interação de CRABP2 com AR (PDB 2FR3).	35
Figura 12: Comparação da conformação das cadeias laterais dos resíduos de CRABP2 envolvidos na interação com AR (A), na interação com RARs (B) e na translocação de CRABP2 para o núcleo (C) na ausência e na presença de AR.	36
Figura 13: Comparação da estrutura cristalográfica e em solução de apo-CRABP2.	37
Figura 14: Papel do AR na tumorigênese através da modulação da ativação das vias CRABP2/RARs e FABP5/PPAR β/δ .	39
Figura 15: Tempo de escala dos eventos proteicos.	40
Figura 16: Representação vetorial dos processos de relaxação longitudinal (painel superior) e transversal (painel inferior) do spin nuclear em função do tempo.	41
Figura 17: Mapa de restrição do vetor de expressão RP1B.	45
Figura 18: Expressão heteróloga de CRABP2.	59
Figura 19: Etapas de Purificação de CRABP2.	61
Figura 20: Espectro 2D ^1H - ^{15}N HSQC de apo-CRABP2 assinalado.	63
Figura 21: Resíduos de apo-CRABP2 não assinalados neste trabalho.	64
Figura 22: Espectro 2D ^1H - ^{15}N HSQC de holo-CRABP2 assinalado.	65
Figura 23: Resíduos de holo-CRABP2 não assinalados neste trabalho.	66
Figura 24: Sobreposição dos espectros 2D [^1H , ^{15}N] HSQC de CRABP2 livre e na presença de DMSO.	67
Figura 25: Predição de estrutura secundária para apo e holo-CRABP2 (Talos N).	68
Figura 26: Perfis de desnaturação e estabilidade térmica de apo e holo-CRABP2 aferidos por DSF.	70

Figura 27: Sensorgrama representativo da caracterização dos parâmetros cinéticos da interação entre CRABP2 e AR por SPR.	71
Figura 28: Sobreposição dos espectros 2D [¹ H, ¹⁵ N] HSQC de apo e holo-CRABP2.	72
Figura 29: Identificação dos resíduos de CRABP2 que medeiam a interação com AR.	73
Figura 30: Dinâmica térmica de CRABP2 na presença e na ausência de AR (900 MHz).	76
Figura 31: Sobreposição dos espectros 2D [¹ H, ¹⁵ N] HSQC adquiridos em concentrações crescentes de holo-CRABP2.	78
Figura 32: Resíduos que medeiam a autoassociação de holo-CRABP2 identificados por CSP.	79
Figura 33: Resíduos que medeiam a autoassociação de holo-CRABP2 identificados por CSP e diminuição da intensidade relativa dos sinais.	80
Figura 34: Resíduos que medeiam a autoassociação de holo-CRABP2 identificados por diminuição da intensidade relativa dos sinais.	81
Figura 35: Taxas de relaxação efetiva $R_{2\text{eff}}$ (s^{-1}) aferidas para apo-CRABP2 no 900 MHz e no 800 MHz a 25°C com frequências de CPMG (ν_{CPMG}) de a 66,7 Hz e 1000 Hz.	83
Figura 36: Dinâmica intermediária de CRABP2 livre.	84
Figura 37: Taxas de relaxação efetiva $R_{2\text{eff}}$ (s^{-1}) aferidas para holo-CRABP2 no 900 MHz e no 800 MHz a 25°C com frequências de CPMG (ν_{CPMG}) de a 66,7 Hz e 1000 Hz.	86
Figura 38: Perfis de dispersão de relaxação observados para Lys8, Lys30, Val76, Thr131 e Tyr134 em apo e holo-CRABP2.	87
Figura 39: Dinâmica intermediária de AR-CRABP2.	89
Figura 40: Perfis de dispersão de relaxação observados para Arg11, Ser12, Thr122, Met123 e Thr124 em apo e holo-CRABP2.	90
Figura 41: Pré-organização da interface de dimerização de CRABP2 mediada pela interação com AR.	92
Figura 42: Espectros 2D [¹ H- ¹⁵ N] de CRABP2 adquiridos em diferentes razões molares AR:CRABP2.	93
Figura 43: Titulação de CRABP2 com AR.	94
Figura 44: Comparação entre os valores de $\Delta\delta$ e $\Delta\omega$ (ppm) obtidos para apo-CRABP2 nos experimentos de CSP e CPMG, respectivamente.	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: iLBPs – perfil de expressão e ligantes.	28
Tabela 2: Massa molecular (kDa) e pI teóricos de CRABP2 antes e após a remoção da cauda Tio ₆ His ₆ TEV	45
Tabela 3: Experimentos de RMN utilizados para o assinalamento sequencial das ressonâncias das cadeias principais de CRABP2 livre e ligada.	52
Tabela 4: Parâmetros cinéticos da interação entre AR e CRABP2.	71
Tabela 5: Valores médios dos parâmetros de relaxação e τ_c obtidos para CRABP2 livre e ligada a AR.	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADHs	<i>medium-chain alcohol dehydrogenases</i>
AR	ácido <i>all-trans</i> retinoico
BCO-I	β -caroteno-15,15'-monooxigenase
BIC	<i>Bayesian Information Criterion</i>
BMRB	<i>Biological Magnetic Resonance Data Bank</i>
BSA	albumina bovina sérica
CPMG	Carr-Purcell-Meiboom-Gill
CRABP	<i>Cellular Retinoic Acid-Binding Protein</i>
CRBP	<i>Cellular Retinol-Binding Protein</i>
CSP	<i>Chemical Shift Perturbation</i>
CYP26	Citocromo P450
DBD	<i>DNA Binding Domain</i>
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DO	Densidade Óptica
DR	<i>Direct Repeats</i>
DSF	<i>Differential Scanning Fluorimetry</i>
DTT	Ditiotreitol
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
FABP	<i>Fatty Acid-Binding Protein</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
HuR	<i>Human Antigen R</i>
iLBPs	<i>Intracellular Lipid-Binding Proteins</i>
IPTG	β -D-tiogalactopiranosídeo
LB	Luria-Bertani
LBD	<i>Ligand Binding Domain</i>
LRAT	<i>lecithin:retinol acyl transferase</i>
mRNA	Messenger RNA
NLS	<i>Nuclear Localization Sig</i>
NOE	<i>Nuclear Overhauser Effect</i>
NRs	<i>Nuclear Receptors</i>
N-terminal	Amino terminal
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PPAR β/δ	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor β/δ</i>
PPER	<i>PPAR Response Element</i>
PSA	persulfato de amônio
RARE	<i>Retinoic Acid-Receptor Element</i>
RARs	<i>Retinoic Acid Receptors</i>
RBP	<i>serum Retinol-Binding Protein</i>
RDH	<i>Retinal dehydrogenase</i>
RE	Retículo Endoplasmático
REH	retinaldeído redutases

REs	retinil ésteres
RXR	<i>Retinoid Receptor X</i>
SDRs	<i>membrane-bound short-chain dehydrogenases/reductases</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
SPR	<i>Surface Plasmon Resonance Spectroscopy</i>
SRC	<i>Steroid Receptor Coactivator</i>
STRA6	<i>stimulated by RA gene 6 – STRA6</i>
TEMED	N,N,N',N' - tetrametiletilenodiamina
TEV	Tobacco Etch Virus

1 INTRODUÇÃO

1.1 VITAMINA A E SEUS METABÓLITOS

A vitamina A, um micronutriente lipofílico essencial à vida, encontra-se envolvida na regulação de uma ampla gama de processos fisiológicos, incluindo reprodução, embriogênese, visão, crescimento, diferenciação celular e função imune (DE LUCA, 1991; DUESTER, 2008; MARK; GHYSELINCK; CHAMBON, 2006; STEPHENSEN, 2001). A desregulação dos níveis de vitamina A, tanto o excesso quanto a deficiência, está relacionada a diferentes patologias. Os casos extremos de deficiência de vitamina A podem levar a cegueira e a morte por infecções severas (CHIU; DILLON; WATSON, 2016). Em contrapartida, o seu excesso pode ser tóxico para diferentes órgãos e tecidos, como o fígado e a pele, além de causar má formações durante o desenvolvimento embrionário (BLOMHOFF; BLOMHOFF, 2006; COLLINS; MAO, 1999; MORRISS-KAY; WARD, 1999).

A execução de diferentes funções pela vitamina A (retinol) é intermediada por seus metabólitos ativos, como o ácido *all-trans* retinoico (AR), o 9-cis-AR e o 11-cis-retinal, coletivamente conhecidos como retinoides de ocorrência natural (NAPOLI, 1996). Os retinoides são compostos por um anel β -ionona, uma cadeia poli-insaturada e um grupamento polar. Os retinóides se distinguem entre si através do estado de oxidação do grupamento polar. O retinol apresenta um grupamento hidroxila, o retinal um grupamento carbonila e o AR um grupamento carboxila (BOLLAG, 1983) (**Figura 1**). Devido à natureza hidrofóbica, seja no meio extra ou intracelular, os retinoides estão presentes em gotículas lipídicas ou encontram-se associados a diferentes proteínas específicas ligantes de retinoides (NAPOLI, 2016).

Os retinoides realizam suas diferentes funções fisiológicas através de três mecanismos principais: 1) 11-cis-retinal (rodopsina) atua como um cromóforo para o processo visual (PALCZEWSKI, 2012; WALD, 1968); 2) AR e seus metabólitos participam da regulação da expressão através da ativação de receptores nucleares (MENOZZI et al., 2017); 3) AR executa funções extranucleares não-genômicas (WEI, 2016).

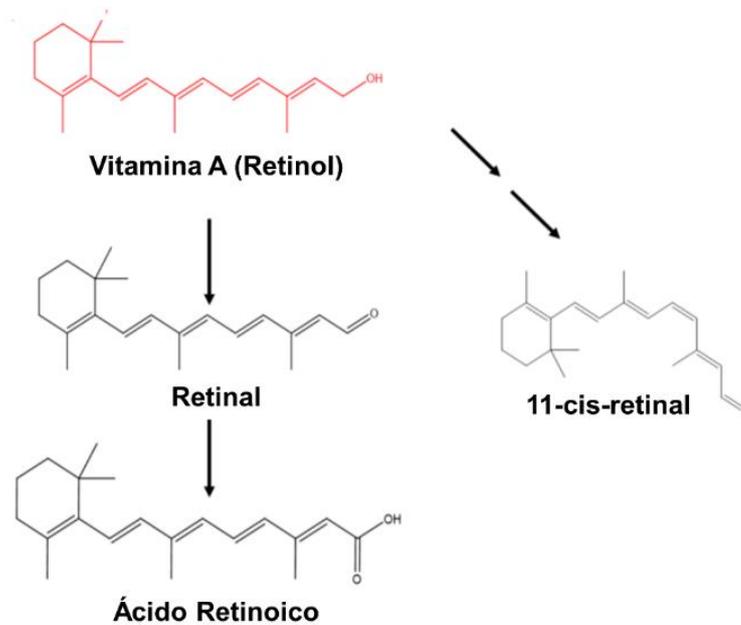


Figura 1: Estrutura química da vitamina A (retinol), retinal, ácido retinoico e 11-cis-retinal.

1.2 ABSORÇÃO E METABOLISMO DE VITAMINA A

Os seres humanos não são capazes de produzir vitamina A e, portanto, obtêm seus precursores a partir da dieta. Os carotenoides, principalmente o β -caroteno, são precursores de vitamina A que podem ser obtidos de fontes vegetais. Já a vitamina A pré-formada, na forma de retinil ésteres (REs) e retinol, pode ser obtida de fontes animais (OLSON, 2009).

Os carotenoides são absorvidos pelos enterócitos e convertidos a retinal pela β -caroteno-15,15'-monooxigenase (BCO-I) (DEVERY; MILBORROW, 1994). O retinal produzido é convertido a retinol pela ação de retinaldeído redutases (REH) (LI; TSO, 2003). Já os REs são hidrolisados a retinol no lúmen intestinal por lipases associadas a membrana dos enterócitos, sendo subsequentemente internalizados por essas células (HARRISON, 1993). Nos enterócitos, o retinol é encontrado em complexo com a Proteína Celular Ligante de Retinol 2 (*Cellular Retinol-Binding Protein 2 -CRBP2*). Outras CRBPs, que também se ligam a retinol, são encontradas em tecidos específicos (ALBALAT, 2009).

A maior parte do retinol absorvido pelos enterócitos é re-esterificado a retinil ésteres, principalmente a palmitato (BLOMHOFF; BLOMHOFF, 2006). CRBP2 é responsável por entregar retinol a enzima lecitina:retinol acil transferase (*lecithin:retinol acyl transferase -LRAT*) para esterificação (HERR; ONG, 1992). Os REs formados são incorporados aos quilomícrons, secretados na linfa e, posteriormente, direcionados para a circulação geral

(BLOMHOFF et al., 1982, 1990). Uma porção significativa de retinol não esterificado é liberado na circulação porta-hepática (HARRISON, 2005). Remanescentes de quilomícrons contendo REs são encontrados na circulação geral e transportados para os tecidos-alvo ou para o fígado (PAIK et al., 2004).

A maior fração dos quilomícrons que contêm REs é absorvida pelas células hepáticas e os REs são novamente hidrolisados a retinol nos hepatócitos. O retinol formado pode ser re-esterificado por ação da LRAT e estocado nas células estreladas hepáticas ou secretado na circulação em complexo com a Proteína Ligante de Retinol (*serum Retinol-Binding Protein - RBP*) para os diferentes tecidos onde atua (GOTTESMAN; QUADRO; BLANER, 2001; ZANOTTI; BERNI, 2004). Em mamíferos, em torno de 50-80% do estoque de Vitamina A está presente nas células estreladas hepáticas (SENOO, 2004). Mais de 95% da vitamina A presente nessas células é encontrada na forma de REs e armazenada em gotículas lipídicas no citoplasma (SENOO, 2004). REs também são armazenados em células extra-hepáticas sob a forma de gotículas lipídicas, o que pode ser importante para o suprimento de tecidos com alta demanda de retinol (BLOMHOFF; BLOMHOFF, 2006) (**Figura 2**).

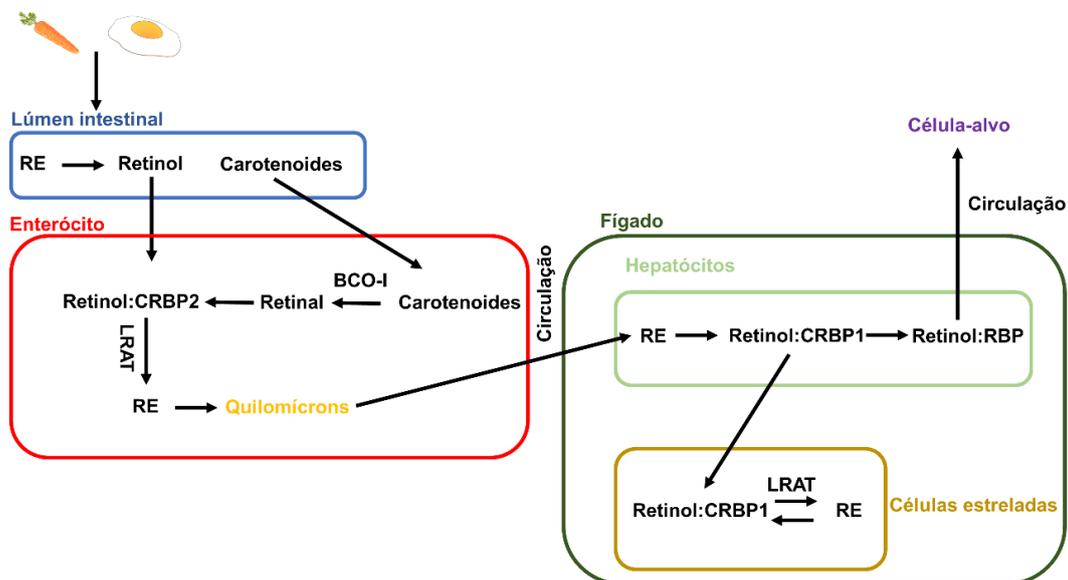


Figura 2: Absorção e metabolismo intestinal e hepático da Vitamina A.

A absorção de retinol:RBP por células-alvo é mediada pela proteína transmembrana STRA6 (*stimulated by RA gene 6 – STRA6*), que atua como um receptor de alta afinidade para RBP na superfície celular (KAWAGUCHI et al., 2007). O retinol absorvido pode ser convertido nos diferentes metabólitos ativos da vitamina A ou pode ser estocado em gotículas lipídicas (THEODOSIOU; LAUDET; SCHUBERT, 2010). O AR é o principal metabólito ativo da

vitamina A e pode ser produzido em duas etapas a partir do retinol: 1) reversivelmente convertido a retinal por duas retinol-desidrogenases: álcool desidrogenase de cadeia curta (*medium-chain alcohol dehydrogenases* - ADHs) e desidrogenases/reduzases de cadeia média (*membrane-bound short-chain dehydrogenases/reductase* - SDRs) (PARÉS et al., 2008); 2) irreversivelmente convertido a AR por retinal desidrogenases (*Retinal dehydrogenase* - RALDH) - RALDH1, 2, 3 e 4 (DUESTER, 2008).

Após a sua síntese, o AR pode ser translocado para o núcleo das células em associação com a Proteína Celular Ligante de AR 2 (*Cellular Retinoic Acid-Binding Protein* – CRABP2) e a Proteína Ligante de Ácido Graxo 5 (*Fatty Acid-Binding Protein 5* – FABP5) (WOLF, 2000; DONOVAN et al., 1995) e induzir a transcrição de genes específicos via ativação dos Receptores de AR (*Retinoic Acid Receptors* - RARs) e dos Receptores Ativados por Proliferador de Peroxissoma β/δ (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor β/δ* – PPAR β/δ) (SCHUG et al., 2007; SHAW; ELHOLM; NOY, 2003a), respectivamente. Além disso, o AR pode ser transportado para células-alvo vizinhas onde irá atuar (THEODOSIOU; LAUDET; SCHUBERT, 2010). Devido a sua capacidade de ativar a expressão de genes envolvidos em uma ampla gama de processos fisiológicos, o nível de AR nas células é finamente regulado. O excesso de AR é eliminado através da sua conversão em compostos polares, como 4-OH-AR, 4-oxo-AR e 18-OH-AR, por enzimas Citocromo P450 (CYP26s) presentes na membrana do retículo endoplasmático - CYP26A1, CYP26B1 e CYP26C1 (PETKOVICH, 2001). *In vitro*, as proteínas CRABP1 e CRABP2 regulam a concentração de AR via CYP26B1 (NELSON et al., 2016) (**Figura 3**).

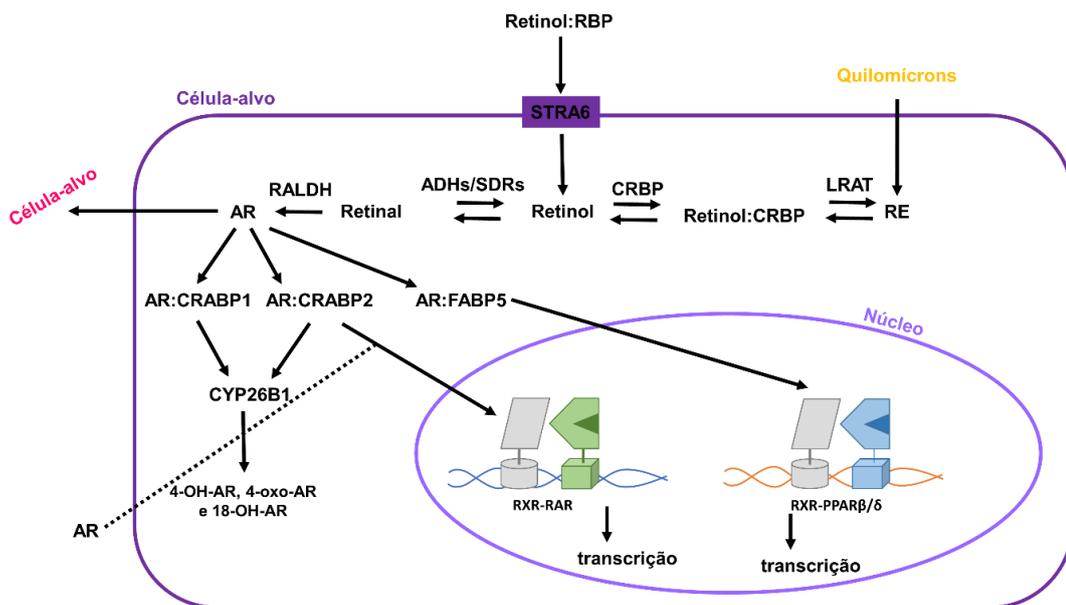


Figura 3: Absorção e metabolismo extra-hepático de Vitamina A.

1.3 SINALIZAÇÃO CELULAR VIA ÁCIDO RETINOICO (AR)

A ação do AR é análoga a de hormônios esteroides, como estrógenos, progestógenos e glicocorticoides, que usualmente atuam através da inibição/ativação da transcrição gênica (ROSS; TERNUS, 1993). Assim como o AR, essas moléculas são transportadas na circulação sanguínea em associação com proteínas ligantes de hormônios, são capazes de se difundir através da membrana plasmática e interagir com seus receptores intracelulares (BRINKMANN, 1994). A sinalização via AR pode ocorrer de duas maneiras: 1) Parácrina- o AR presente no citoplasma é liberado na circulação e captado por uma célula vizinha; 2) Autócrina- o AR é translocado para o núcleo da célula e ativa a transcrição de genes responsivos a AR (BUDHU; NOY, 2002; ROSS; TERNUS, 1993).

A via clássica de regulação da transcrição gênica por AR é mediada pela ativação de RARs (RAR α , RAR β e RAR γ) na presença de ligante (GERMAIN et al., 2006). Porém, na última década, descobriu-se que o AR controla diversos processos biológicos de maneira independente de RARs. Além de RARs, o AR pode atuar como agonista de PPAR β/δ (BERRY; NOY, 2007; SHAW; ELHOLM; NOY, 2003b). RARs e PPAR β/δ regulam a expressão de genes distintos e, conseqüentemente, a resposta das células ao AR é dependente da via que é ativada ou da via predominante (NOY, 2016). RARs e PPAR β/δ são amplamente distribuídos nos tecidos de vertebrados, inclusive nas mesmas células, sugerindo que existe um mecanismo responsável por controlar o particionamento de AR entre os diferentes receptores. A biodisponibilidade de AR para os diferentes receptores é controlada por CRABP2 e FABP5. Enquanto CRABP2 apresenta alta afinidade por AR (subnanomolar) e o entrega aos RARs, FABP5 possui menor afinidade por AR (nanomolar) e o entrega aos PPAR β/δ . Sendo assim, os níveis relativos de CRABP2 e FABP5 são determinantes do efeito causado pelo AR nas células (MANOR et al., 2003; SCHUG et al., 2008a).

Além dos efeitos genômicos do AR, ações extranucleares não-genômicas já foram descritas para essa molécula. No citoplasma, o AR está envolvido na ativação de diferentes cascatas de sinalização capazes de modular a expressão tanto de genes responsivos a AR quanto de genes não responsivos a essa molécula que podem ou não estar sob o controle direto de seus receptores nucleares cognatos. O AR regula a expressão de diferentes genes via metilação de DNA, modificação de histonas e fosforilação de proteínas coativadoras/corepressoras da expressão gênica (AL TANOURY; PISKUNOV; ROCHETTE-EGLY, 2013; BAR-EL DADON; REIFEN, 2017).

1.3.1 Regulação da Transcrição Gênica por AR via RARs e PPAR β/δ

A ação genômica do AR é responsável pela regulação da transcrição de mais de 532 genes envolvidos no controle da proliferação, da diferenciação e da manutenção da morfogênese em diferentes linhagens celulares (BALMER; BLOMHOFF, 2002). Os elementos centrais das vias que medeiam os efeitos genômicos do AR nas células são os receptores nucleares cognatos, as sequências de DNA específicas presentes na região promotora dos genes responsivos a AR e as proteínas carreadoras de AR que realizam a sua entrega no núcleo (THEODOSIOU; LAUDET; SCHUBERT, 2010) (**Figura 4**).

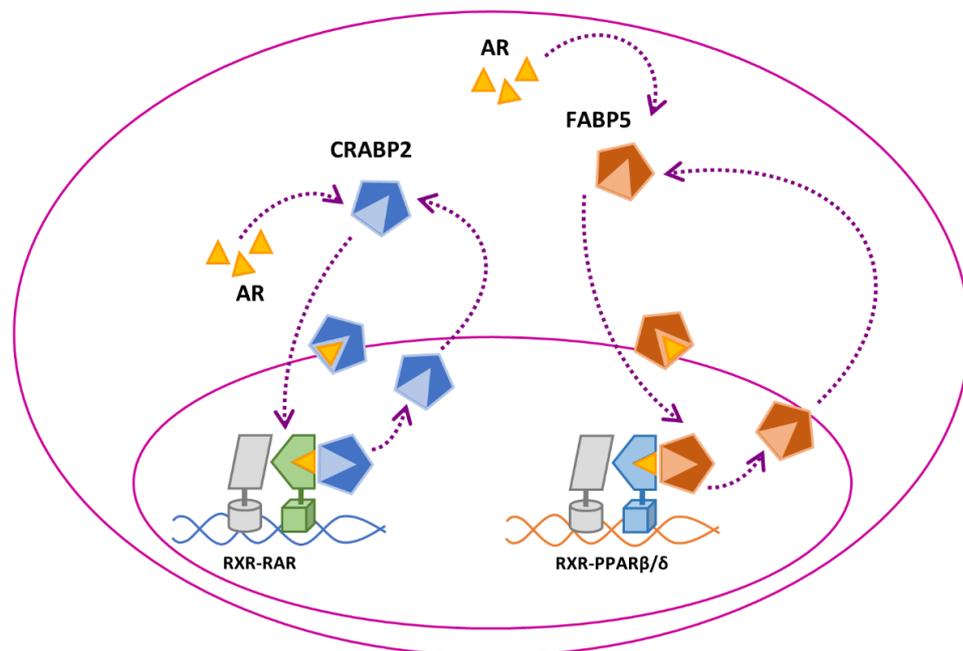


Figura 4: Elementos centrais na regulação genômica da transcrição via AR. Na presença de AR, CRABP2 e FABP5 são translocadas para o núcleo das células onde entregam AR a RARs e PPAR β/δ , respectivamente. A ativação de RARs e PPAR β/δ leva a transcrição de genes que apresentam elementos de DNA específicos e são responsivos a AR. CRABP2 e FABP5 livres são rapidamente redirecionadas ao citoplasma.

1.3.1.1 Receptores Nucleares

Os receptores nucleares (*Nuclear Receptors* - NRs) são fatores de transcrição ativados pela interação com ligantes cognatos. A ativação dos NRs pode tanto reprimir quanto ativar a transcrição de genes-alvo (DELFOSSÉ et al., 2015). Os NRs controlam múltiplos processos biológicos, como desenvolvimento, metabolismo, função imune e reprodução (BOOKOUT et al., 2006; DELFOSSÉ et al., 2015). Dos quarenta e oito receptores nucleares identificados até o momento no genoma humano, aproximadamente metade se liga a esteroides endócrinos (progesterona, andrógenos e estrógenos), vitaminas lipossolúveis A e D, ácidos graxos, ácidos

biliares, dentre outros (BOOKOUT et al., 2006; GRONEMEYER; GUSTAFSSON; LAUDET, 2004). A outra metade é constituída por receptores órfãos, cujos ligantes, genes-alvo e funções fisiológicas ainda são desconhecidos. Os NRs são utilizados como alvos terapêuticos pela indústria farmacêutica para o desenvolvimento de fármacos contra diferentes patologias, como o câncer de mama, *diabetes mellitus* tipo 2, infertilidade e doenças inflamatórias (GRONEMEYER; GUSTAFSSON; LAUDET, 2004).

1.3.1.1.1 Estrutura e Mecanismo de ação

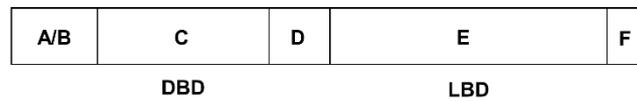
O AR atua como agonista de duas classes de NRs: RARs – (RAR α , RAR β e RAR γ) e PPAR β/δ (SCHUG et al., 2007; SHAW; ELHOLM; NOY, 2003a). RARs e PPAR β/δ apresentam a arquitetura modular canônica dessa família de receptores, sendo constituídos por seis domínios – A, B, C, D, E e F. Os domínios N-terminais A/B estão relacionados a interações com coativadores que são independentes de ligante. O domínio C constitui o domínio de ligação a DNA (*DNA Binding Domain - DBD*) e está envolvido na interação desses fatores de transcrição com elementos de DNA específicos. O domínio D conecta o domínio de ligação a DNA ao domínio de interação com o ligante e usualmente contém os resíduos responsáveis pela localização nuclear dos receptores. O domínio E é o domínio de interação com o ligante (*Ligand Binding Domain - LBD*). A superfície principal que medeia a dimerização de NRs e as regiões envolvidas na interação com ativadores/repressores estão presentes no LBD. O domínio F apresenta tamanho variável e a sua função ainda não é totalmente conhecida (**Figura 5A**). O DBD e o LBD são altamente conservados entre os membros da família, enquanto os domínios A/B e F são bastante variáveis (CHAWLA et al., 2001; RASTINEJAD et al., 2013).

Os NRs podem se ligar aos seus DNAs-alvo como homodímeros (Classes I e III), heterodímeros (Classe II) ou monômeros (Classe IV) (ARANDA; PASCUAL, 2001). RARs e PPAR β/δ pertencem a classe II e formam heterodímeros com um parceiro em comum, o Receptor de Retinoide X (*Retinoid Receptor X - RXR*) (LEID; KASTNER; CHAMBON, 1992) (**Figura 5B**). A regulação da transcrição gênica mediada por NRs é controlada por uma rede complexa e dinâmica de interações entre esses receptores e múltiplos complexos coativadores/corepressores. Na ausência de ligante, os heterodímeros RAR:RXR e PPAR β/δ :RXR encontram-se associados tanto aos seus DNAs-alvo quanto a complexos corepressores, que garantem a compactação da cromatina e inibem a transcrição gênica (RASTINEJAD et al., 2013).

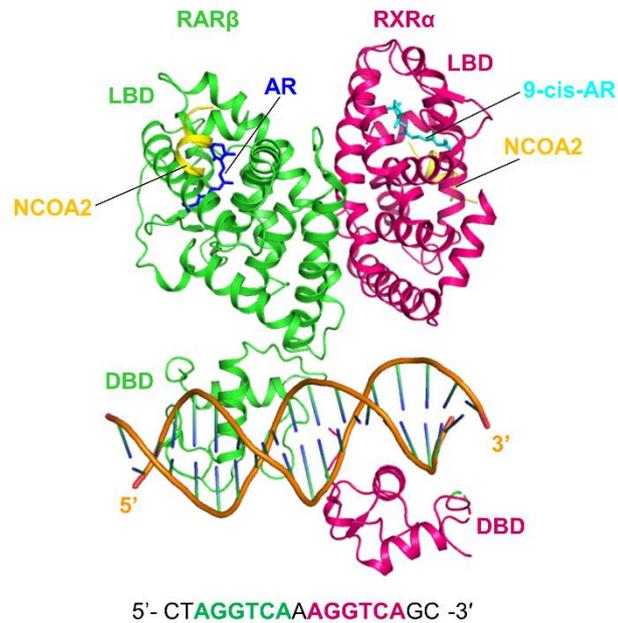
Enquanto RARs apresentam alta afinidade e seletividade a AR (subnanomolar), PPAR β/δ se liga a AR com menor afinidade (nanomolar) e também pode ser ativado por diferentes moléculas derivadas de ácidos graxos (DESVERGNE; WAHLI, 1999; LANGE et al., 2008; LIN et al., 1999; SHAW; ELHOLM; NOY, 2003b). A interação entre os NRs e seus ligantes cognatos induz mudanças conformacionais em seus LBDs, modulando a sua preferência de interação com coativadores ou corepressores. Os LBDs são formados por 12 hélices (H1-H12) e por uma pequena folha- β , que conecta as hélices H5 e H6 (**Figura 5C**). Quando em complexo com seus ligantes cognatos (holo-NRs), a hélice H12 se move em direção ao sítio de interação com o ligante formando uma “tampa”. A mudança conformacional da hélice H12 na presença de ligante favorece contatos hidrofóbicos com as hélices H3 e H4. A superfície formada entre as três hélices é utilizada para a interação com coativadores, incluindo membros da família de coativadores de receptores de esteroides (*Steroid Receptor Coactivator - SRC*) (**Figura 5C**). A ligação de coativadores aos holo-NRs inicia a formação dos complexos de transcrição, tendo efeito positivo na regulação da expressão gênica controlada por RARs e PPAR β/δ (CHANDRA et al., 2017; EBERHARDT et al., 2019; NAGY; SCHWABE, 2004). O término da transcrição pode ser sinalizado pela ubiquitinação dos holo-NRs e consequente degradação pelo proteassoma (AL TANOURY; PISKUNOV; ROCHETTE-EGLY, 2013).

A ligação de AR a RARs e PPAR β/δ ativa a transcrição de genes envolvidos em processos como embriogênese, crescimento celular, diferenciação e apoptose (LEID; KASTNER; CHAMBON, 1992). Como a modulação da expressão gênica mediada por RARs e PPAR β/δ têm efeito direto na diferenciação e crescimento celulares, moléculas sintéticas capazes de se ligar a esses receptores e regular a sua ação foram desenvolvidas para o tratamento de diferentes tipos de câncer (leucemia promielocítica, linfoma cutâneo de células T, síndrome mielodisplásica e carcinoma de células escamosas) e doenças inflamatórias (acne severa e psoríase) (ALTUCCI et al., 2007; HUANG; CHANDRA; RASTINEJAD, 2014).

A



B



C

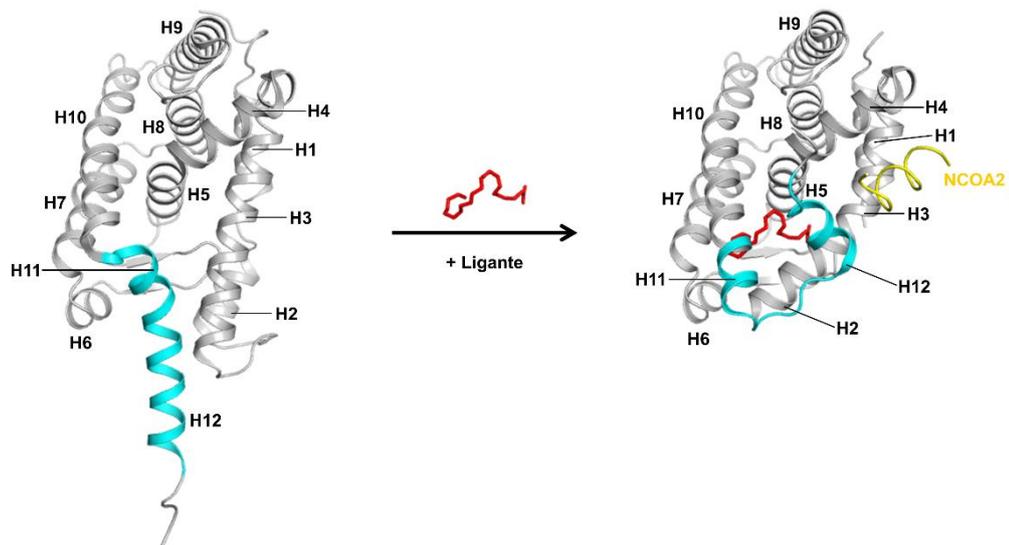


Figura 5: Estrutura tridimensional de NRs e complexo quaternário com DNA. (A) Estrutura modular canônica de NRs. Os domínios C e E são os domínios de ligação a DNA (DBD) e a ligante (LBD), respectivamente. (B) Estrutura cristalográfica do complexo RAR β -RXR α -DNA (PDB 5UAN). O complexo é composto por: RAR β (verde), RXR α (rosa), peptídeo coativador NCOA2 (amarelo), AR (azul), 9-cis-AR (ciano) e DNA-alvo (laranja). Os sítios reconhecidos pelos DBDs de RXR α e RXR α estão destacadas na em rosa e verde, respectivamente, na sequência do DNA-alvo. (C) Estruturas cristalográficas de RXR α livre (esquerda) (PDB 6HN6) e ligado a ácido docosa-hexaenóico (direita) (PDB 1MV9). A hélice H12, que é a mais afetada pela interação com o ligante, está destacada em ciano. O peptídeo coativador NCOA2 e o ácido docosa-hexaenóico estão representados em amarelo e vermelho, respectivamente.

1.3.1.2 Elementos de DNA

Apesar de ambos os receptores dimerizarem com RXRs, RARs e PPAR β/δ induzem a expressão de genes distintos. Enquanto o complexo RAR:RXR ativa a transcrição de genes que contêm o Elemento do Receptor de Ácido Retinoico (*Retinoic Acid-Receptor Element – RARE*) (WOLF, 2000), os genes-alvo do dímero PPAR β/δ :RXR apresentam Elementos Responsivos a PPAR (*PPAR Response Element - PPER*) (JUGE-AUBRY et al., 1997). Os RAREs são formados por duas repetições diretas (*Direct Repeats - DRs*) da sequência consenso de seis nucleotídeos 5'-(A/G)G(G/T)TCA-3'. As repetições dessas sequências podem estar dispostas em *tandem* (DR0) ou estar separadas por até 8 nucleotídeos (DR1-DR8) (WOLF, 2000). Os PPERs são formados por um elemento central DR1 e também podem apresentar uma região adicional localizada anteriormente a DR1 (JUGE-AUBRY et al., 1997).

Tanto RARs quanto PPAR β/δ estão envolvidos na ativação da transcrição de genes que controlam o crescimento celular. Porém, os genes regulados pelos diferentes NRs apresentam efeitos opostos. Os genes cuja transcrição é ativada por RARs inibem o crescimento celular, induzindo a diferenciação, a parada do ciclo celular e a apoptose (WANG et al., 2006). De maneira contrária, a ativação de PPAR β/δ resulta na transcrição de genes que promovem a sobrevivência e a proliferação celular (SCHUG et al., 2007; WANG et al., 2006). Compostos sintéticos capazes de ativar seletivamente RARs são utilizados no tratamento de diferentes patologias, incluindo câncer e doenças dermatológicas (ALTUCCI et al., 2007; SOPRANO; QIN; SOPRANO, 2004).

Sendo assim, devido a ativação tanto de RARs quanto de PPAR β/δ , a regulação da transcrição gênica via AR pode ter efeitos contrários nas células. A predominância de uma via em detrimento da outra é primariamente controlada pelas proteínas responsáveis por transportar o AR para o núcleo e realizar a sua entrega aos seus receptores cognatos (NOY, 2016).

1.3.1.3 Proteínas Intracelulares Ligantes de Lipídeos

As Proteínas Intracelulares Ligantes de Lipídeos (*Intracellular Lipid-Binding Proteins - iLBPs*) são pequenas proteínas citosólicas (aproximadamente 15 kDa) capazes de se ligar com alta afinidade, de maneira não-covalente e reversível, a diferentes compostos hidrofóbicos (NOY, 2007; SMATHERS; PETERSEN, 2011). A função primária das iLBPs é a de chaperona de moléculas hidrofóbicas. Porém, além de atuarem solubilizando seus ligantes hidrofóbicos em ambiente aquoso e impedindo a degradação/isomerização inespecífica dessas moléculas, as iLBPs também estão envolvidas na regulação da atividade biológica de seus ligantes nas células

(GLATZ, 2015). As iLBPs incluem as Proteínas Celulares Ligantes de Retinol (CRBPs), as Proteínas Celulares Ligantes de Ácido Retinoico (CRABPs) e as Proteínas Celulares Ligantes de Ácidos Graxos (FABPs) (VOGEL HERTZEL; BERNLOHR, 2000). As diferentes isoformas das iLBPs, o seu perfil de expressão e os seus ligantes cognatos estão resumidos na **Tabela 1**.

As CRBPs se ligam a retinal e retinol com afinidade de nanomolar e são responsáveis por entregá-los a enzimas específicas que catalisam a formação de retinil ésteres ou AR (THEODOSIOU; LAUDET; SCHUBERT, 2010). As FABPs se ligam a diferentes moléculas hidrofóbicas e realizam funções variadas nas células como modulação da atividade de enzimas envolvidas no metabolismo de ácidos graxos, captação de ácidos graxos da membrana, transporte dos ligantes entre os compartimentos celulares e ativação de PPAR β/δ (SMATHERS; PETERSEN, 2011; VOGEL HERTZEL; BERNLOHR, 2000). CRABPs interagem com AR com afinidade de subnanomolar, desempenhando um importante papel no controle dos níveis dessa molécula nas células e na ativação de RARs, por exemplo (NELSON et al., 2016; WOLF, 2000). A interação entre CRABP2 e FABP5 com AR resulta na sua translocação para o núcleo e na ativação da transcrição gênica modulada por AR (SCHUG et al., 2007; SHAW; ELHOLM; NOY, 2003a).

1.3.1.3.1 Estrutura e Mecanismo de ação

Apesar da baixa similaridade de sequência primária (~20%), as iLBPs apresentam estruturas tridimensionais conservadas (YOUNG et al., 1994). A estrutura canônica das iLBPs consiste em um domínio N-terminal hélice-alça-hélice ($\alpha 1$ -alça- $\alpha 2$) e um barril- β (βA - βJ). O barril- β é formado por duas folhas- β antiparalelas, com 5 fitas- β cada (βA - βE e βF - βJ), que são praticamente ortogonais entre si, constituindo uma cavidade grande e preenchida por solvente que contém o sítio de interação com o ligante (KLEYWEGT et al., 1994). Oito das nove alças que conectam as fitas- β são pequenas voltas reversas, entretanto as fitas A e B são conectadas pelo motivo hélice-alça-hélice (**Figura 6A**). A região formada pelo domínio hélice-alça-hélice e pelas alças βC - βD e βE - βF é conhecida como a região do portal das iLBPs (**Figura 6B**). Nesta família de proteínas, as fitas βD e βE não são conectadas por ligações hidrogênio entre os átomos das suas cadeias principais, formando a região do *gap* (**Figura 6C**). Tanto o portal quanto o *gap* já foram previamente relacionados a entrada e saída dos ligantes da cavidade que contém o sítio de interação (AALTEN et al., 1995).

Tabela 1: iLBPs – perfil de expressão e ligantes. Adaptado de VOGEL HERTZEL; BERNLOHR, 2000.

iLBP	Expressão	Ligante(s)
FABP1	Fígado, intestino, pâncreas, rins, estômago, pulmões	Oleato, bilirrubina, etc
FABP2	Intestino, fígado	Ácidos graxos de cadeia longa
FABP3	Músculo cardíaco/esquelético, rins, pulmões, estômago, testículos, adrenal, glândulas mamárias, placenta, ovários, tecido adiposo marrom	Palmitato, oleato, ácido araquidônico, etc
FABP4	Adipócitos, macrófagos, células dendríticas, fibras musculares esqueléticas	Ácidos graxos de cadeia longa
FABP5	Pele, língua, adipócitos, macrófagos, células dendríticas, glândulas mamárias, cérebro, estômago, intestino, rins, fígado, pulmões, coração, músculo esquelético, testículos, retina, baço, placenta	Ácido esteárico, <i>all-trans</i> AR, ácido araquidônico
FABP6	Íleo, ovários, adrenais, estômago	Ácidos biliares
FABP7	Cérebro, sistema nervoso central, células da glia, retina, glândulas mamárias	Oleato, ácido araquidônico
FABP8	Sistema nervoso periférico, células de Schwann	Ácidos graxos de cadeia longa
FABP9	Testículos, glândulas salivares, glândulas mamárias	Ácidos graxos de cadeia longa
FABP12	Retina, testículos	
CRABP1	ubíqua	AR
CRABP2	Pele, adipócitos, glândulas mamárias, testículos, plexo coroide	
CRBP1	Fígado, rins, pulmões, órgãos reprodutores, plexo coroide, epitélio pigmentar da retina	Retinol, Retinal
CRBP2	Intestino delgado	
CRBP3	Coração, músculos esqueléticos	

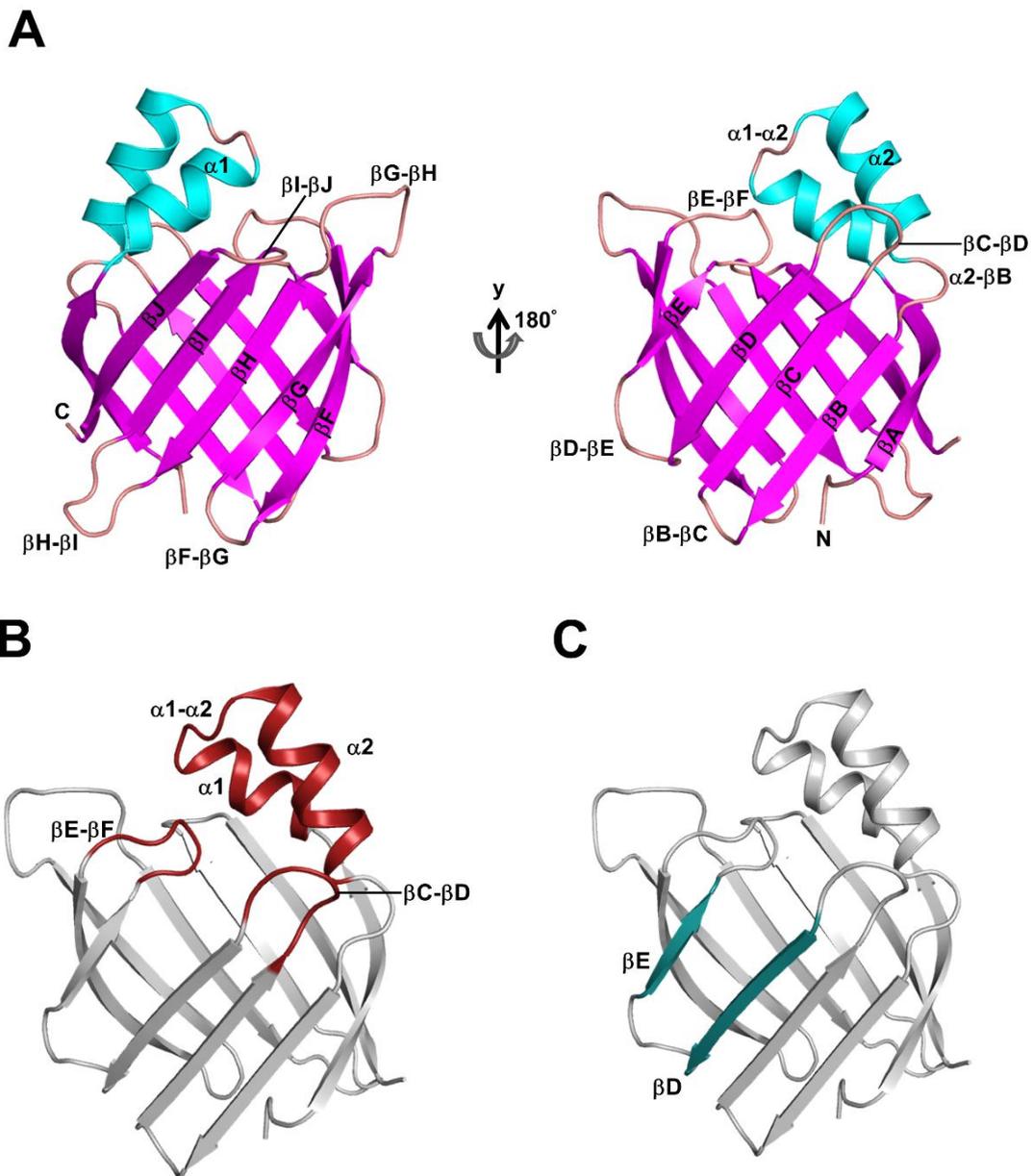


Figura 6: Estrutura canônica e regiões características de iLBPs. (A) Estrutura cristalográfica de CRABP2 livre (PDB 2FR6) como representativa da estrutura canônica de iLBPs. As α -hélices estão representadas em ciano, as folhas- β em magenta e as alças em bege. A região C-terminal (C), a hélice $\alpha 1$, as fitas $\beta I-\beta J$ e as alças $\beta F-\beta G$, $\beta G-\beta H$, $\beta H-\beta I$ e $\beta I-\beta J$ estão indicados na estrutura de apo-CRABP2. A figura da direita está girada de 180° em y em relação da esquerda. A região N-terminal (N), a hélice $\alpha 2$, as fitas $\beta A-\beta E$ e as alças $\alpha 1-\alpha 2$, $\alpha 2-\beta B$, $\beta B-\beta C$, $\beta C-\beta D$, $\beta D-\beta E$ e $\beta E-\beta F$ estão identificadas na estrutura da proteína. (B) A região do portal das iLBPs ($\alpha 1$ -alça- $\alpha 2$ e pelas alças $\beta C-\beta D$ e $\beta E-\beta F$) está destacada em vermelho na estrutura cristalográfica de CRABP2 livre (PDB 2FR6). (C) A região do gap das iLBPs (fitas βD e βE) está destacada em verde na estrutura cristalográfica de CRABP2 livre (PDB 2FR6).

A cavidade que contém o sítio de ligação em iLBPs apresenta um volume cerca de 3 vezes maior que o próprio ligante e, tipicamente, apenas uma molécula de ligante é encontrada na cavidade. O sítio de ligação é formado por uma superfície anfipática, com resíduos polares localizados mais internamente e resíduos hidrofóbicos presentes na região do portal

(THOMPSON; BRATT; BANASZAK, 1995). A cabeça polar dos ligantes está localizada mais internamente na cavidade, enquanto a região do portal interage com a porção apolar (KLEYWEGT et al., 1994) (**Figura 7**).

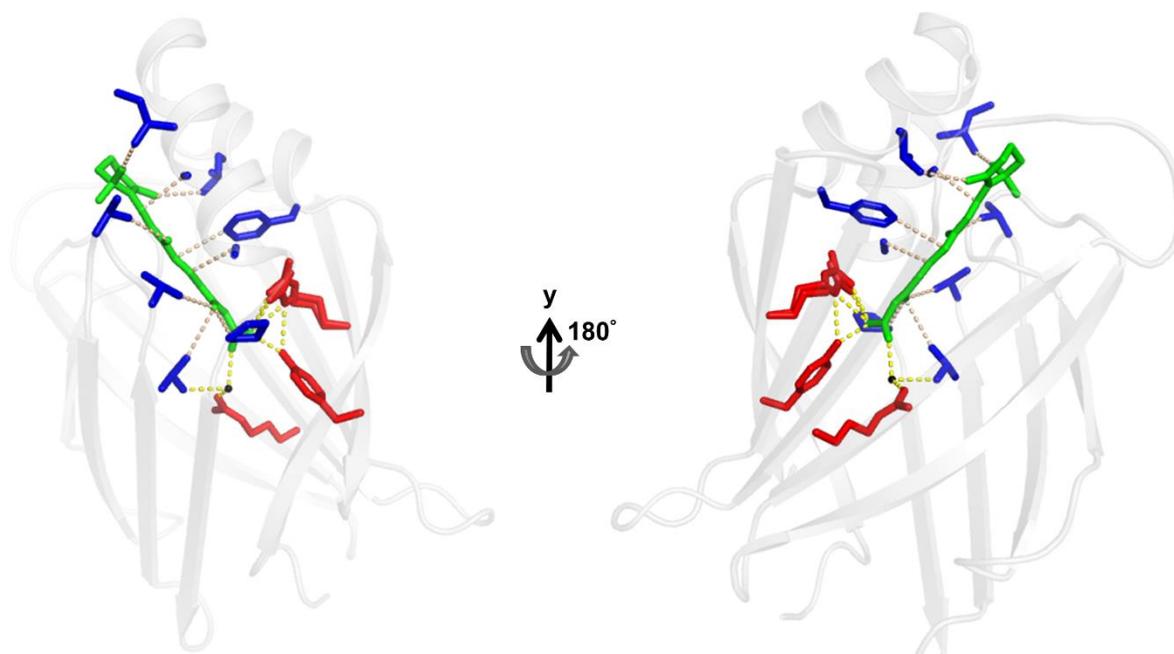


Figura 7: Sítio de ligação anfipático e orientação do ligante em iLBPs. Os resíduos de CRABP2 que realizam contato direto com AR estão mapeados na estrutura cristalográfica de holo-CRABP2 (2FR3). As cadeias laterais dos resíduos envolvidos em contatos hidrofóbicos com a porção apolar do AR, localizados na região do portal, estão coloridas em azul. As interações hidrofóbicas estão representadas por linhas pontilhadas na cor bege. As cadeias laterais dos resíduos que interagem com a porção polar do AR via ligação de hidrogênio, localizados mais internamente na cavidade, estão representadas em vermelho. As ligações de hidrogênio estão representadas por linhas pontilhadas amarelas. A molécula de água responsável por mediar a interação do AR com Arg111 e Thr54 está representada por uma esfera preta. AR está representado em verde.

Uma rede ordenada de moléculas de água e mantida por ligações hidrogênio com cadeias laterais de resíduos polares e com outras moléculas de água também é observada no interior da cavidade dessa família de proteínas (BANASZAK et al., 1994). Com a formação do complexo ligante:proteína, as moléculas de água são deslocadas para o fundo da cavidade, formando uma rede de ligações hidrogênio muito mais compacta e menos dinâmica do que a verificada na forma livre (BANASZAK et al., 1994; CHEN et al., 1998). A principal função atribuída a essa rede de águas é a estabilização da cavidade de iLBPs na ausência de ligante e a participação no processo de enovelamento dessas proteínas (LÜCKE et al., 2002).

A extensa interação entre iLBPs e seus ligantes e a compactação da rede de águas proveniente da formação do complexo ligante:iLBP resulta no aumento da estabilidade da forma ligada dessas proteínas, sendo a região do portal a mais afetada. A estabilização da região

do portal na presença do ligante foi comprovada por estudos de proteólise limitada e pelo aumento da densidade eletrônica dessa região nas estruturas cristalográficas de holo-iLBPs (JAMISON; NEWCOMER; ONG, 1994). Apesar da maior estabilidade na presença de ligante, a comparação das estruturas tridimensionais de diferentes iLBPs livre e ligada não mostra diferenças significativas e, sendo assim, o mecanismo de captação e liberação de ligante pelas proteínas dessa família ainda não é completamente entendido (**Figura 8**).

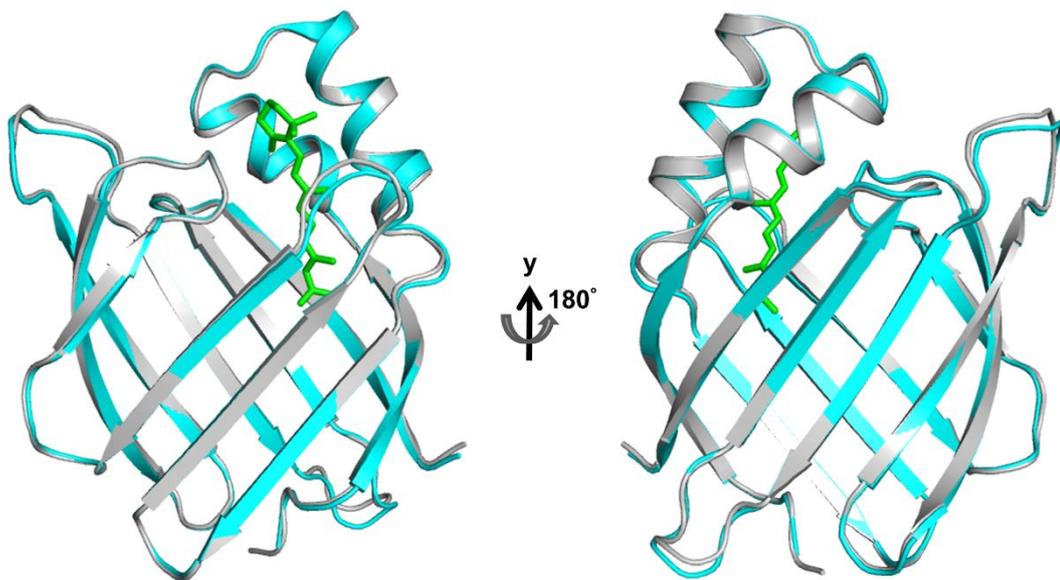


Figura 8: Semelhanças entre as estruturas de apo- e holo-iLBPs. Sobreposição das estruturas cristalográficas de CRABP2 livre (PDB 2FS6) (ciano) e ligada a AR (2FR3) (cinza). O AR está representado em verde.

Como a região do portal é localmente desordenada e flexível, devido a desestabilização das interações entre os segmentos que o formam, em algumas iLBPs, foi sugerido que a entrada do ligante na cavidade de interação estaria correlacionada a transições ordem-desordem na proteína livre. Na hipótese do “portal dinâmico”, as iLBPs apresentam uma conformação aberta na ausência de ligante e fechada na presença de ligante. As transições ordem-desordem seriam suprimidas em holo-iLBPs, através de uma série de interações adicionais observadas na presença do ligante, deslocando o equilíbrio na direção do estado ordenado/fechado. A liberação do ligante deve ser favorecida por algum processo que desloque esse equilíbrio novamente para o estado desordenado, ou aberto, como a colisão com membranasceptoras (HODSDON; CISTOLA, 1997). Apesar dessa hipótese não ser capaz de explicar inteiramente o mecanismo de captação de ligantes por todas as iLBPs, visto que a desestruturação da região do portal não foi observada para todos os membros da família, ela indica que a dinâmica dessas proteínas tem papel central no mecanismo de entrada e saída do ligante da cavidade (RAGONA

et al., 2014). A caracterização da dinâmica molecular de apo e holo-iLBPs, visando a elucidação do mecanismo de interação entre essas proteínas e seus ligantes, foi alvo de diferentes estudos nas últimas décadas.

1.4 PROTEÍNA CELULAR LIGANTE DE ÁCIDO RETINOICO 2 (CRABP2)

CRABP2 é encontrada em virtualmente todos os vertebrados e, apesar de ser ubíqua durante o desenvolvimento embrionário, tem expressão limitada a tecidos específicos em indivíduos adultos como pele, útero, ovários, testículos, plexo coroide e células da linhagem hematopoiética (WARDLAW et al., 1997; YAMAMOTO et al., 1998; ZHENG et al., 1996; ZHENG; ONG, 1998). CRABP2 se liga com alta afinidade e especificidade ao ácido *all-trans* retinoico (AR) e com menor afinidade aos isômeros 9-cis-AR e 13-cis-AR (NORRIS et al., 1994; FOGH; VOORHEES; ASTROM, 1993). CRABP2 atua solubilizando o AR no ambiente aquoso celular, protegendo o AR da isomerização inespecífica, mediando o seu transporte entre os diferentes compartimentos celulares, entregando o excesso de AR para o catabolismo e potencialmente inibindo a sua degradação pela enzima CYP26B1 em momentos de escassez desta molécula, além de ser um elemento crucial na regulação da expressão de genes responsivos a AR (NAPOLI, 1993, 2012). Na ausência de AR, CRABP2 interage com o Antígeno R Humano (*Human Antigen R - HuR*), modulando a afinidade desta proteína aos seus alvos de mRNA (VREELAND et al., 2014a, 2014b).

1.4.1. Transativação de RARs

CRABP2 atua como coativadora da expressão gênica mediada por AR, induzindo a ativação da transcrição de genes-alvo de RARs (DONG et al., 1999). Na presença de AR, CRABP2 é translocada para o núcleo onde entrega o AR diretamente aos RARs, através da formação de um complexo transiente entre as duas proteínas. Os resíduos Gln74, Pro80 e Lys101, localizados próximo a região do portal em CRABP2, são responsáveis por mediar a interação entre holo-CRABP2 e RARs (**Figura 9**) (BUDHU; GILLILAN; NOY, 2001; BUDHU; NOY, 2002). A substituição desses resíduos pelos resíduos correspondentes em CRABP1, a homóloga mais próxima a CRABP2 que não é capaz de transativar RARs, eliminou a capacidade de CRABP2 de ativar a transcrição de genes responsivos a AR. Os resíduos de RARs envolvidos na interação com CRABP2 ainda não são conhecidos, porém, sabe-se que essa interação é mediada pelo LBD (BUDHU; GILLILAN; NOY, 2001). Após entrega de AR para RARs, o complexo AR:RAR:CRABP2 é rapidamente dissociado, resultando na translocação de apo-

CRABP2 para o citoplasma. Apesar do emprego de diferentes técnicas, o complexo AR:RAR:CRABP2 nunca foi isolado (BUDHU; NOY, 2002b).

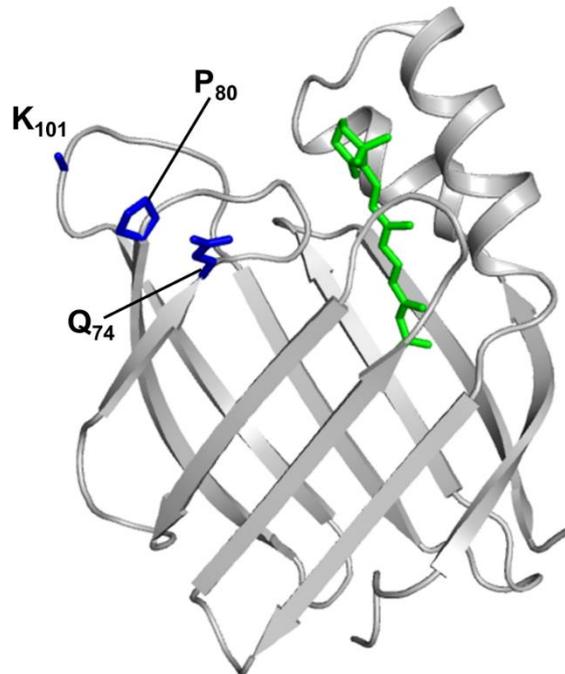


Figura 9: Resíduos que medeiam a interação entre CRABP2 e RARs. Os resíduos envolvidos na interação entre CRABP2 e RARs estão mapeados na estrutura cristalográfica de holo-CRABP2 (PDB 2FR3). O AR está representado em verde.

1.4.2 Localização subcelular

Na ausência de AR, CRABP2 encontra-se no citoplasma, predominantemente associada a retículo endoplasmático (RE). Como CRABP2 é uma proteína solúvel, é sugerido que a sua associação ao RE seja provavelmente mediada por interações proteína-proteína. Como tanto HuR quanto CYP26B1, que são parceiras moleculares de CRABP2, são proteínas encontradas na membrana do RE, acredita-se que a associação de CRABP2 ao RE ocorra via interações com essas duas proteínas (NELSON et al., 2016; ZHANG; VREELAND; NOY, 2016).

A interação com o AR leva a SUMOilação da Arg101 que resulta na sua dissociação do RE (MAJUMDAR et al., 2011) e na translocação de holo-CRABP2 para o núcleo. CRABP2 apresenta um sinal de localização nuclear (*Nuclear Localization Signal – NLS*) não-canônico, formado pelos resíduos Lys20, Arg29 e Lys30, que é ativado após a interação entre a proteína e o AR (SESSLER; NOY, 2005) (**Figura 10**). Importinas- α estão envolvidas no reconhecimento desse NLS presente em holo-CRABP2 e medeiam a translocação do complexo

para o núcleo via importinas- β (SESSLER; NOY, 2005; ZHANG; VREELAND; NOY, 2016). O mecanismo responsável pelo retorno de CRABP2 para o citoplasma ainda não foi elucidado.

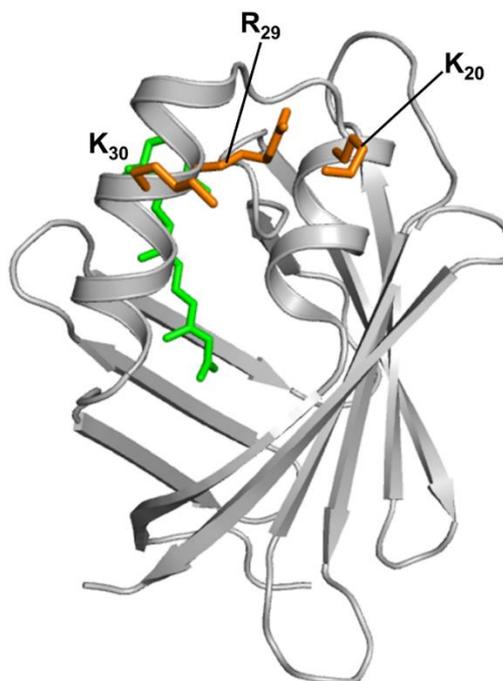


Figura 10: NLS de CRABP2. Os resíduos que compõe o NLS de CRABP2 estão mapeados na estrutura cristalográfica de holo-CRABP2 (PDB 2FR3). O AR está representado em verde.

1.4.3 Estrutura e interação com AR

CRABP2 apresenta 137 resíduos ($M_r \sim 16$ kDa) dispostos na estrutura tridimensional canônica das iLBPs. A estequiometria de ligação entre CRABP2 e AR é de 1:1 e a interação entre proteína e ligante é extensa, envolvendo 21 resíduos (KLEYWEGT et al., 1994). Os resíduos que formam o sítio de interação foram identificados pela perda de superfície de acesso ao solvente das cadeias laterais com a formação do complexo AR:CRABP2 na primeira estrutura cristalográfica determinada para holo-CRABP2, são eles: Phe15, Leu19, Val24, Leu28, Ile31, Ala32, Ala35, Ala36, Pro39, Val41, Thr54, Thr56, Val58, Arg59, Val76, Asp77, Arg111, Leu121, Met123, Arg132 e Tyr134 (KLEYWEGT et al., 1994) (**Figura 11**). O anel β -ionona do AR está parcialmente fixado à região do portal pela porção inferior da hélice $\alpha 2$ e pelas alças βC - βD e βE - βF via interações hidrofóbicas (KLEYWEGT et al., 1994). Após a formação do complexo AR:CRABP2, a porção apolar do AR permanece parcialmente exposta ao solvente, permitindo que ele seja reconhecido por proteínas que interagem com CRABP2 (KLEYWEGT et al., 1994). A porção polar do AR está diretamente ligada a Arg132 e Tyr134

enquanto interage com Arg111 e Thr54 através de uma molécula de água (KLEYWEGT et al., 1994). A extensa interação entre proteína e ligante gera uma afinidade da ordem de subnanomolar e, quando os resíduos polares são substituídos por resíduos hidrofóbicos, a interação diminui ~1000 vezes (μM), mas a orientação do AR na cavidade é mantida (VAEZESLAMI et al., 2008).

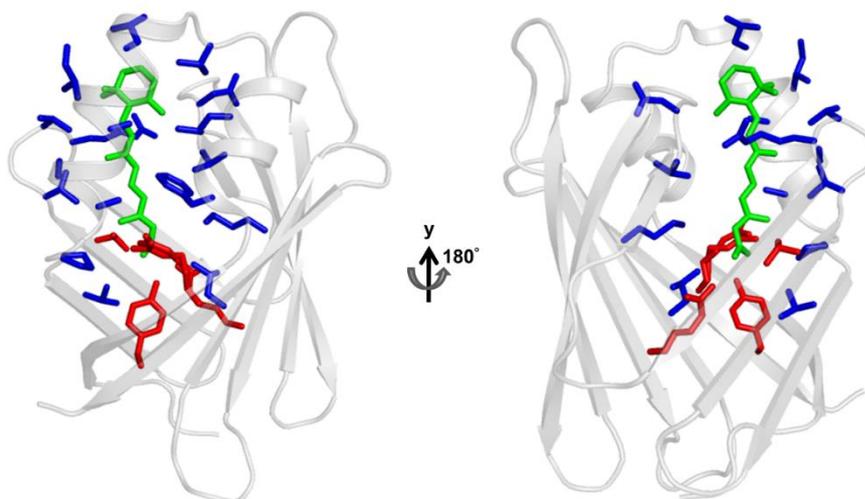


Figura 11: Sítio de interação de CRABP2 com AR (PDB 2FR3). As cadeias laterais referentes aos 21 resíduos que participam da interação com o AR estão destacadas na estrutura da proteína. Os resíduos que interagem com a ligante via interação hidrofóbica estão coloridos em azul (Phe15, Leu19, Val24, Leu28, Ile31, Ala32, Ala35, Ala36, Pro39, Val41, Thr56, Val58, Arg59, Val76, Asp77, Leu121 e Met123) e os resíduos que participam de interações polares com o ligante estão em vermelho (Thr54, Arg111, Arg132 e Tyr134). O AR está representado em verde. A figura da direita está rotacionada 180° em y em relação a da esquerda.

As estruturas tridimensionais de CRABP2 humana livre (VAEZESLAMI et al., 2006; WANG et al., 1998) e ligada a AR foram determinadas (KLEYWEGT et al., 1994; WANG; YAN, 1999) tanto por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) quanto por cristalografia e difração de raios-X. Não é observada uma diferença significativa entre as estruturas tridimensionais cristalográficas de apo-CRABP2 (PDB 2FR3) e holo-CRABP2 (PDB 2FR6) (**Figura 8**), inclusive para os resíduos envolvidos na interação com AR (**Figura 12A**), RARs (**Figura 12B**) e na formação do NLS tridimensional na presença de ligante (**Figura 12C**). O que se verifica é um aumento na rigidez da estrutura após a interação com o ligante, indicando que a dinâmica da proteína é a principal responsável pela execução das diferentes funções referentes aos estados livre e ligado de CRABP2.

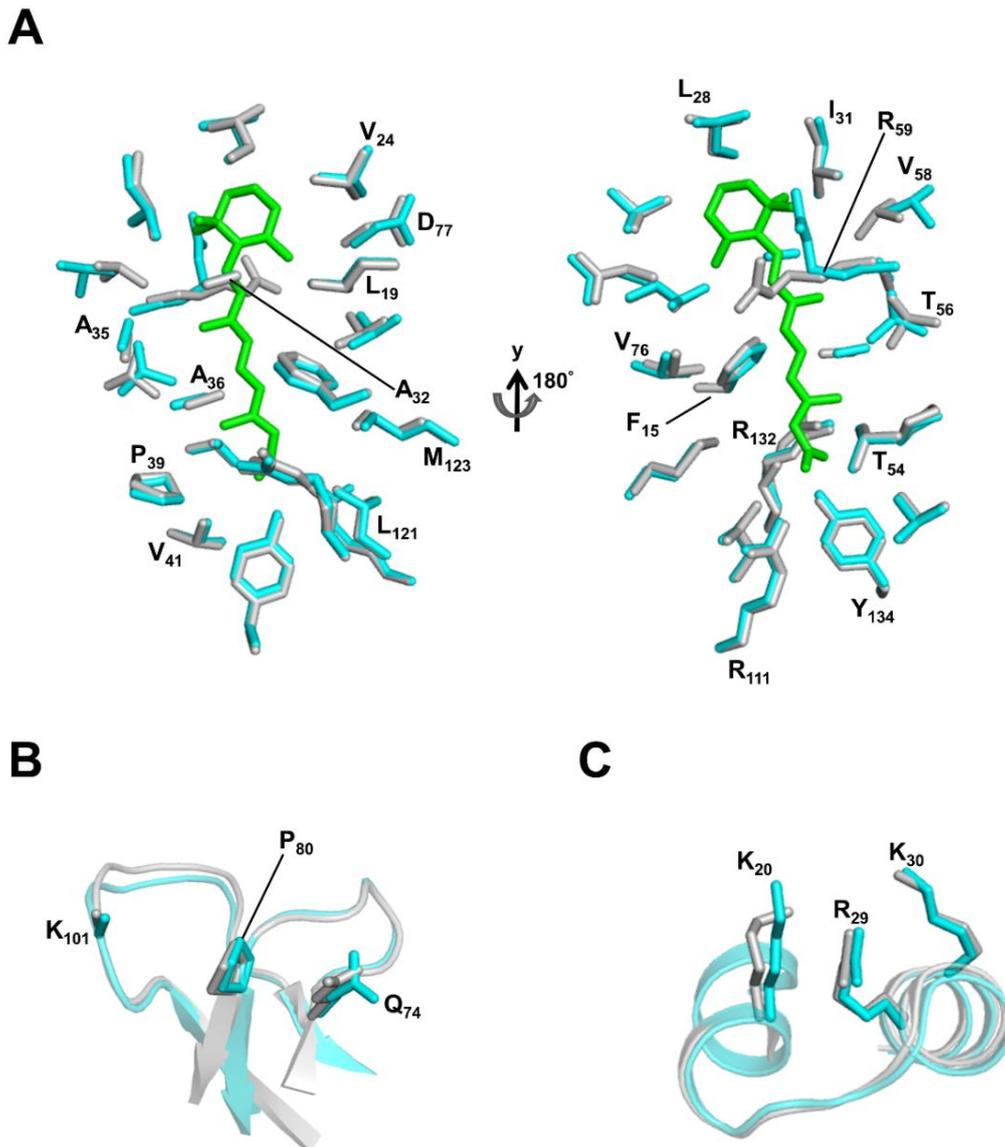


Figura 12: Comparação da conformação das cadeias laterais dos resíduos de CRABP2 envolvidos na interação com AR (A), na interação com RARs (B) e na translocação de CRABP2 para o núcleo (C) na ausência e na presença de AR. Os resíduos foram mapeados nas estruturas cristalográficas de CRABP2 livre (PDB 2FS6) (ciano) e ligada a AR (2FR3) (cinza). O AR está representado em verde.

Já na estrutura de RMN de apo-CRABP2 (PDB 1BLR), o sítio de interação com AR apresenta-se desordenado e flexível, resultando em um portal para a cavidade de interação mais alargado e um sítio de interação mais exposto ao solvente (VAEZESLAMI et al., 2006; WANG et al., 1998). Porém, as regiões com as maiores diferenças entre as estruturas cristalográficas e de RMN de CRABP2 apresentam poucos NOEs de longa distância que são necessários para a definição da estrutura tridimensional (WANG et al., 1998) (**Figura 13**). Nos estudos de RMN, foi observado que dos 21 resíduos que fazem contato com o AR, 16 apresentam sinais fracos ou não observáveis nos experimentos 2D ^1H - ^{15}N HSQC (WANG et al., 1998). Porém, com a

adição de AR, 19 dos 21 picos têm intensidade consistentemente incrementada nos experimentos 2D ^1H - ^{15}N HSQC (WANG; YAN, 1999).

As causas mais comuns de alargamento dos sinais de RMN em HSQCs são eventos de troca conformacional e/ou troca do H amídico com o solvente. Para CRABP2, e outras iLBPs, foi verificado que o alargamento dos sinais é devido a eventos de troca conformacional que acontecem em uma escala de tempo intermediária (μs - ms) ao tempo de escala de RMN. A supressão dos eventos de troca em CRABP2 na presença de AR sugere que a dinâmica da proteína nessa escala de tempo é crucial para o mecanismo de interação com o ligante (WANG et al., 1998).

O mecanismo responsável pela interação entre CRABP2 e AR e a modulação das funções desempenhadas por apo e holo-CRABP2 pela interação com AR ainda não são completamente entendidos. A grande similaridade entre as estruturas de apo e holo-CRABP2 e a modulação dos eventos de troca conformacional pela interação com AR indicam que a dinâmica da proteína tem papel importante na execução das suas diferentes funções e, sendo assim, a caracterização da dinâmica de CRABP2 se faz necessária.

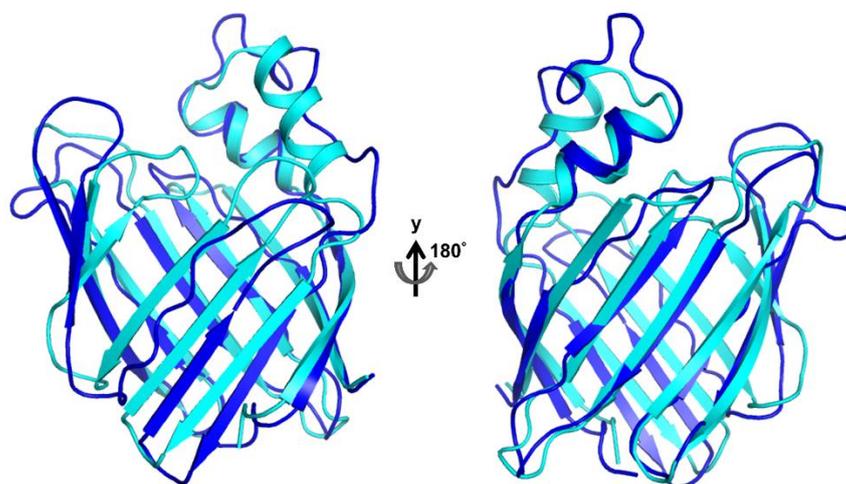


Figura 13: Comparação da estrutura cristalográfica e em solução de apo-CRABP2. Alinhamento entre a estrutura cristalográfica de apo-CRABP2 (2FS6) em azul e a estrutura de RMN de apo-CRABP2 (1BLR) em ciano. A figura da direita está rotacionada 180° em y em relação a da esquerda.

1.4.4 Papel na patogênese do câncer

O AR é capaz de inibir a proliferação de células cancerosas e é utilizado de maneira racional e específica em determinadas terapias antitumorais, como em casos de neuroblastoma e leucemia promielocítica (ALTUCCI; GRONEMEYER, 2001; SOPRANO; QIN; SOPRANO,

2004). A inibição do crescimento celular pelo AR é mediada, primariamente, pela via CRABP2/RAR, que induz a transcrição de genes responsáveis pela inibição da proliferação, parada do ciclo celular e apoptose (WANG et al., 2006). Porém, no caso de células saudáveis e de certos tipos de câncer de mama e pele, por exemplo, além de induzir a proliferação, o AR é capaz de promover o crescimento e a sobrevivência (NOY, 2010; SCHUG et al., 2007). A ativação da via FABP5/PPAR β/δ é responsável por induzir a expressão de genes que estimulam o crescimento, a angiogênese e a sobrevivência, promovendo o desenvolvimento tumoral (WANG et al., 2006). Sendo assim, o efeito antagônico do AR no tratamento de tumores é observado devido a capacidade de ativação das vias CRABP2/RAR e FABP5/PPAR β/δ por essa molécula (SCHUG et al., 2007).

Nas células onde a razão FABP5/CRABP2 é reduzida, levando a ativação da via CRABP2/RAR, o AR irá inibir o crescimento e induzir a apoptose. Porém, nas células onde a razão FABP5/CRABP2 é elevada, a via FABP5/PPAR β/δ será predominante e promoverá a sobrevivência e a proliferação celular (SCHUG et al., 2007, 2008b). A desregulação da razão FABP5/CRABP2, comumente causada pelo aumento da expressão de FABP5 concomitante a diminuição da expressão de CRABP2, é observada em diferentes tipos de câncer, como glioblastoma, carcinoma de células escamosas, câncer de mama e câncer de bexiga (BARBUS et al., 2011; CHEN; FENG; XU, 2011; LEVI et al., 2013; MASOUYÉ; SAURAT; SIEGENTHALER, 1996; WATANABE et al., 1997) (**Figura 14**).

Os níveis de FABP5 são aumentados nas linhagens humanas MDA-MB231 de câncer de mama e PC3M de câncer de próstata, ambas resistentes ao tratamento com AR. Ratos MMTV-*neu*, que são um modelo para câncer de mama, apresentam resistência ao tratamento com AR e seus tumores apresentam razão FABP5/CRABP2 aumentada (SCHUG et al., 2008b). A redução da razão FABP5/CRABP2 em ratos MMTV-*neu*, seja pelo silenciamento de FABP5 ou pelo aumento da expressão de CRABP2 nas células mamárias, direciona o AR para a via CRABP2/RAR em detrimento da via FABP5/PPAR β/δ e inibe a tumorigênese (LEVI et al., 2013; SCHUG et al., 2008b). Em contrapartida, em diferentes linhagens tumorais de mama que superexpressam CRABP2, como MCF-7, MB-231 e SC115, o tratamento com AR promove a expressão de genes-alvo de RARs que induzem a inibição do crescimento e apoptose (BUDHU; NOY, 2002; SCHUG et al., 2007).

Tanto CRABP2 como FABP5 são potenciais alvos terapêuticos para os casos de câncer onde a resistência a AR é observada. Por estar diretamente associada à ativação de RARs e a supressão tumoral, CRABP2 é considerada uma potente proteína antioncogênica (MANOR et

al., 2003). Sendo assim, o entendimento do mecanismo de interação entre CRABP2 e AR se faz essencial para o desenvolvimento de drogas que tenham CRABP2 como alvo.

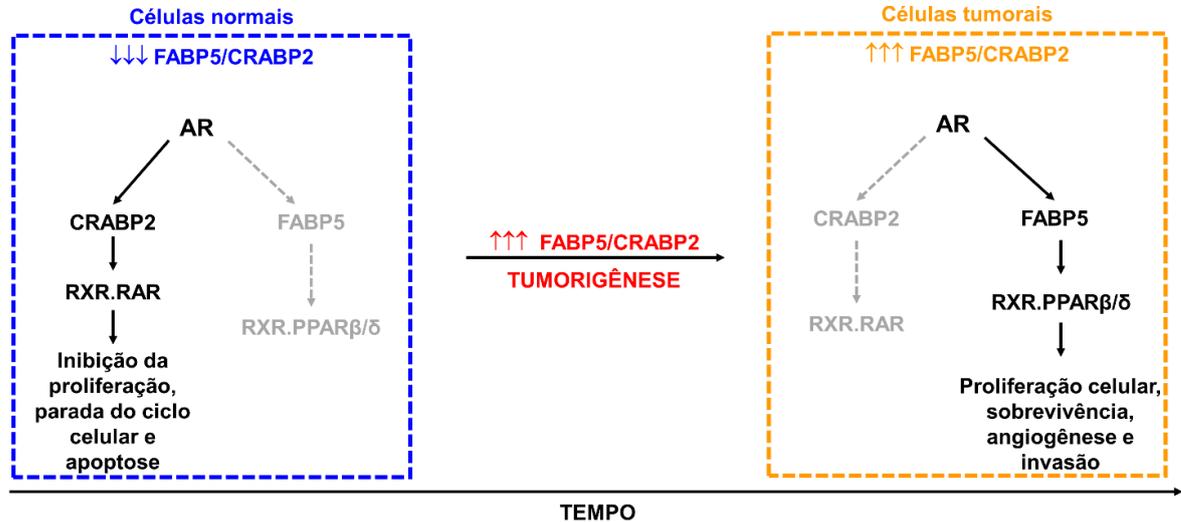


Figura 14: Papel do AR na tumorigênese através da modulação da ativação das vias CRABP2/RARs e FABP5/PPAR β/δ .

1.5 ESTUDO DA DINÂMICA DE PROTEÍNAS POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Proteínas são entidades dinâmicas com a capacidade de interconversão entre diferentes conformações que são críticas para a execução de suas funções biológicas (PALMER, 2001). A barreira energética que separa diferentes conformações de uma proteína pode ser bastante variável, de modo que a interconversão entre diferentes estados pode levar apenas poucos picosegundos (vibração de ligação, movimentação de alças, tombamento molecular) ou alguns segundos (rearranjos dramáticos como desenovelamento) (PALMER, 2004). A espectroscopia de RMN é uma ferramenta poderosa para o estudo desses processos dinâmicos, fornecendo informações em nível atômico em escalas de tempo que variam de picosegundos até dias (MITTERMAIER; KAY, 2009) (**Figura 15**).

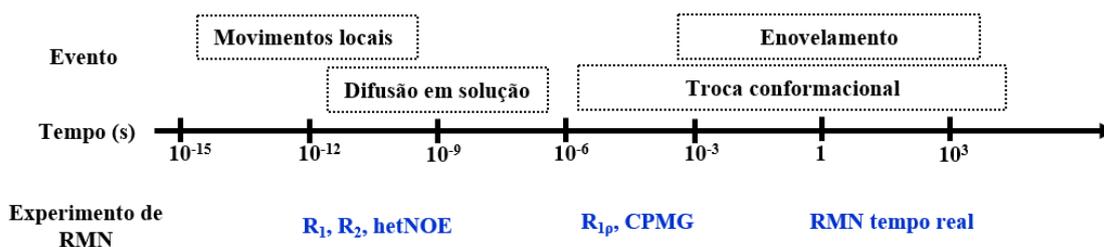


Figura 15: Tempo de escala dos eventos proteicos. O estudo da dinâmica de proteínas pode ser realizado com o auxílio de diferentes experimentos de RMN em uma escala de tempo bastante abrangente. Na figura estão relacionados os eventos, o tempo(s) e exemplos de experimentos de RMN utilizados em cada escala de tempo. Adaptado de (KOVERMANN; ROGNE; WOLF-WATZ, 2016).

A RMN utiliza, dentre outras medidas, os parâmetros de relaxação T_1 , T_2 e os efeitos nucleares *Overhauser* entre o heteronúcleo, tipicamente ^{15}N , e o núcleo de hidrogênio diretamente ligado a ele para a caracterização dos tempos de escala dos movimentos internos da cadeia polipeptídica (ISHIMA; TORCHIA, 2000). Os parâmetros de relaxação T_1 , T_2 e o $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N NOE refletem movimentos que são mais rápidos do que o tempo de correlação rotacional (τ_c), que é o tempo necessário para que a proteína dê uma volta completa sobre o seu próprio eixo em solução (PALMER, 2001). Os processos de relaxação longitudinal e transversa derivam da existência de campos magnéticos locais, que variam randomicamente em direção e magnitude conforme a proteína tomba em solução. Portanto, existe uma correlação entre os tempos de relaxação e os movimentos desenvolvidos pela proteína em solução (PENG; WAGNER, 1992; STONE et al., 1992).

Após a aplicação do pulso de radiofrequência, a magnetização resultante tende a retornar à orientação de menor energia, alinhada ao eixo z, fenômeno este conhecido como relaxação. Existem dois mecanismos independentes de relaxação em RMN: a relaxação transversa, T_2 , e a relaxação longitudinal, T_1 . A relaxação da magnetização longitudinal (relaxação spin-rede) é o processo pelo qual os spins retornam ao equilíbrio térmico em z por meio da redistribuição das populações dos estados do spin nuclear após terem sido perturbados por um pulso de radiofrequência. T_2 está relacionado à relaxação spin-spin, ou seja, a interação dos spins com o sistema, causada principalmente pela inhomogeneidade do campo magnético principal, e diz respeito ao tempo que o vetor magnetização leva para desaparecer no plano xy após a aplicação de um pulso de radiofrequência (**Figura 16**). A dinâmica na escala de ps-ns corresponde a movimentos cuja barreira energética é menor do que a energia térmica kT (onde k é a constante de Boltzmann e T é a temperatura do sistema) e está relacionada a flexibilidade local da cadeia polipeptídica (VALENTE; MIYAMOTO; ALMEIDA, 2006).

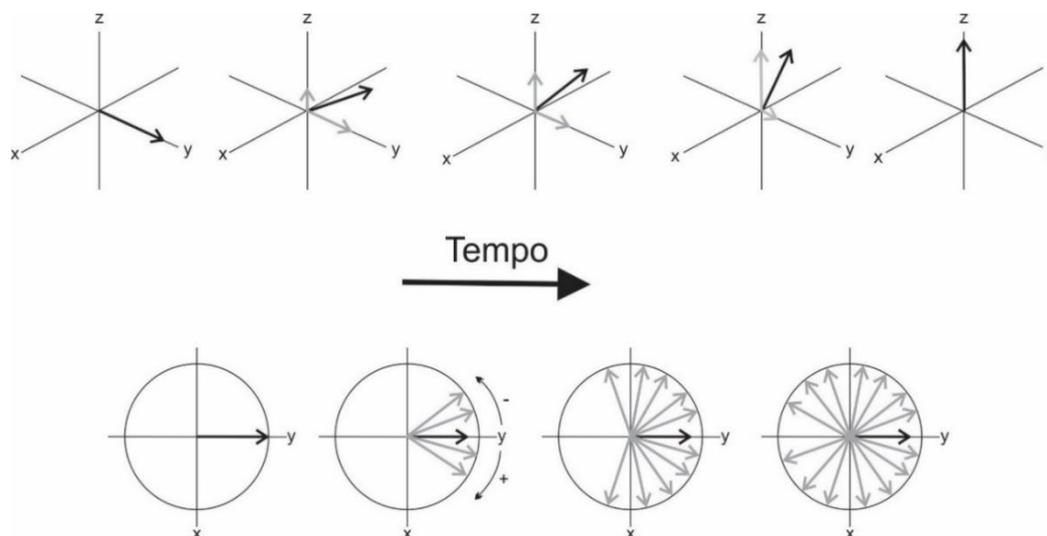


Figura 16: Representação vetorial dos processos de relaxação longitudinal (painel superior) e transversal (painel inferior) do spin nuclear em função do tempo.

Muitos processos biológicos, como catálise, ligação e enovelamento proteico acontecem em uma escala mais lenta (μs - ms) e podem ser entendidos como eventos de troca conformacional ou equilíbrio entre mais de uma conformação em solução (MITTERMAIER; KAY, 2009). O tempo de escala mais elevado está relacionado a necessidade de ultrapassar barreiras energéticas maiores que kT (VALENTE; MIYAMOTO; ALMEIDA, 2006). Os estados de alta energia e pouco populados são chamados de estados excitados e a sua caracterização via experimentos de dispersão de relaxação permite a descrição físico-química de eventos que envolvem reconhecimento molecular (CARR; PURCELL, 1954; KLECKNER; FOSTER, 2011; MEIBOOM; GILL, 1958; MITTERMAIER; KAY, 2009).

O aumento na largura de linha dos sinais de RMN devido a eventos de troca conformacional na escala de μs - ms pode ser explorado para estudos quantitativos de dinâmica molecular por experimentos de dispersão de relaxação, incluindo experimentos de Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) (CARR; PURCELL, 1954; KAY, 2016; MEIBOOM; GILL, 1958). Esses experimentos são capazes de detectar estados excitados que correspondem a até $\sim 1\%$ da população total. Considerando uma molécula que apresenta troca conformacional entre 2 estados, $A \leftrightarrow B$ ($k_{\text{ex}} = k_{\text{AB}} + k_{\text{BA}}$), onde um dos estados é consistentemente mais populado que o outro, um dado núcleo apresentará diferentes valores de deslocamento químico (ν) entre as duas conformações que serão separados por $\Delta\nu$. Se a taxa de troca entre esses estados for menor do que a diferença de deslocamento químico entre eles ($k_{\text{ex}} \ll \Delta\nu$) dois picos serão observados no espectro de RMN, desde que a população do estado menos populado seja suficiente para a obtenção do sinal de ressonância. Quando a troca ocorre em uma taxa maior do que a diferença

de deslocamento químico ($k_{ex} \gg \Delta\nu$), apenas um pico é observado, porém em valores de deslocamento químicos intermediários em relação aos relacionados aos dois estados. Se a taxa de troca e a diferença de deslocamento químico forem da mesma ordem de grandeza ($k_{ex} \approx \Delta\nu$), será observado apenas um sinal de ressonância com largura de linha aumentada (FARBER; MITTERMAIER, 2015).

A troca conformacional na escala de tempo intermediária leva ao aumento de R_2 em função de R_{ex} ($R_2^{\text{Observado}} = R_2^0 + R_{ex}$, onde R_2^0 é a relaxação transversa independente de R_{ex} e R_{ex} inclui a contribuição do termo de troca entre os dois estados k_{ex} e a diferença de deslocamento químico $\Delta\nu$ entre eles) e do aumento da largura de linha ($\lambda = 2 R_2^{\text{Observado}}$) (FARBER; MITTERMAIER, 2015; LORIA; RANCE; PALMER, 1999). O princípio do experimento de CPMG é reduzir ou refocar o alargamento do sinal resultante da diferença de deslocamento químico entre as diferentes conformações (reduzindo ou dispersando R_{ex}) através da aplicação de uma série *spin-echos* (τ -180°- τ). Durante um tempo de relaxação via CPMG fixo (T_{relax}), um número variável de *spin-echos*, com diferentes valores de τ , são aplicados de maneira sequencial. Cada valor de τ pode ser expresso como uma frequência de aplicação de CPMG ($\nu_{CPMG} = 1/2\tau$) que se refere a taxa de precessão da magnetização sobre o eixo onde o pulso de RF foi aplicado (FARBER; MITTERMAIER, 2015; KLECKNER; FOSTER, 2011). O perfil de dispersão de relaxação, a relação entre a largura de linha dos sinais e a frequência dos pulsos de CPMG são utilizados para o ajuste do modelo de troca conformacional a partir do qual os parâmetros termodinâmicos são extraídos (MITTERMAIER; KAY, 2006).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Tendo em vista o papel central de CRABP2 na regulação da expressão gênica via AR, o presente projeto visa entender, através de uma abordagem estrutural, o mecanismo de interação entre CRABP2 e AR e a modulação da dinâmica de CRABP2 por seu ligante cognato.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificação do assinalamento sequencial da cadeia principal de CRABP2 livre (BMRB 4186) e do complexo AR:CRABP2 (WANG et al., 1998).
- Caracterização da estabilidade térmica de CRABP2 livre e ligada a AR.
- Caracterização da cinética de interação entre CRABP2 e AR.
- Identificação dos resíduos de CRABP2 envolvidos na interação com AR.
- Caracterização da dinâmica térmica (ps-ns) de CRABP2 na presença e na ausência de AR.
- Investigação da autoassociação de holo-CRABP2.
- Caracterização da dinâmica intermediária (μ s-ms) de CRABP2 na presença e na ausência de AR.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Meios de cultura

As cepas bacterianas foram cultivadas em meio Luria-Bertani (LB) (Sigma), constituído por triptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L e NaCl 5 g/L. O meio LB sólido apresentou a mesma composição do meio líquido adicionado de ágar 15 g/L (Sigma). Para a produção das amostras isotopicamente marcadas com ^{15}N e $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$, o cultivo bacteriano foi realizado em meio mínimo M9 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 17 g/L, KH_2PO_4 3 g/L, NaCl 0,5 g/L, NH_4Cl 1 g/L, MgSO_4 , glicose 3 g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 14,7 g/L, tiamina 1 g/L) contendo $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ e/ou $[^{13}\text{C}]$ -glicose (Cambridge Isotope) como únicas fontes de nitrogênio e carbono, respectivamente. Todos os meios foram esterilizados por autoclavagem e suplementados com canamicina 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. O estoque do antibiótico foi preparado em água miliQ a uma concentração de 50 mg/mL e esterilizado por filtração em membrana de 0,22 μm .

3.1.2 Cepas bacterianas

Neste trabalho, a cepa *Escherichia coli* DH5- α [genótipo: *F*- $\phi 80\text{lacZ}\Delta\text{M15 } \Delta(\text{lacZYA-argF}) \text{U169 } \text{recA1 } \text{endA1 } \text{hsdR17} (\text{rk-}, \text{mk+}) \text{ } \text{phoA } \text{supE44 } \lambda\text{- } \text{thi-1 } \text{gyrA96 } \text{relA1}$] foi utilizada para o estoque de DNA plasmidial, enquanto a cepa *E. coli* BL21(DE3) [genótipo: *F*- *ompT hsdSB*(*rB*-, *mB*-) *gal dcm* (DE3)] foi utilizada para a expressão da proteína de interesse.

3.1.3 Vetor de expressão

A sequência de DNA referente à CRABP2 humana (resíduos 1-137) foi subclonada no vetor de expressão heteróloga pET-RP1B (promotor T7, origem de replicação f1, KanR), que fusiona a proteína de interesse a uma cauda N-terminal constituída pelos seis primeiros aminoácidos da tioredoxina (Tio_6) seguida de seis histidinas (His_6) e de um sítio de clivagem para a protease TEV (*Tobacco Etch Virus*) ($\text{Tio}_6\text{His}_6\text{TEV}$) pela empresa Genescript (EUA) (Figura 17).

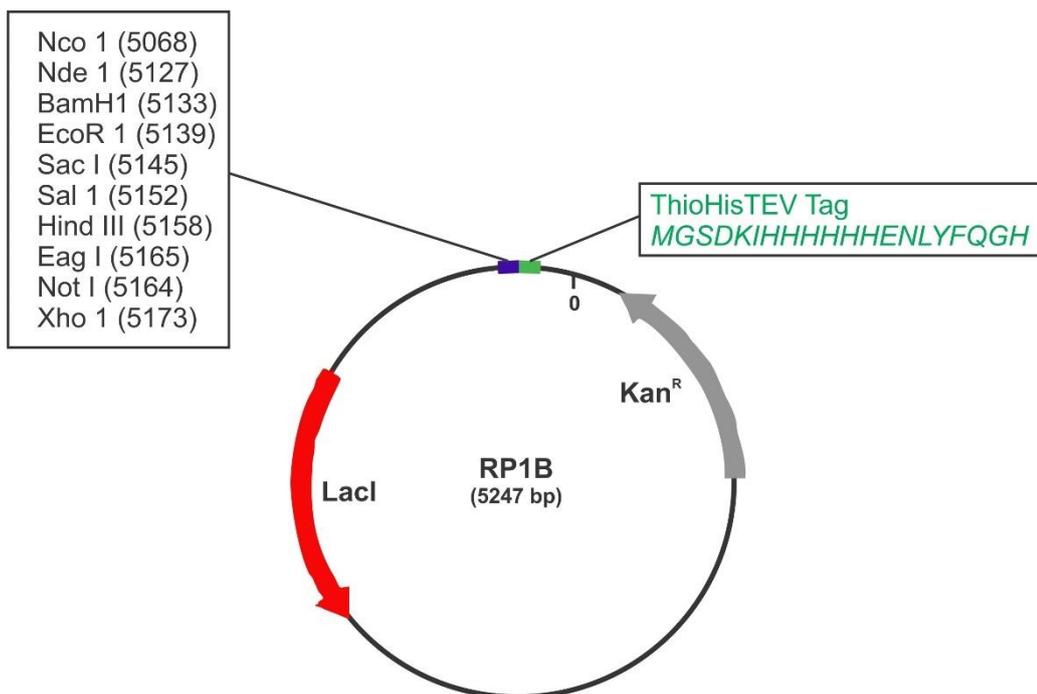


Figura 17: Mapa de restrição do vetor de expressão RP1B. No mapa do plasmídeo estão indicadas as enzimas presentes no sítio de restrição, a constituição da cauda de expressão, o sítio de resistência à canamicina e o gene LacI.

A massa molecular (kDa) e o ponto isoelétrico (pI) teóricos de CRABP2, antes e após a remoção da cauda Tio₆His₆TEV, foram calculados utilizando a ferramenta *ProtParam*, disponível no servidor *Expasy* (<https://web.expasy.org/protparam>) (**Tabela 2**).

Tabela 2: Massa molecular (kDa) e pI teóricos de CRABP2 antes e após a remoção da cauda Tio₆His₆TEV

Construção	ANTES da remoção da cauda Tio ₆ His ₆ TEV		APÓS a remoção da cauda Tio ₆ His ₆ TEV	
	Massa molecular (kDa)	pI teórico	Massa molecular (kDa)	pI teórico
CRABP2 (1-137)	17.5	6.2	15.9	5.6

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Produção de CRABP2 recombinante

3.2.1.1 Transformação bacteriana

Células de *E. coli* BL21(DE3) competentes foram preparadas de acordo com o método de cloreto de rubídio (HANAHAN, 1983). Alíquotas de células competentes foram retiradas do freezer a -80 °C e descongeladas em banho de gelo. Um volume de 2 µL de DNA plasmidial foi adicionado a cada alíquota de 200 µL de célula. A mistura foi incubada em gelo por 30 min, seguida de choque térmico a 42 °C por 45 s e novamente banho de gelo por 2 min. Em seguida, adicionou-se 1 mL de LB líquido e as amostras foram incubadas a 37 °C por 1 h sob agitação de 250 rpm. Após esse período, as células foram centrifugadas a 20375 g por 5 minutos a temperatura ambiente. Um volume de 950 µL do sobrenadante foi descartado e o precipitado formado foi homogeneizado nos 50 µL de meio restantes. As bactérias transformadas foram plaqueadas em meio LB sólido seletivo contendo 50 µg/mL de canamicina e crescidas a 37 °C por 16 h.

3.2.1.2 Expressão heteróloga de CRABP2

Células de *Escherichia coli* BL21(DE3) foram transformadas com o plasmídeo RP1B contendo a sequência codificante de CRABP2. As culturas bacterianas foram crescidas em meio LB a 37 °C até que atingissem densidade ótica a 600 nm de 0,6. A expressão da proteína recombinante foi induzida por β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) 0,4 mM. Após indução, as células foram crescidas por 24 h a 18 °C e 200 rpm. As culturas foram recolhidas por centrifugação a 5000 X g por 10 min a 4 °C e armazenadas a -80 °C. As amostras para os experimentos de RMN foram produzidas utilizando meio M9 contendo ¹⁵N e/ou ¹³C como descrito no **item 3.1.1**.

3.2.1.3 Purificação de CRABP2

3.2.1.3.1 Lise bacteriana

O precipitado bacteriano proveniente da expressão de Thio₆His₆TEV-CRABP2 foi descongelado em banho de gelo e homogeneizado em tampão de lise [Tris-HCl 50 mM, NaCl 500 mM, imidazol 5 mM, β-mercaptoetanol 10mM, triton-X 100 0,1%, suplementado com

coquetel de inibidor de protease *EDTA-free* (Sigma-Aldrich) (pH 8,0)]. As células foram lisadas por sonicação (Branson) em 20 ciclos de 20 s de sonicação e 60 s de intervalo (100W de potência e 20% de amplitude). O lisado foi centrifugado a 8077 Xg por 40 min a 4 °C (Sigma 2-16KL) e o sobrenadante foi filtrado em membrana de 0,22 µm (Millipore).

3.2.1.3.2 Primeira cromatografia de afinidade a níquel

A primeira etapa de purificação de CRABP2 (Thio₆His₆TEV-CRABP2) consistiu em uma cromatografia de afinidade a níquel. Foi utilizada uma coluna HisTrap HP de 5 mL (GE Healthcare), acoplada ao sistema de purificação ÄktaPrime Plus (GE Healthcare), equilibrada em tampão A [Tris-HCl 50 mM, NaCl 500 mM, imidazol 5 mM, β-mercaptoetanol 10mM (pH 8,0)]. A amostra proteica foi aplicada na coluna utilizando um fluxo de 0,5 mL/min e a subsequente lavagem da coluna com tampão A se deu em fluxo de 2 mL/min. Após a etapa de lavagem, a coluna foi submetida a um gradiente linear de 5 a 500 mM de imidazol [Tris-HCl 50 mM, NaCl 500 mM, imidazol 500 mM, β-mercaptoetanol 10mM (pH 8,0)], utilizando um fluxo de 3 mL/min. Alíquotas de 1 mL foram coletadas durante o processo de purificação. Após o término do gradiente, a coluna foi lavada com imidazol 2 M para que as moléculas que persistissem ligadas a coluna fossem removidas. O perfil de eluição das proteínas presentes na amostra foi acompanhado por absorbância a 280 nm. Os tampões A e B foram previamente autoclavados para evitar a degradação de CRABP2 por proteases contaminantes.

3.2.1.3.3 Diálise e clivagem com TEV

As frações contendo CRABP2, provenientes da primeira etapa de cromatografia, foram identificadas por SDS PAGE, reunidas e dosadas. A cauda N-terminal Thio₆His₆TEV, presente em CRABP2 recombinante, foi removida através de incubação com a protease His₆-TEV NIa (S219V), que apresenta uma atividade sítio-específica e é capaz de reconhecer a sequência de resíduos ENLYFQG. A incubação se deu em razão molar de 5:1 (CRABP2:TEV) durante 72 h a 4 °C. Simultaneamente à clivagem, a amostra foi dialisada contra tampão [Tris-HCl 50 mM, NaCl 500 mM, imidazol 5 mM, DTT 5 mM (pH 8,0)] em membrana SnakeSkin 3.5 K MWCO (Thermo Scientific) para remoção do imidazol oriundo da eluição cromatográfica. O tampão de diálise foi previamente autoclavado para evitar a degradação de CRABP2 por proteases contaminantes. A eficiência da clivagem foi avaliada por SDS PAGE.

3.2.1.3.4 Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS PAGE)

A técnica de SDS PAGE foi realizada conforme descrito por (LAEMMLI, 1970) utilizando o Mini-PROTEAN Tetra System 20 (BioRad). O gel de corrida foi constituído de 14,5% de acrilamida, 0,5% de bis-acrilamida, Tris-Glicina 390 mM (pH 8,8), dodecil sulfato de sódio (SDS) 0,1%, persulfato de amônio (PSA) 0,1% e TEMED 0,01%. O gel de concentração foi composto de 5% de acrilamida, Tris-Glicina 130 mM (pH 6,8), SDS 0,1%, PSA 0,1% e TEMED 0,01%. Os géis foram corridos a 25 mA por 1 h e 30 min em tampão de corrida [Tris-HCl 25 mM, Glicina 250 mM e SDS 0,1% (pH 8,3)]. Foram aplicados 20 µL de cada amostra adicionadas de 5 µL de tampão de amostra [Tris-HCl 12,5 mM, β-mercaptoetanol 25 mM, SDS 0,5%, Azul de bromofenol 0,25%, Glicerol 2,5% (pH 6,8)] nos géis. Após a separação eletroforética, as proteínas foram visualizadas por coloração com azul brilhante Comassie R (Vetec).

3.2.1.3.5 Dosagem de proteínas

A concentração das amostras proteicas foi estimada através do método colorimétrico realizado em placa de 96 poços utilizando o reagente Pierce 660nm Protein Assay (Thermo Scientific). Foram adicionados 150 µL do reagente a um volume de 10 µL de proteína e as dosagens foram realizadas em triplicata. Após 5 minutos de reação na ausência de luz, a absorbância das amostras foi medida a 660 nm utilizando um leitor de placas Victor TM X5 (Perkin Elmer). Os valores de concentração das amostras de proteína foram calculados a partir de uma curva padrão feita com albumina bovina sérica (BSA) na faixa de 0,1 a 2 mg/mL.

3.2.1.3.6 Segunda cromatografia de afinidade a níquel

Após a etapa de clivagem, foi realizada uma segunda etapa de cromatografia de afinidade a níquel, com o objetivo de separar a protease His₆-TEV da proteína de interesse. Esta segunda cromatografia de afinidade foi realizada nas mesmas condições experimentais da primeira, descrita no **item 3.2.1.3.2**. Nesta etapa, a protease His₆-TEV permaneceu ligada à resina de níquel enquanto CRABP2, desprovida da cauda de afinidade, foi diretamente eluída no lavado. Posteriormente, His₆-TEV foi eluída através de lavagem da coluna com tampão [Tris-HCl 50 mM, NaCl 500 mM, imidazol 500 mM, β-mercaptoetanol 10mM (pH 8,0)]. Amostras recolhidas ao longo de todo o processo de purificação foram analisadas por SDS-

PAGE. Os tampões A e B foram previamente autoclavados para evitar a degradação de CRABP2 por proteases contaminantes.

3.2.1.3.7 Cromatografia de exclusão molecular

Identificadas as frações referentes à CRABP2, estas foram reunidas e concentradas por ultrafiltração em sistema CENTRICON (3000 Da; Millipore) até o volume de 3 mL. A amostra concentrada foi submetida a uma terceira etapa de purificação por cromatografia de exclusão molecular utilizando uma coluna Superdex 75 (HiLoad 16/60; GE Healthcare) acoplada ao sistema ÄKTA Prime Plus (GE Healthcare). A coluna foi equilibrada em tampão C [fosfato de sódio 20 mM, NaCl 150 mM, DTT 5 mM (pH 7,4)] utilizando um fluxo de 1 mL/min. O tampão C foi previamente autoclavado para evitar a degradação de CRABP2 por proteases contaminantes. O perfil de eluição das proteínas da amostra foi avaliado através do traçado de absorbância a 280 nm. As frações referentes aos picos de eluição foram avaliadas por SDS-PAGE. A amostra final correspondente à CRABP2 com alto grau de homogeneidade foi concentrada por ultrafiltração em sistema CENTRICON (3000 Da; Millipore) até a concentração desejada.

3.2.1.3.8 Produção do complexo AR:CRABP2.

Para a realização dos ensaios com o complexo AR:CRABP2, as frações referentes a CRABP2 obtidas na terceira etapa de purificação foram reunidas e diluídas até uma concentração de ~40 μ M em tampão C. Uma solução de ácido *all-trans* retinoico (Santa Cruz Biotech) 1 mg/mL em 100% de dimetilsulfóxido (DMSO) foi preparada e adicionada, em banho de gelo, sob agitação e no escuro, de 5 em 5 μ L à amostra de CRABP2. A razão molar de AR:CRABP2 utilizada foi de 1:1,5 e o volume final de DMSO foi mantido abaixo de 2% do volume total de amostra. Após a adição do AR, a amostra foi mantida a 4 °C por ~16 h (WANG; LI; YAN, 1997). Para verificação do estado oligomérico de AR:CRABP2, uma etapa de cromatografia de exclusão molecular foi realizada como descrito no **item 3.2.1.3.7** após a formação do complexo. Para verificar se CRABP2 interagia com o solvente DMSO, um espectro 2D ^1H - ^{15}N HSQC de apo-CRABP2 na presença de 2% v/v de DMSO foi adquirido.

3.2.2 Fluorimetria Diferencial de Varredura (*Differential Scanning Fluorimetry – DSF*)

Experimentos de DSF foram realizados com o intuito de avaliar a estabilidade térmica de CRABP2 livre e na presença de AR através da determinação da sua temperatura média de desenovelamento (T_m). Nos experimentos de DSF é realizada a desnaturação térmica gradual da proteína de interesse na presença de uma sonda cromófora que se liga as regiões hidrofóbicas expostas com o desenovelamento proteico e emite fluorescência. O aumento da fluorescência gerado pela sonda cromófora em função do aumento da hidrofobicidade do meio onde esta se encontra é monitorado. O sinal máximo de fluorescência é obtido quando a proteína se encontra completamente desenovelada, e a intensidade do sinal diminui em função da dissociação do complexo cromóforo-proteína. A intensidade do sinal de fluorescência (RFU) é plotado em função da temperatura ($^{\circ}\text{C}$), gerando uma curva sigmoideal que relacionada a fração de proteína desenovelada a temperatura utilizada. O ponto de inflexão corresponde ao T_m da proteína, no qual 50% das moléculas encontram-se desnaturadas (BOIVIN; KOZAK; MEIJERS, 2013; NEWMAN; IUCR, 2004).

As reações foram feitas em um volume final de 50 μL em placas de 96 poços, onde cinco microlitros de uma solução composta por CRABP2 livre ou pelo complexo AR:CRABP2 a 1.5 mg/mL (concentração final = 0.15 mg/mL) e SYPRO Orange 20X (Invitrogen) (concentração final = 2X) foram adicionados a 45 μL de tampão [NaP 20 mM, NaCl 50 mM, TCEP 0.5 mM (pH 6,8)]. Os experimentos foram realizados em triplicatas em um equipamento de PCR em tempo real CFX96 (BioRad) onde a temperatura foi variada de maneira crescente de 4 a 80 $^{\circ}\text{C}$, com incrementos de 0.5 $^{\circ}\text{C}$ a cada 5 s. Os dados foram analisados com o auxílio dos programas BioRad CFX manager 3.1 e GraphPad Prisma.

3.2.3 Ressonância Plasmônica de Superfície (*Surface Plasmon Resonance Spectroscopy - SPR*)

Os parâmetros cinéticos da interação entre CRABP2 e seu ligante cognato AR foram determinados por SPR. A SPR se utiliza do fenômeno de ressonância plasmônica de superfície para identificar a interação entre moléculas, para determinar a afinidade de interação entre elas (K_d) e para calcular as taxas de associação (k_{on}) e dissociação (k_{off}). Nesta técnica é utilizado um sensor, que consiste em um *chip* coberto por uma fina camada de metal, por exemplo ouro, funcionalizado para a ligação de biomoléculas específicas – *chips* de Ni^{2+} são utilizados para a adsorção de proteínas que contêm uma cauda de seis histidinas, por exemplo. Após a imobilização da molécula de interesse na superfície do sensor, o mesmo é submetido a um fluxo

contínuo de tampão contendo o ligante desejado, permitindo a interação entre as moléculas. Durante a etapa de associação entre proteína e ligante, o complexo se acumula na superfície do sensor, gerando um aumento do sinal de SPR que é proporcional as massas dos complexos adsorvidos na superfície do mesmo. Após a etapa de associação entre proteína e ligante, a etapa de dissociação é realizada. Nesta fase do experimento, o sensor é submetido a um fluxo contínuo de tampão e, ao passo que a proteína e o ligante se dissociam, o ligante é removido da célula de detecção (EDWARDS; EVANS; LI, 2017).

O instrumento Reichert4SPR (Reichert Technologies) foi utilizado. Os experimentos foram conduzidos a 25 °C e utilizando tampão de corrida [NaP 20 mM, NaCl 150 mM, TCEP 0.5 mM e Tween 0.05% (pH 7.4)]. A imobilização de CRABP2 na superfície de um sensor de ouro funcionalizado com hidrogel Ni-NTA (*NiHC200M*; *Xantec*) se deu pela injeção de 50 µL de His₆-CRABP2 a 1 µM por 30 s, seguida pelo equilíbrio do sensor com tampão de corrida em um fluxo constante de 50 µL/min por 10 min. Cerca de 2000 µRIU de proteína foram adsorvidos a superfície, em média, na etapa de imobilização. O AR em pó foi ressuspensionado no tampão de corrida e a sua concentração foi confirmada por absorvância a 341 nm ($\epsilon = 37600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

O método de titulação cinética foi utilizado para a determinação dos parâmetros cinéticos da interação entre CRABP2 e AR em um único ciclo de ligação através da injeção sequencial de concentrações crescentes de AR (EDWARDS; EVANS; LI, 2017). Neste ensaio, o sensor contendo His₆-CRABP2 imobilizada foi submetido a aplicação sequencial de concentrações crescentes de AR (125 nM, 250 nM, 500 nM). Posteriormente a cada etapa de injeção de AR foi realizada uma etapa de lavagem do sensor com tampão. Para cada etapa de injeção de AR ou lavagem com tampão, 60 µL de amostra ou tampão foram aplicados por 60 s e um tempo de dissociação de 3 min foi utilizado. Os experimentos foram realizados em quadruplicatas. Os sensores foram regenerados utilizando-se tampão EDTA 350 mM (pH 8.0) e NiSO₄ 40mM. Os dados foram exportados para o programa Scrubber (BioLogic Software Ltd.) e fitados utilizando um modelo de titulação cinética limitado por transporte de massa no programa Clamp (Biosensor Data Analysis) (MYSZKA et al., 1997). Os dados e os ajustes foram exportados em arquivos .txt e plotados com o auxílio do programa DataGraph (*Visual Data Tools, Inc.*). As constantes de associação e dissociação, k_{on} e k_{off} , respectivamente, foram determinadas a partir do ajuste dos sensorgramas com o auxílio do programa Prisma (GraphPad). A constante de afinidade (K_d) foi calculada pela razão k_{off}/k_{on} .

3.2.4 Assinalamento sequencial das ressonâncias da cadeia principal de CRABP2 livre e ligada a AR

Os assinalamentos sequenciais previamente publicados para CRABP2 livre (BMRB 4186) e ligada a AR (WANG et al., 1998) foram verificados neste trabalho. Os espectros de RMN foram coletados a 25 °C utilizando amostras de CRABP2 livre e ligada a AR purificadas e isotopicamente enriquecidas com ^{15}N e ^{13}C [NaP 20 mM, NaCl 150 mM, DTT 5 mM (pH 7,4) e 5% (v/v) de D2O] em espectrômetro Bruker 900 MHz equipado com sonda TXI 900 MHz S6 (CNRMN/UFRJ). A concentração das amostras de CRABP2 livre e ligada a AR foi de 1 mM.

O assinalamento das ressonâncias de ^1H , ^{15}N e ^{13}C das cadeias principais de CRABP2 na presença e na ausência de AR foi realizado com base na análise do espectro 2D ^1H - ^{15}N HSQC e dos espectros 3D HNCACB, CBCA(CO)NH, HNCA, HNCO e HN(CA)CO. Os espectros de RMN foram adquiridos e processados com o auxílio dos programas Topspin 3.1 (Bruker Biospin) e NMRPipe (DELAGLIO et al., 1995). A análise foi realizada no programa CARA (RLJ., 2004). O espectro ^1H - ^{15}N HSQC foi utilizado para identificar os deslocamentos químicos de ^1H e ^{15}N amídicos de cada resíduo da proteína, excetuando prolínas. Os espectros de tripla ressonância, que relacionam as frequências de ^1H e ^{15}N amídicos com as frequências de carbono, foram utilizados para a identificação dos deslocamentos químicos de C_i^α , C_i^β e C'_i de cada resíduo (i) e do resíduo anterior (i-1). A análise combinada dos espectros HNCA, HNCACB e CBCA(CO)NH permitiu a identificação dos deslocamentos químicos referentes a C_i^α , C_i^β , C_{i-1}^α e C_{i-1}^β para cada resíduo e o par de espectros HNCO e HN(CA)CO permitiu a identificação dos deslocamentos químicos de C'_i e C'_{i-1} . Os experimentos utilizados para o assinalamento e as informações obtidas a partir deles estão listados na **Tabela 3**.

Tabela 3: Experimentos de RMN utilizados para o assinalamento sequencial das ressonâncias das cadeias principais de CRABP2 livre e ligada

	Experimento	Forte(s)	Frac(s)
C_i^α e C_i^β	HNCA	C_i^α	C_{i-1}^α
	HNCACB	C_i^α e C_i^β	C_{i-1}^α e C_{i-1}^β
C_{i-1}^α e C_{i-1}^β	CBCA(CO)NH	C_{i-1}^α e C_{i-1}^β	---
	HNCO	C'_{i-1}	---
C'_i e C'_{i-1}	HN(CA)CO	C'_i	C'_{i-1}

Na estratégia de assinalamento sequencial de proteínas, a primeira etapa consiste na identificação de C^{α}_i , C^{β}_i , C^{α}_{i-1} , C^{β}_{i-1} , C'_i e C'_{i-1} para todos os picos de correlação observados no ^1H - ^{15}N HSQC, excetuando os picos que são referentes as cadeias laterais de asparagina e glutamina. Na segunda etapa, procura-se por picos no ^1H - ^{15}N HSQC que apresentam deslocamentos químicos para C^{α}_i e C^{β}_i ou C^{α}_{i-1} e C^{β}_{i-1} característicos de alguns aminoácidos: 1) Glicina – não apresenta C^{β} e apresenta C^{α} característico em ~ 45 ppm; 2) Serina e Treonina – são os únicos cujos valores de deslocamento químico de C^{β} são maiores que os referentes a C^{α} ; 3) Alanina – apresenta o menor valor de deslocamento químico de C^{β} (~ 19 ppm). Tendo identificado um sinal com essas características, utiliza-se a função do programa que procura por sucessores ($i+1$) ou predecessores ($i-1$) do sistema de spin em questão através da comparação dos valores de deslocamento químico de C^{α} , C^{β} e C' entre os spins. Se o programa identifica um sucessor para o sistema de spin em análise, os deslocamentos químicos de C^{α}_i e C^{β}_i do spin têm que estar alinhados aos deslocamentos químicos de C^{α}_{i-1} e C^{β}_{i-1} do possível sucessor. Quando isso acontece, os spins são conectados e é feita uma nova rodada de busca por sucessores. A sequência primária da proteína também é fornecida ao programa e, com base nela, os fragmentos obtidos com a conexão dos sistemas de spin são identificados e assinalados.

Foi realizada a caracterização da estrutura secundária de apo-CRABP2 e de holo-CRABP2 a partir da análise dos desvios dos deslocamentos químicos dos átomos H^{N} , N , C^{α} e C^{β} obtidos neste trabalho em relação aos valores observados em estruturas randômicas com o auxílio do programa Talos-N (SHEN; BAX, 2013).

3.2.5 Medida dos parâmetros de relaxação R_1 , R_2 e $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N NOE.

A dinâmica térmica (ps-ns) da cadeia principal CRABP2 livre e ligada a AR foi caracterizada a partir da medida dos parâmetros de relaxação do núcleo de ^{15}N (R_1 , R_2 e $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N NOE). Os experimentos de dinâmica foram coletados a 25 °C utilizando amostras de CRABP2 livre e ligada a AR purificadas e isotopicamente enriquecidas com ^{15}N [NaP 20 mM, NaCl 150 mM, DTT 5 mM (pH 7,4) e 5% (v/v) de D2O] em espectrômetros Bruker Avance III 800 e Bruker 900 MHz equipados com sondas TXI 900 MHz S6 e TXI 800 MHz 5mm, respectivamente (CNRMN/UFRJ). A concentração das amostras de CRABP2 livre e ligada a AR foi de 1 mM.

As taxas de relaxação longitudinal (R_1) e transversa (R_2) dos núcleos de ^{15}N foram obtidas com a aquisição de espectros em diferentes tempos de relaxação: 100, 200, 300, 400, 500, 700, 900 e 1100 ms para R_1 ; e 16,96, 33,92, 50,88, 67,96, 84,80, 101,76, 118,72 e 135,65

ms para R_2 . Os experimentos de R_1 , R_2 e $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N NOE foram realizados em versões pseudo-3D, onde a terceira dimensão corresponde aos diferentes tempos de relaxação.

3.2.6 Análise dos dados de relaxação R_1 , R_2 e $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N NOE.

As intensidades dos sinais presentes nos espectros de correlação [^1H , ^{15}N] foram utilizadas para calcular as taxas de relaxação. Os resíduos que apresentaram sobreposição de sinais no espectro 2D ^1H - ^{15}N HSQC foram removidos da análise. O programa CCPNmr (VRANKEN et al., 2005) foi utilizado para calcular os valores de R_1 e R_2 através do ajuste das intensidades medidas vs. tempos de relaxação (T), empregando uma função de decaimento monoexponencial de dois parâmetros, descrita na Equação 1 a seguir (STONE et al., 1992):

$$I(T) = I_0 \exp(-R_{1,2}T)$$

Onde $I(T)$ refere-se à intensidade após um intervalo de tempo (T) e I_0 é a intensidade no tempo zero.

Para determinar os valores dos $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N NOE utilizou-se a razão entre as intensidades dos picos presentes no espectro coletado com saturação dos hidrogênios (I_{sat}) e o coletado sem saturação (I_{ref}), conforme a Equação 2 abaixo:

$$NOE = I_{sat}/I_{ref}$$

Os erros experimentais foram calculados a partir do desvio-padrão do ruído em relação às intensidades de ressonância aferidas nos tempos de relaxação correspondentes ao meio dos experimentos de R_1 e de R_2 (Equação 3). No caso do $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N NOE (Equação 4), o desvio-padrão das intensidades do ruído observadas nos espectros saturado e de referência foram utilizadas. Aproximadamente 1500 picos, positivos e negativos, foram selecionados para o cálculo do desvio-padrão. Apenas picos do ruído que não estavam próximos dos sinais referentes à CRABP2 ou próximos ao sinal da água (5,5 – 6ppm) foram utilizados (FARROW et al., 1994).

Equação 3:

$$Erro = \left(\frac{1}{\text{Tempo de Relaxação (s)}} \right) \times \frac{\text{Desvio padrão}_{\text{Ruído}}}{\text{Intensidade}_{\text{CRABP2}}}$$

Onde *Tempo de Relaxação (s)* é o tempo de relaxação referente ao meio do experimento escolhido, o *Desvio padrão_{Ruído}* é o desvio-padrão calculado para o ruído no tempo de relaxação escolhido e a *Intensidade_{CRABP2}* é a intensidade dos picos referentes aos resíduos de CRABP2 no espectro do mesmo tempo de relaxação em que os picos do ruído foram obtidos.

Equação 4:

$$\text{Erro} = \left(\left(\frac{\text{Desvio padrão}_{\text{Ruído}}^{\text{Sat}}}{\text{Intensidade}_{\text{Sat}}} \right)^2 + \left(\frac{\text{Desvio padrão}_{\text{Ruído}}^{\text{Ref}}}{\text{Intensidade}_{\text{Ref}}} \right)^2 \right)^{1/2}$$

Onde *Desvio padrão_{Ruído}^{Sat}* é o desvio-padrão calculado para o ruído no espectro saturado, *Intensidade_{Sat}* é a intensidade dos picos referentes aos resíduos de CRABP2 no espectro saturado, *Desvio padrão_{Ruído}^{Ref}* é o desvio-padrão calculado para o ruído no espectro referência e *Intensidade_{Ref}* é a intensidade dos picos referentes aos resíduos de CRABP2 no espectro referência.

3.2.7 Estimativa do tempo de correlação rotacional (τ_c)

Os valores de τ_c (ns) foram calculados para CRABP2 na presença e na ausência de AR a partir dos valores médios de T_1 e T_2 (s), considerando apenas os resíduos envolvidos em estrutura secundária, obtidos em cada concentração de proteína. A Equação 5 foi utilizada:

$$\tau_c \approx \frac{1}{4\pi\nu_N} \sqrt{6 \frac{T_1}{T_2} - 7}$$

Onde ν_N é a frequência de ressonância do núcleo de ^{15}N (em Hz) e T_1 e T_2 são os valores médios das taxas de relaxação do núcleo de ^{15}N para os resíduos de CRABP2 envolvidos em estrutura secundária (KAY; TORCHIA; BAX, 1989).

3.2.8 Dispersão de relaxação via CPMG (^{15}N)

A dinâmica intermediária (μs - ms) da cadeia principal de apo e holo-CRABP2 foi caracterizada a partir da medida de dispersão de relaxação do núcleo de ^{15}N via experimentos de CPMG. Os experimentos de CPMG foram coletados a 25 °C e utilizando amostras de

CRABP2 livre e ligada a AR purificadas e isotopicamente enriquecidas com ^{15}N [NaP 20 mM, NaCl 150 mM, DTT 5 mM (pH 7,4) e 5% (v/v) de D₂O] em espectrômetros Bruker Avance III 800 e Bruker 900 MHz equipados com sondas TXI 900 MHz S6 e TXI 800 MHz 5mm, respectivamente (CNRMN/UFRJ). A concentração das amostras de CRABP2 livre e ligada a AR foi de 1 mM.

As taxas de relaxação experimental (R_{2eff}) foram obtidos a partir de espectros 2D ^1H - ^{15}N HSQC adquiridos em campos magnéticos de 800 e 900 MHz. As frequências de CPMG (ν_{CPMG}) de 66,7, 133,3, 200, 266,7, 333,3, 466,7, 600, 733,3, 866,7 e 1000 Hz e o tempo de evolução da magnetização transversal de 30 ms (T_{relax}) foram utilizados. Para cada valor de ν_{CPMG} , um único espectro foi adquirido (T fixo) e o valor de intensidade de cada ressonância foi medido. Um espectro de referência foi adquirido a T=0 e forneceu os valores de intensidade I_0 . Os resíduos que apresentaram sobreposição de sinais nos espectros 2D ^1H - ^{15}N HSQC adquiridos nos diferentes campos foram removidos da análise.

Para cada resíduo foi calculada uma taxa de relaxação experimental (R_{2eff}) utilizando as intensidades obtidas nos espectros 2D ^1H - ^{15}N HSQC adquiridos com diferentes ν_{CPMG} a partir da Equação 6:

$$R_{2eff}(\nu_{CPMG}) = -1/T_{relax} \ln (I_{CPMG}/I_0)$$

Onde $\nu_{CPMG} = 1/2\tau$ (τ corresponde ao intervalo entre pulsos de refoco sucessivos), T_{relax} é o tempo de relaxação (30 s), I_1 do I_{CPMG} é a intensidade do pico nas diferentes ν_{CPMG} empregadas e I_0 é a intensidade do pico quando $\nu_{CPMG} = 0$.

Os valores de R_{2eff} obtidos foram plotados em função dos valores de ν_{CPMG} utilizados e, para os resíduos que apresentaram troca conformacional nesta escala de tempo, foi observada a diminuição de R_{2eff} em função do aumento de ν_{CPMG} . Os erros experimentais foram calculados a partir do desvio-padrão do ruído em relação às intensidades de ressonância aferidas na $\nu_{CPMG} = 466,7$ Hz através da Equação 7:

$$|\Delta R_{2eff}^{exp}| = \frac{1}{T} \frac{\sigma}{I_{CPMG}}$$

Onde σ é o desvio padrão do ruído obtido com a $\nu_{CPMG} = 466,7$ Hz, I_{CPMG} é a intensidade dos picos de CRABP2 aferidas na $\nu_{CPMG} = 466,7$ Hz e T é o tempo de evolução da magnetização transversal.

Os dados foram adquiridos, processados e analisados com o auxílio dos programas Topspin 3.1 (Bruker Biospin), NMRPipe (DELAGLIO et al., 1995), CCPNmr (VRANKEN et al., 2005) e ccpn2cpmg (desenvolvido pelo professor Adolfo H. de Moraes, Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil).

3.2.9 Análise dos dados de dispersão de relaxação via CPMG (^{15}N)

Os resíduos de CRABP2 livre e em complexo com AR foram ajustados individualmente a equação de Carver-Richards (CARVER; RICHARDS, 1972) para um sistema em troca entre duas conformações utilizando um algoritmo Levenberg–Marquardt. Visando a realização de um ajuste global, os resíduos que apresentaram constantes de troca (k_{ex}) e percentuais das duas conformações (p_A e p_B) semelhantes foram incluídos em um mesmo grupo. A qualidade dos grupos formados foi realizada utilizando o Critério de Informação Bayesiano (*Bayesian Information Criterion - BIC*) para comparar a qualidade dos ajustes individuais e globais utilizando $\Delta\text{BIC} = \text{BIC}_{\text{grupo}} - \text{BIC}_{\text{individual}}$ (KUMAR et al., 2018). Algumas rodadas de refinamento do ajuste global foram realizadas e apenas os resíduos que apresentaram valores de $\Delta\text{BIC} < 1$ foram mantidos nos grupos. Para CRABP2 livre, os grupos também foram refinados através de uma operação *jackknife*. Uma vez que um grupo de 16 resíduos foi identificado, uma operação *jackknife* final foi realizada a partir de 1000 ajustes utilizando 8 resíduos randomicamente selecionados no grupo de 16 visando o cálculo do erro.

3.2.10 Medidas de perturbação de deslocamento químico (CSP)

Experimentos de titulação por RMN foram realizados para o estudo da auto associação do complexo AR:CRABP2 e para verificar a interação entre CRABP2 e AR.

Para o estudo da auto associação de CRABP2, espectros 2D ^1H - ^{15}N HSQC de ^{15}N AR:CRABP2 [NaP 20 mM, NaCl 50 mM, TCEP 0.5 mM (pH 6,8) e 5% (v/v) de D2O] foram coletados a 25 °C e utilizando concentrações crescentes do complexo (10, 20, 40, 60, 80, 100, 125, 150, 200, 250, 300, 400, 500 e 800 μM) em espectrômetro Bruker NEO 600 MHz equipado com criossonda TCI HCN (Universidade do Arizona - EUA).

Para verificar a interação de CRABP2 com AR, ^{15}N CRABP2 livre (50 μM) [NaP 20 mM, NaCl 50 mM, TCEP 0.5 mM (pH 6,8) e 5% (v/v) de D2O] foi titulada com AR (100% de DMSO). Espectros 2D ^1H - ^{15}N HSQC foram adquiridos a 25 °C e em razões molares crescentes de $[\text{AR}]/[^{15}\text{N} \text{ CRABP2 livre}]$ (0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 1, 1.25, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5 e 4) em espectrômetro Bruker NEO 600 MHz equipado com criossonda TCI HCN (Universidade

do Arizona - EUA). A superfície de interação entre CRABP2 e AR foi identificada observando-se as diferenças induzidas pelo ligante (razão molar 1:4) em relação a proteína livre.

3.2.11 Análise das medidas de perturbação de deslocamento químico (CSP)

As mudanças de deslocamento químico dos sinais de ressonância observadas ao longo dos diferentes experimentos de titulação foram quantificadas através das medidas de perturbação do deslocamento químico (*Chemical Shift Perturbation* - CSP). Os CSPs foram calculados (Equação 8) para cada resíduo com o auxílio do programa CCPNmr 2.4.2 (VRANKEN et al., 2005). O desvio-padrão também foi calculado levando em consideração todos os valores de CSP calculados.

Equação 8:

$$\Delta\delta = \left((\Delta\omega_H)^2 + \left(\Delta\omega_N / 6.66 \right)^2 \right)^{1/2}$$

Onde $\Delta\omega_H$ e $\Delta\omega_N$ são referentes aos CSPs observados para as dimensões ^1H e ^{15}N , respectivamente.

As médias e os respectivos desvios-padrão foram calculados levando em consideração os valores de CSP em cada experimento.

4 RESULTADOS

4.1 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE CRABP2

A expressão heteróloga e a purificação de CRABP2 fusionada a cauda T7 (pET-17b) já havia sido descrita na literatura (WANG; LI; YAN, 1997). Porém, no presente trabalho, CRABP2 foi fusionada a cauda Tio₆His₆TEV e a expressão da proteína recombinante foi avaliada na cepa BL21(DE3) de *E. coli*, nas condições descritas previamente na literatura (0,4 mM de IPTG, DO₆₀₀ ~ 0.6 e 5 h de crescimento a 30 °C e 200 rpm após a adição do indutor) e na condição descrita no **item 3.2.1.2**, tendo sido esta última a escolhida como melhor condição de expressão. Foi verificado o enriquecimento de uma banda eletroforética na massa esperada para a construção Tio₆His₆TEV-CRABP2 (~16 KDa) após indução a 18 °C durante 24 h (**Figura 18**).

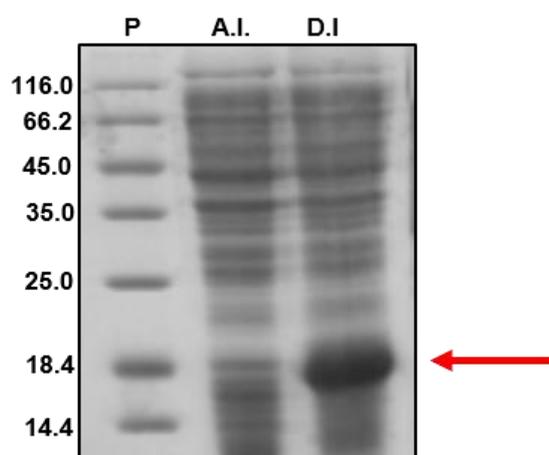


Figura 18: Expressão heteróloga de CRABP2. SDS-PAGE referente à expressão da proteína recombinante utilizando *E. coli* BL21(DE3), 0,4 mM de IPTG, DO₆₀₀ ~ 0.6 e 24 h de indução a 18 °C. A banda eletroforética referente à proteína recombinante está indicada com uma seta vermelha. P – Padrão de massa molecular; A.I. – Antes da adição de IPTG; D.I. – 24h após a adição de IPTG.

A proteína recombinante foi obtida com alto grau de homogeneidade em 3 passos de purificação:

- 1ª etapa de cromatografia de afinidade a níquel: o sobrenadante obtido com a lise celular foi aplicado em uma coluna de Ni²⁺ e Tio₆His₆TEV-CRABP2 foi eluída com ~100 mM imidazol em gradiente linear de 0–500 mM parcialmente purificada. As frações que continham Tio₆His₆TEV-CRABP2 foram reunidas e a amostra foi incubada com a protease TEV nas condições descritas no **item 3.2.1.3.3**.

- 2ª cromatografia de afinidade a níquel: após a remoção da cauda Tio₆His₆TEV, CRABP2 foi submetida a uma segunda etapa de cromatografia de afinidade a níquel para separar a proteína clivada da cauda Tio₆His₆TEV e da protease His₆-TEV.
- Cromatografia de exclusão molecular: foi realizada uma terceira etapa de polimento por cromatografia de exclusão molecular onde CRABP2 foi obtida em sua forma monomérica e com alto grau de homogeneidade. As frações referentes a CRABP2 foram reunidas e concentradas até ~1 mM para a realização dos experimentos de RMN.

A **Figura 19** reúne os cromatogramas e as análises por SDS-PAGE de todas as etapas de purificação de CRABP2.

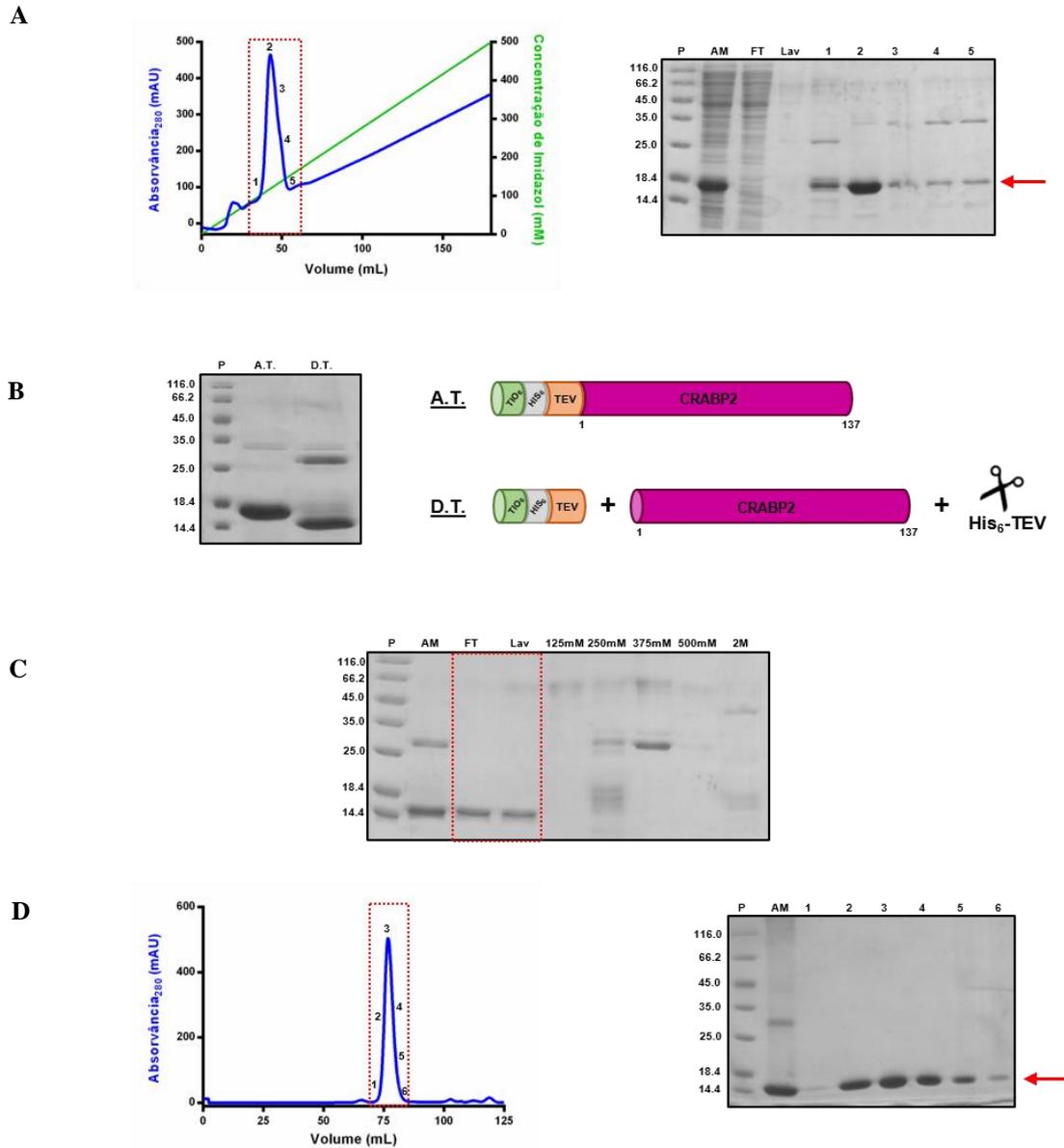


Figura 19: Etapas de Purificação de CRABP2. (A) 1ª Etapa de Cromatografia de Afinidade a Níquel: à esquerda, o cromatograma referente a purificação. O pico onde CRABP2 foi eluída está destacado em vermelho e as frações analisadas por SDS-PAGE estão indicadas por números. À direita, o gel de SDS-PAGE contendo: P- Padrão de massa molecular; AM – amostra aplicada na coluna; FT – fração não ligada à coluna; Lav – Lavagem com tampão A; 1, 2, 3, 4, e 5 – frações do pico de eluição. Uma seta vermelha está indicando a banda referente à proteína de interesse. (B) Remoção da cauda de expressão/purificação: à esquerda, o gel de SDS-PAGE contendo a amostra referente a primeira cromatografia antes da incubação com TEV (A.T.) e após 3 dias de incubação (D.T.). À direita, um esquema representando a etapa de remoção da cauda Tio₆His₆TEV – A.T. (antes da incubação com TEV) e D.T. (após 3 dias de incubação). (C) SDS-PAGE referente à 2ª Etapa de Cromatografia de Afinidade a Níquel: P- Padrão de massa molecular; AM – amostra aplicada na coluna; FT – fração não ligada à coluna; Lav – Lavagem com tampão A; 125mM, 250 mM, 375 mM, 500 mM e 2M – concentrações de imidazol referente aos degraus de eluição. (D) Cromatografia de Exclusão Molecular: à esquerda, o cromatograma referente a esta etapa de purificação. O pico onde CRABP2 foi eluída está destacado em vermelho, e as frações analisadas por SDS-PAGE estão indicadas por números. À direita, o gel de SDS-PAGE contendo: P- Padrão de massa molecular; AM – amostra aplicada na coluna; 1, 2, 3, 4, 5 e 6 – frações do pico de eluição. Uma seta vermelha está indicando a banda referente a proteína de interesse.

4.2 ASSINALAMENTO SEQUENCIAL DAS RESSONÂNCIAS DE CRABP2 LIVRE E DO COMPLEXO AR:CRABP2

A primeira etapa deste trabalho foi verificar o assinalamento sequencial das ressonâncias de ^1H , ^{15}N e ^{13}C da cadeia principal de CRABP2 livre (BMRB 4186) e do complexo AR:CRABP2 (WANG et al., 1998), uma vez que essas informações são necessárias para os estudos de dinâmica e interação por RMN e apenas o assinalamento da proteína livre encontra-se disponível no *Biological Magnetic Resonance Bank* (BMRB).

Foi realizado o assinalamento sequencial de ~90% das ressonâncias dos átomos da cadeia principal de CRABP2 livre (excetuando-se as 4 prolínas) (**Figura 20**). O espectro 2D ^1H - ^{15}N HSQC da proteína livre apresentou sinais com intensidades heterogêneas e larguras de linha variadas. Cerca de 100 resíduos apresentaram intensidade forte tanto no espectro 2D ^1H - ^{15}N HSQC quanto nos experimentos 3D e foram facilmente identificados. O restante dos resíduos apresentou picos fracos ou não detectáveis em todos os experimentos realizados. As causas mais comuns de alargamento dos sinais de RMN são eventos de troca conformacional e/ou troca do ^1H amídico com o solvente. Como foi observada a agregação de apo-CRABP2 em pHs ácidos, não foi possível realizar experimentos em um pH que minimizasse as trocas do ^1H amídico com o solvente. Já foi verificado anteriormente para iLBPs que o alargamento dos sinais é decorrente de eventos de troca conformacional que acontecem em uma escala de tempo intermediária na escala de RMN (μs -ms) (WANG et al., 1998), sugerindo que alguns dos resíduos que apresentaram intensidade diminuída experimentam dinâmica na escala de tempo de μs -ms.

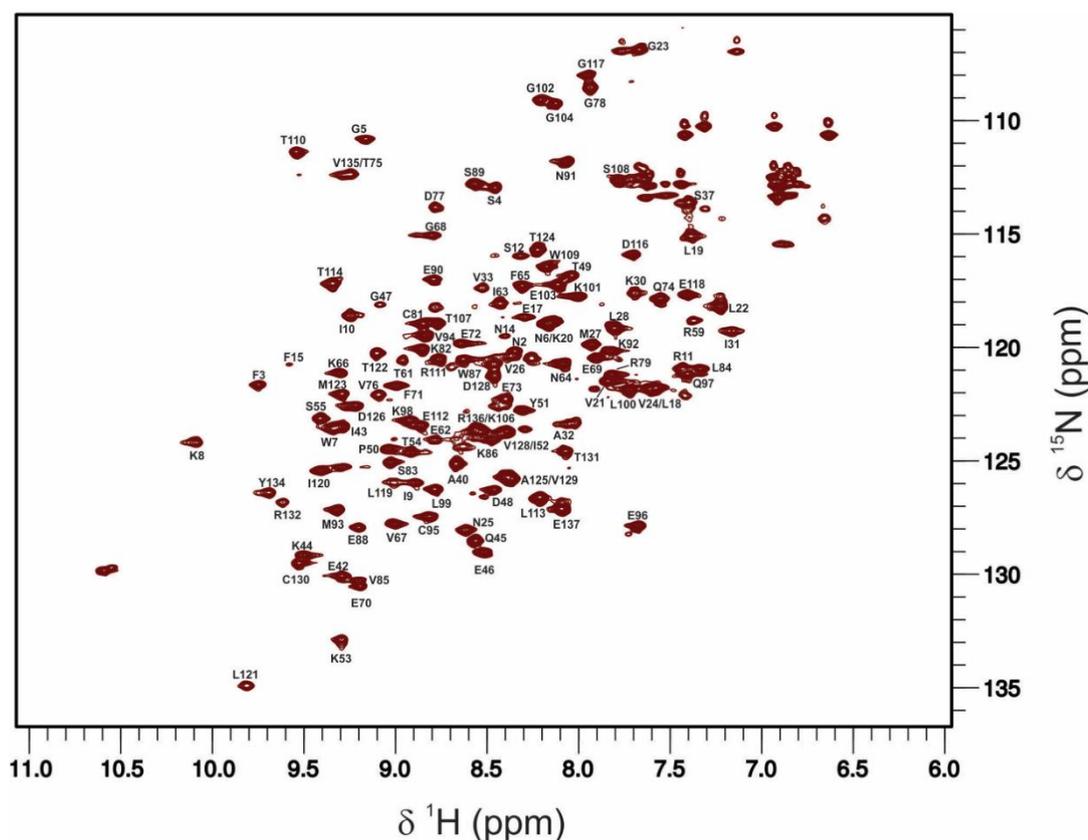


Figura 20: Espectro 2D ^1H - ^{15}N HSQC de apo-CRABP2 assinalado. Cada pico de correlação ^1H - ^{15}N amídico assinalado neste trabalho está identificado com o nome do resíduo (código de uma letra) e o número correspondente ao aminoácido na sequência proteica no espectro 2D ^1H - ^{15}N HSQC obtido para a proteína livre. O espectro foi adquirido com ~ 1 mM de apo-CRABP2 em tampão fosfato de sódio 20 mM (pH 7.3), NaCl 150 mM, DTT 5 mM e 10% de D_2O , a 25°C e em um espectrômetro Bruker 900 MHz.

Alguns resíduos foram identificados com base no assinalamento do complexo AR:CRABP2 realizado neste trabalho e no assinalamento do mutante R111M de apo-CRABP2 disponível na literatura (WANG; YAN, 1998). Os 14 resíduos de apo-CRABP2 não assinalados no presente trabalho foram: Glu13 (βA), Glu16 (α1), Arg29 (α2), Ala34-Ala36 (α2), Lys38 (α2 - βB), Val41 (βB), Thr56-Val58 (βC - βD), Thr60 (βD), Asn115 (βH - βI) e Val133 (βJ) (**Figura 21**). Destes resíduos, 5 foram previamente relacionados a interação direta com AR (Ala35, Ala36, Val41, Thr56 e Val58) (KLEYWEGT et al., 1994).



Figura 21: Resíduos de apo-CRABP2 não assinalados neste trabalho. (A) Sequência primária de CRABP2 (1-137) onde os resíduos não assinalados neste trabalho estão coloridos em bege e as prolinas estão indicadas em vermelho. (B) Os 14 resíduos de apo-CRABP2 não assinalados (Glu13 (β A), Glu16 (α 1), Arg29 (α 2), Ala34-Ala36 (α 2), Lys38 (α 2- β B), Val41 (β B), Thr56-Val58 (β C- β D), Thr60 (β D), Asn115 (β H- β I) e Val133 (β J)) estão coloridos em bege na estrutura cristalográfica da proteína livre (PDB 2FS6) (cinza). A figura da direita está girada de 180° em y em relação a figura da esquerda.

Para o complexo AR:CRABP2, foi possível assinalar ~95% das ressonâncias dos átomos da cadeia principal (excetuando-se as 4 prolinas) (**Figura 22**). Apenas 7 resíduos não foram identificados, são eles: Glu13 (β A), Phe15-Glu17 (α 1), Gly47 (β B- β C), Thr57 (β C- β D) e Thr60 (β D) (**Figura 23**). Destes resíduos, 5 também não haviam sido assinalados previamente na literatura (Glu13, Glu17, Glu18, Gly47 e Thr57) (WANG; YAN, 1999). A adição de AR levou a um aumento consistente da intensidade dos picos nos experimentos 2D ^1H - ^{15}N HSQC e nos experimentos 3D, facilitando o processo de assinalamento das ressonâncias. O aumento da intensidade observado na presença de AR é indicativo da supressão dos eventos de troca conformacional que acontecem na escala de μs -ms na presença do ligante, sugerindo que a

dinâmica intermediária dessas proteínas é modulada pela interação com o ligante (WANG et al., 1998).

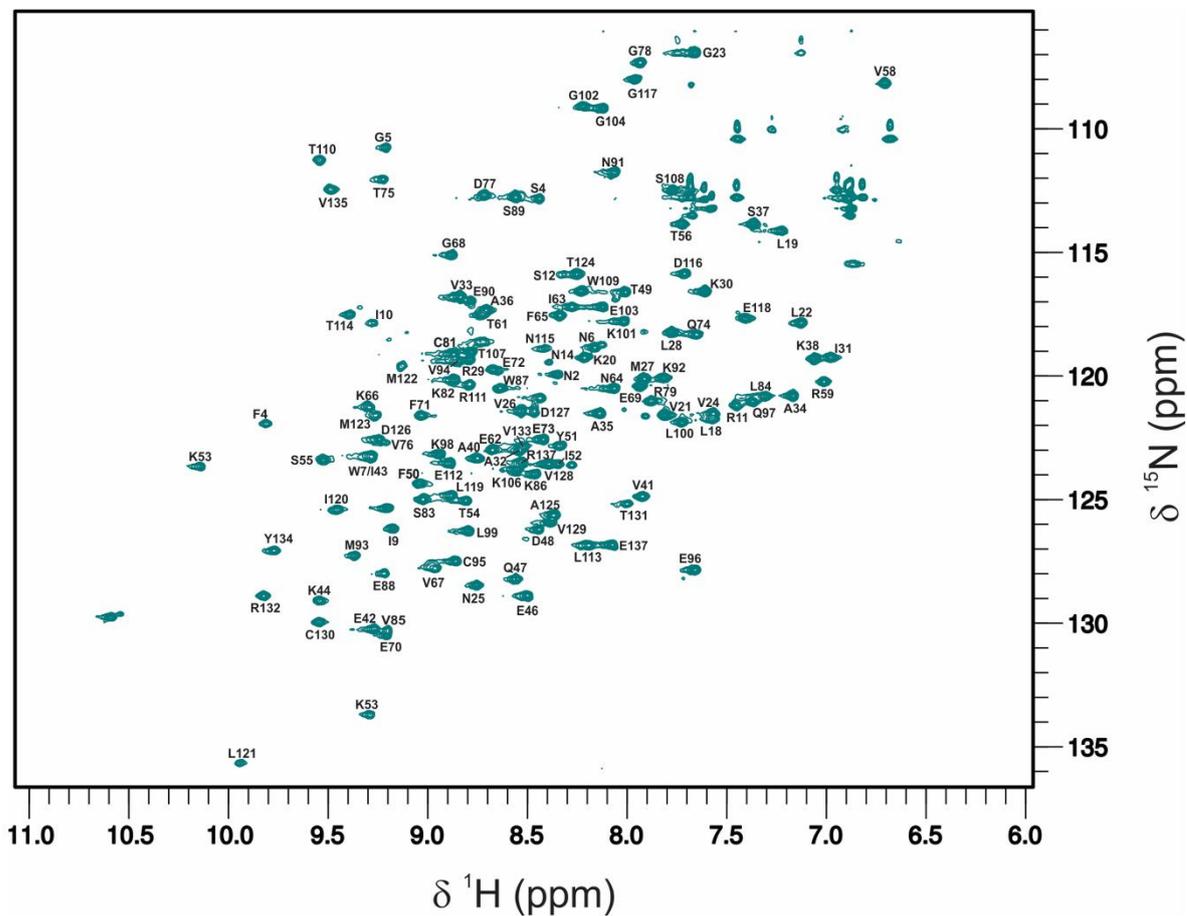


Figura 22: Espectro 2D ^1H - ^{15}N HSQC de holo-CRABP2 assinalado. Cada pico de correlação ^1H - ^{15}N amídico assinalado neste trabalho está identificado com o nome do resíduo (código de uma letra) e o número correspondente ao aminoácido na sequência proteica no espectro 2D ^1H - ^{15}N HSQC obtido para a proteína ligada a AR. O ensaio foi realizado com ~ 1 mM de CRABP2 e 1.5 mM de AR em tampão fosfato de sódio 20 mM (pH 7.3), NaCl 150 mM, DTT 5 mM e 10% de D_2O , a 25°C e em um espectrômetro Bruker 900 MHz.

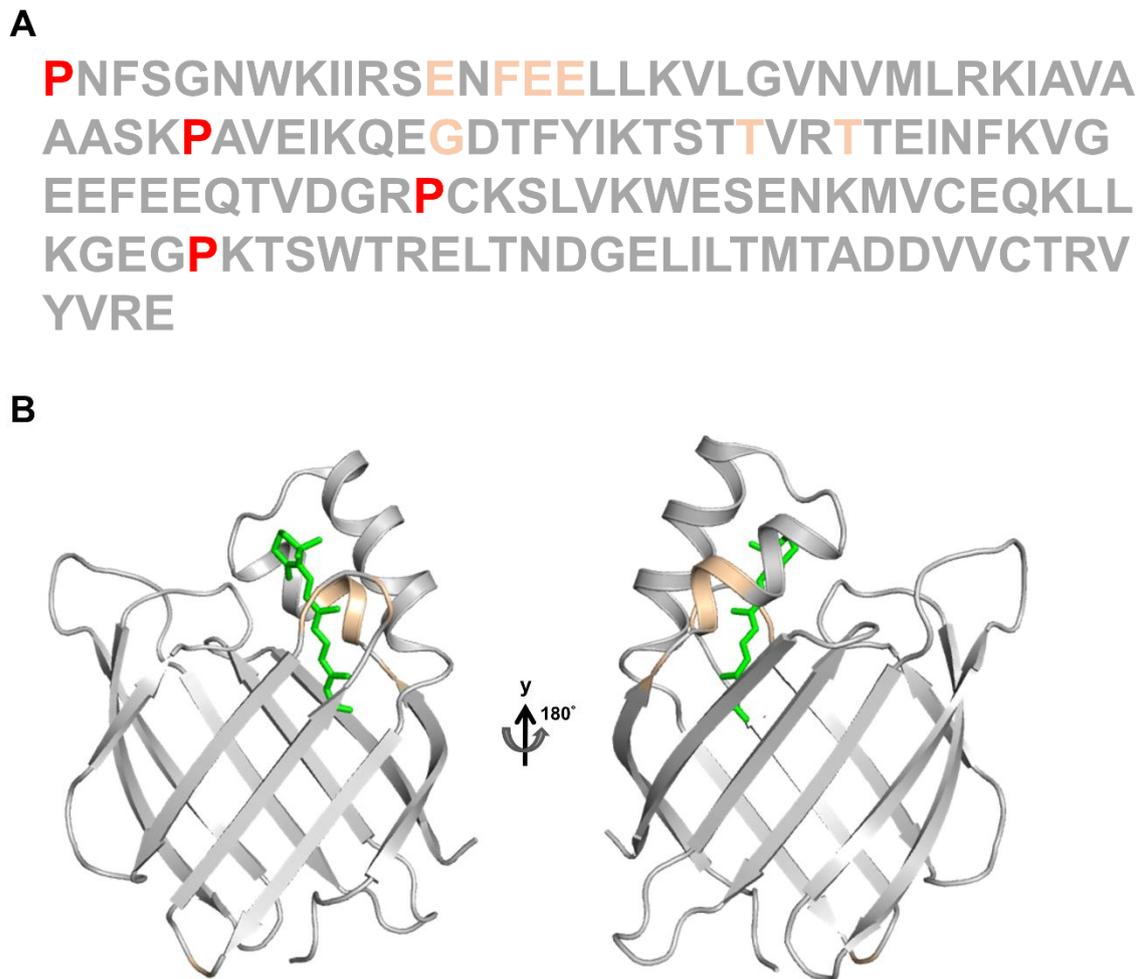


Figura 23: Resíduos de holo-CRABP2 não assinalados neste trabalho. (A) Sequência primária de CRABP2 (1-137) onde os resíduos não assinalados neste trabalho estão coloridos em bege e as prolinas estão indicadas em vermelho. (B) Os 7 resíduos de holo-CRABP2 não assinalados no presente trabalho (Glu13 (β A), Phe15-Glu17 (α 1), Gly47 (β B- β C), Thr57 (β C- β D) e Thr60 (β D)) estão coloridos em bege na estrutura cristalográfica do complexo AR:CRABP2 (PDB 2FR3) (cinza). O AR está representado em verde. A figura da direita está girada de 180° em y em relação a figura da esquerda.

Com o intuito de garantir que as diferenças observadas entre apo e holo-CRABP2 não foram causadas pela interação entre a proteína e o solvente utilizado para a solubilização do AR (DMSO 100%), um espectro 2D ^1H - ^{15}N HSQC foi adquirido para CRABP2 adicionada de um volume de DMSO correspondente ao utilizado na amostra com AR. Como pode ser verificado na **Figura 24**, o espectro obtido para a proteína livre é similar ao observado para a proteína na presença de DMSO, indicando que as diferenças observadas entre os espectros de apo e holo-CRABP2 foram originados pela interação entre CRABP2 e AR.

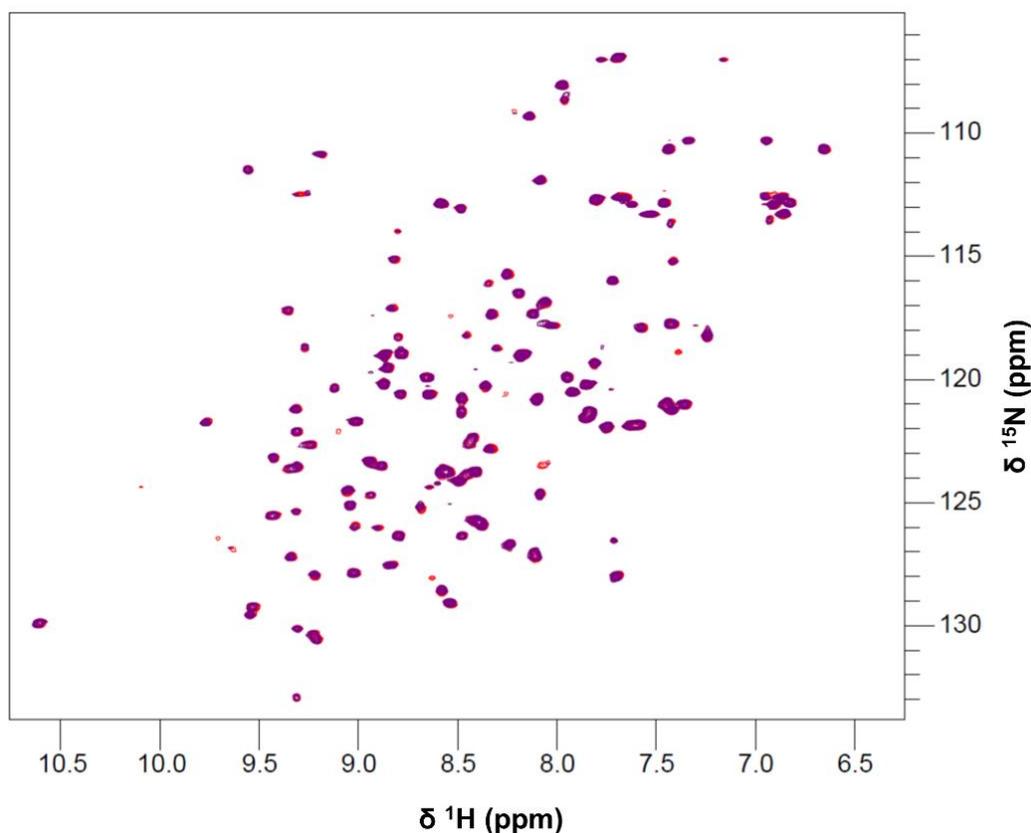


Figura 24: Sobreposição dos espectros 2D [^1H , ^{15}N] HSQC de CRABP2 livre e na presença de DMSO. Os sinais em vermelho são referentes a CRABP2 livre e os sinais em roxo a proteína na presença de DMSO (1% v/v). O ensaio foi realizado com ~ 0.2 mM de apo-CRABP2 e 1% v/v de DMSO em tampão fosfato de sódio 20 mM, NaCl 150 mM, DTT 5 mM (pH 7.3) e 10% de D_2O , a 25°C e em um espectrômetro Bruker 900 MHz.

4.3 PREDIÇÃO DA ESTRUTURA SECUNDÁRIA DE APO E HOLO-CRABP2

Os elementos de estrutura secundária preditos com base nos deslocamentos químicos obtidos neste trabalho, utilizando o programa Talos-N, para CRABP2 livre e ligada a AR estão representados na **Figura 25A**. De maneira geral, não é observada uma modificação significativa de conformação com a interação com o AR, porém algumas regiões apresentam diferenças na presença e na ausência de ligante. Para CRABP2 livre, os resíduos da hélice 1, que faz parte da região do portal de acesso ao sítio de interação com AR, apresentam ângulos de diedro característicos de α -hélice, mas após a interação com o ligante não foi mais possível assinalar a sua porção N-terminal (Phe15-Glu17). Além disso, a fita βE praticamente não apresenta ângulos de diedro característicos de fita- β na ausência de AR, mas os adquire na presença do ligante. Da estrutura cristalográfica de holo-CRABP2 sabe-se que a interação com o ligante leva a formação de uma ligação de H entre Arg59 (βD) e Gln74 (βE), que estabiliza de maneira

simultânea a alça β E- β F que faz parte da região do portal e a porção C-terminal da fita β E que faz parte do *gap* (KLEYWEGT et al., 1994) (**Figura 25B**).

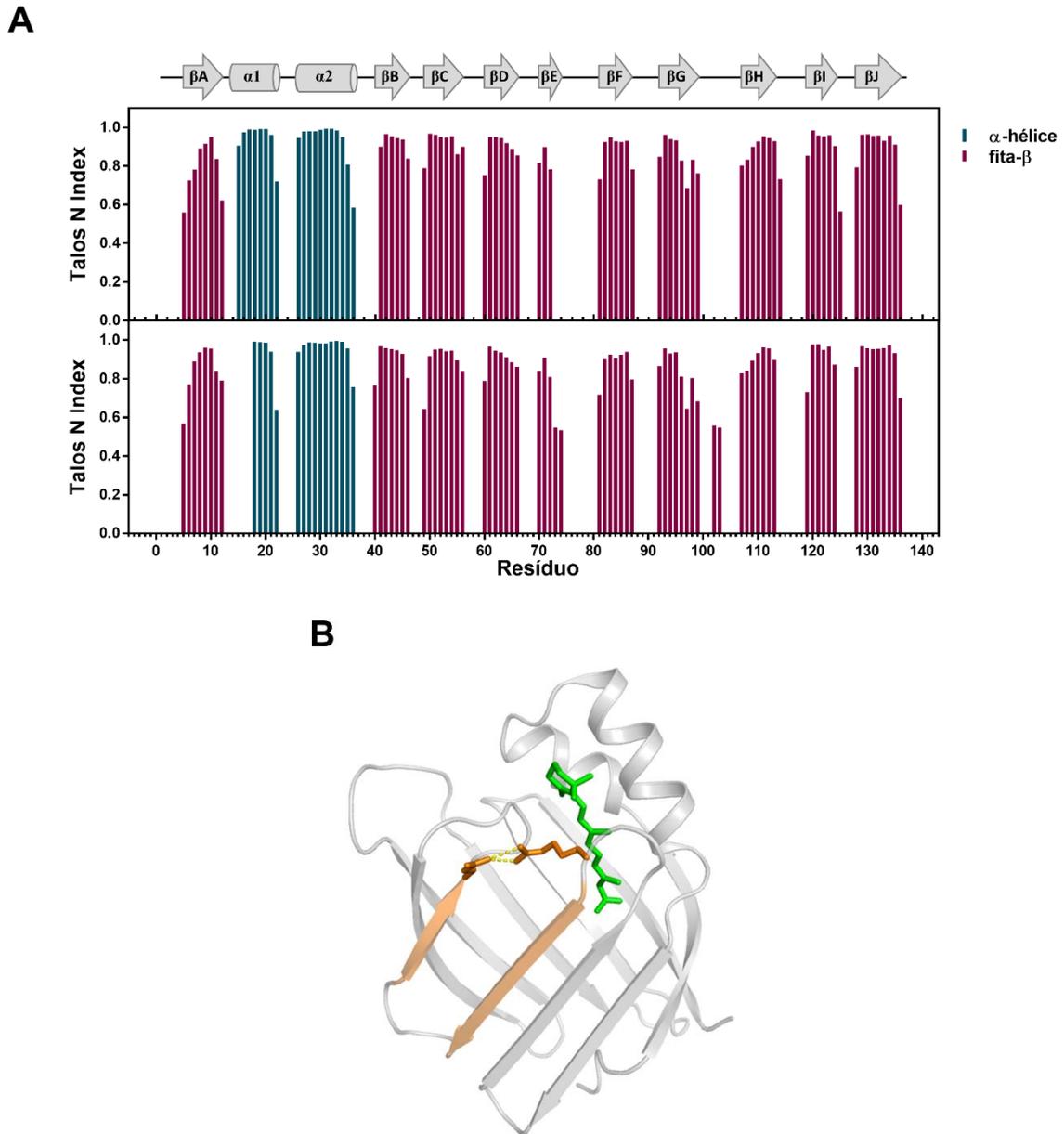


Figura 25: Predição de estrutura secundária para apo e holo-CRABP2 (Talos N). (A) Os valores de Talos N index obtidos a partir dos valores de deslocamento químico de H^N , N , C^α e C^β estão representados em função dos resíduos de CRABP2. A altura das barras (Talos N index de 0-1) reflete a probabilidade da predição realizada. As barras na cor vinho são referentes a predição de estrutura secundária do tipo fita- β e as barras em verde estão relacionadas a estrutura secundária do tipo α -hélice. Os elementos de estrutura secundária referentes a estrutura cristalográfica de holo-CRABP2 (PDB 2FR3) estão indicados na parte superior da figura. As fitas- β estão representadas por setas e as α -hélices por cilindros. (B) Representação da ligação de H estabelecida entre Arg59 (β D) e Gln74 (β E) com a interação entre CRABP2 e AR na estrutura tridimensional de AR:CRABP2 (PDB 2FR3) (cinza), que estabiliza de maneira simultânea a alça β E- β F, que faz parte da região do portal, e a porção C-terminal da fita β E que faz parte da região do *gap*. As fitas β D e β E estão coloridas de laranja. O AR está representado em verde.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE CRABP2 E AR

O AR é um composto altamente hidrofóbico (solubilidade em água ~60 nM) e CRABP2 é responsável por solubilizá-lo no ambiente aquoso citoplasmático e por realizar o seu transporte entre o núcleo e o citoplasma. Experimentos de DSF mostraram que a formação do complexo AR:CRABP2 aumenta a estabilidade térmica de CRABP2 (T_m) em aproximadamente 15 °C (ΔT_m). Enquanto apo-CRABP2 apresenta uma temperatura de fusão (T_m) igual a 55 ± 0.2 °C, o T_m observado para holo-CRABP2 é de 69.9 ± 0.1 °C (**Figura 26**). CRABP2 apresenta uma cavidade interna relativamente grande (~ 600 Å³) em relação ao seu tamanho (137 resíduos) (VASILEIOU et al., 2009). A maior estabilidade do complexo AR:CRABP2 em relação a proteína livre deve-se as múltiplas interações hidrofóbicas e ligações polares adicionais formadas entre CRABP2 e seu ligante e também a compactação da rede de moléculas de água presente no interior da cavidade (VAEZESLAMI et al., 2006; WANG; YAN, 1998) (VAEZESLAMI et al., 2006) (**Figura 7**).

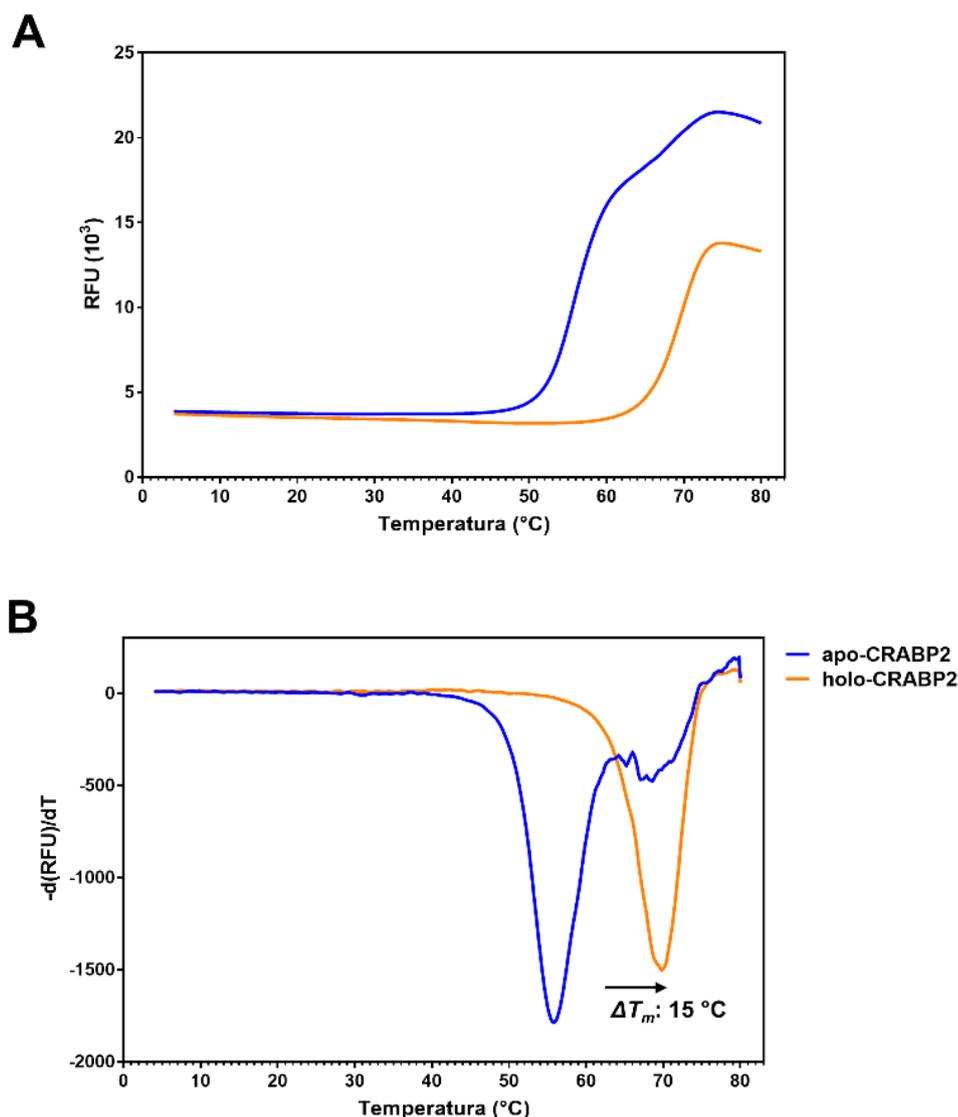


Figura 26: Perfis de desnaturação e estabilidade térmica de apo e holo-CRABP2 aferidos por DSF. (A) Curvas representativas de desnaturação térmica de CRABP2 na presença (laranja) e na ausência de AR (azul). **(B)** Primeira derivada das curvas de desnaturação de apo (azul) e holo-CRABP2 (laranja). A interação com AR aumentou a estabilidade térmica do complexo (T_m) em $\sim 15^\circ\text{C}$ (ΔT_m). Os experimentos foram realizados em tampão NaP 20 mM (pH 6,8), NaCl 50 mM e TCEP 0.5 mM. As concentrações finais de apo/holo-CRABP2 e SYPRO Orange foram 0.15 mg/mL e 2X, respectivamente.

A cinética de interação entre CRABP2 e AR foi avaliada por SPR. A afinidade de interação (K_d) e as taxas de associação e dissociação (k_{on} e k_{off} , respectivamente) foram determinadas e estão apresentadas na **Tabela 4**. Na **Figura 27** está a curva representativa das curvas observadas e dos ajustes obtidos nos experimentos de titulação cinética. A correlação entre os dados obtidos e os ajustes indica que os parâmetros cinéticos obtidos são coerentes. A alta afinidade de ligação, a natureza hidrofóbica do ligante e a taxa de dissociação lenta sugerem que a liberação de AR do sítio de interação seja mediada por fatores externos que gerem mudanças estruturais/dinâmicas em CRABP2.

Tabela 4: Parâmetros cinéticos da interação entre AR e CRABP2 determinados por SPR.

k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	$6.92 \times 10^5 \pm 2.32 \times 10^5$
k_{off} (s^{-1})	$4.01 \times 10^{-3} \pm 1.08 \times 10^{-3}$
K_D (nM)	5.94 ± 0.79
N (replicatas)	4

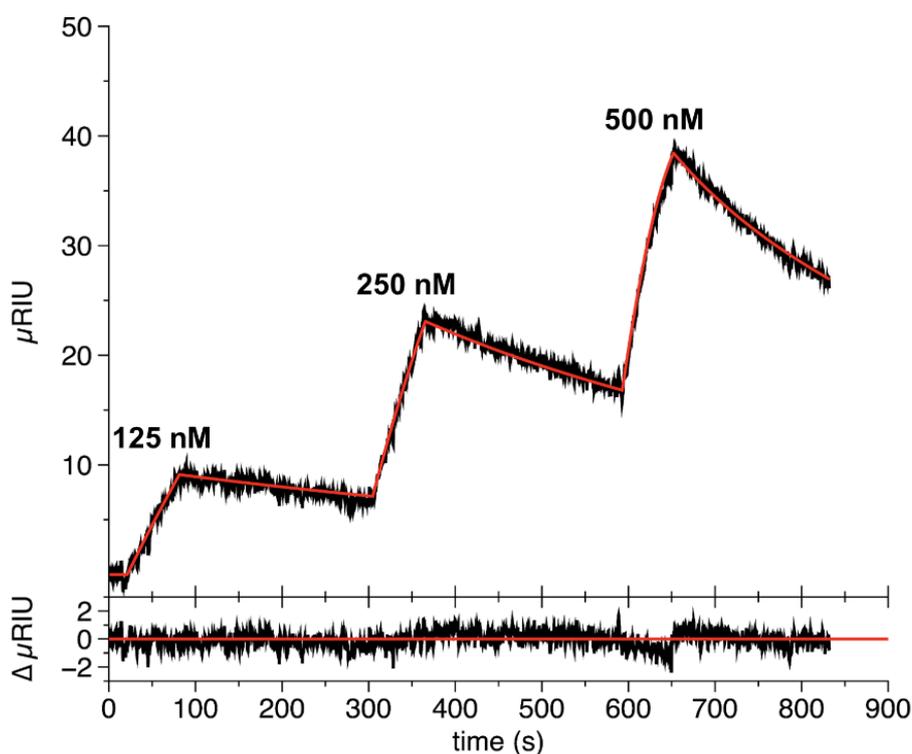


Figura 27: Sensorgrama representativo da caracterização dos parâmetros cinéticos da interação entre CRABP2 e AR por SPR. CRABP2 foi titulada com três concentrações de AR (125, 250 and 500 nM). O experimento foi realizado em quadruplicata em tampão NaP 20 mM (pH 7.4), NaCl 150 mM, TCEP 0.5 mM e Tween 0.05%. O sensorgrama representativo está mostrado no painel superior da figura (μ RIU vs. tempo). Os traços em preto representam os dados experimentais e os traços em vermelho são referentes ao ajuste realizado utilizando um modelo de titulação cinética limitado por transporte de massa. No painel inferior ($\Delta \mu$ RIU vs. tempo) está mostrada a diferença entre os dados experimentais e as curvas calculadas a partir do modelo utilizado.

Com o objetivo de identificar os resíduos de CRABP2 que medeiam a interação com AR, espectros 2D [1H , ^{15}N] HSQC foram adquiridos na presença de concentrações crescentes de AR (**Figura 28**). As medidas de perturbação do deslocamento químico (CSP) causados pela formação do complexo AR:CRABP2 (excesso molar de AR de 4x) em relação a CRABP2 na ausência de ligante foram medidas (**Figura 29A**). Os valores de CSP refletem as mudanças que acontecem no ambiente químico onde os núcleos se encontram (HN e ^{15}N). A medida de CSP

é sensível tanto a alterações na estrutura molecular covalente, quanto a interações não-covalentes, como interações hidrofóbicas e ligações hidrogênio. O mapeamento das mudanças nos ambientes químicos dos núcleos informa acerca dos contatos realizados entre a proteína e diferentes parceiros moleculares/ligantes.

A interação com AR causou CSPs em resíduos presentes em quase todas as regiões de CRABP2, excetuando as fitas β G, β H e a alça β G- β H. A alça β G- β H contém o sítio de SUMOilação (Lys101), responsável pela dissociação de AR:CRABP2 do retículo endoplasmático (MAJUMDAR et al., 2011). Valores de CSP maiores do que 1.5 desvios-padrão foram observados para os resíduos Ile9 (β A), Leu19 (α 1), Val33 (α 2), Ala40 (β B), Arg59 (β C- β D) e Arg132 (β J). Os resíduos Lys30 (α 2), Ile31 (α 2), Thr54 (β C), Glu62 (β D), Ile63 (β D), Gln74 (β E), Asp77 (β E- β F), Gly78 (β E- β F), Leu119 (β I), Leu121 (β I) e Tyr134 (β J) apresentaram valores de CSP entre 0.5 e 1.5 desvios-padrão (**Figura 29B**).

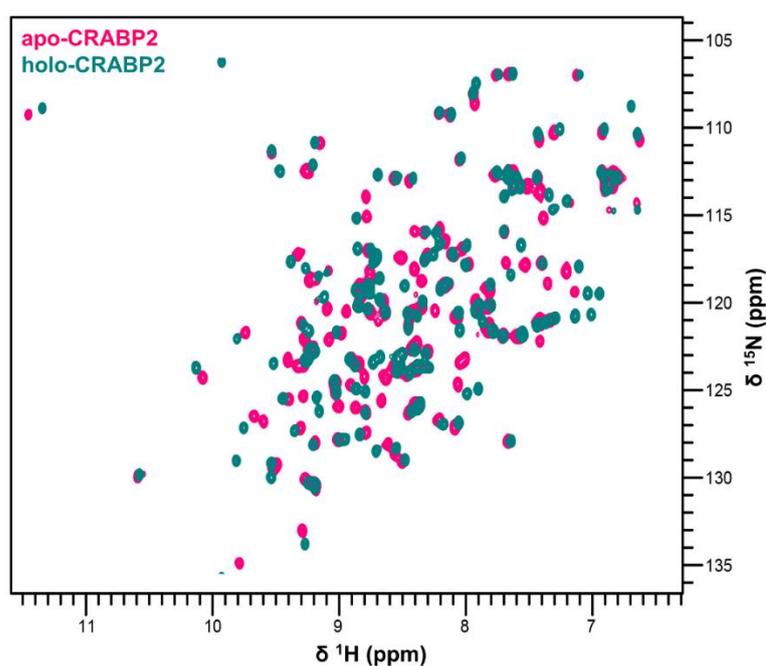


Figura 28: Sobreposição dos espectros 2D [^1H , ^{15}N] HSQC de apo e holo-CRABP2. Os sinais em rosa são referentes a CRABP2 livre e os sinais em verde ao complexo AR:CRABP2 (excesso molar de 4x). Os espectros foram adquiridos com $\sim 50 \mu\text{M}$ de apo/holo-CRABP2 em tampão NaP 20 mM (pH 6,8), NaCl 50 mM e TCEP 0.5 mM e 5% de D_2O , a 25°C e em um espectrômetro Bruker 800 MHz.

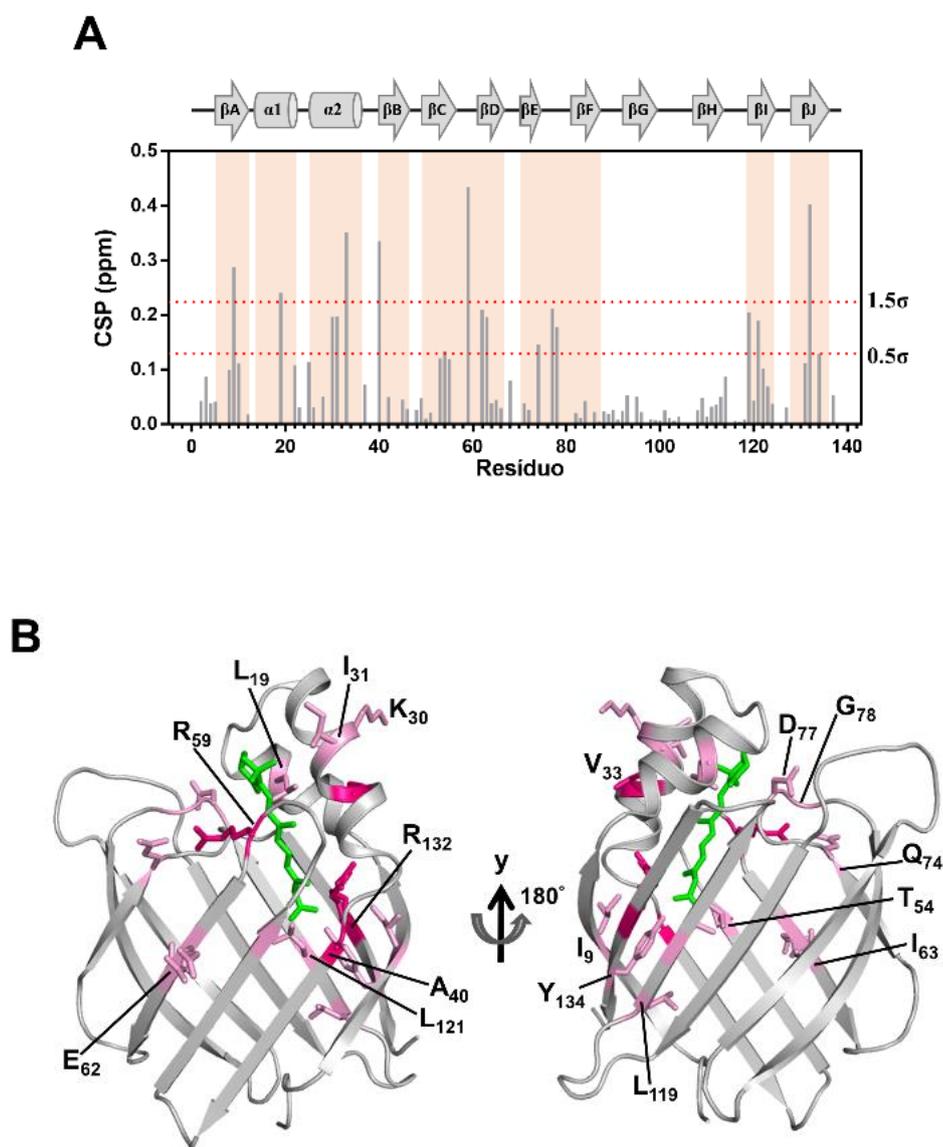


Figura 29: Identificação dos resíduos de CRABP2 que medeiam a interação com AR. (A) Os valores de CSP foram calculados considerando a proteína livre e o complexo AR:CRABP2 (excesso molar de AR de 4x) e estão mostrados em função dos resíduos de CRABP2. As linhas pontilhadas em vermelho indicam os valores 0.5 e 1.5 desvios-padrão acima da média. As regiões de CRABP2 que apresentam CSPs significativos estão destacadas em bege. Os elementos de estrutura secundária referentes a estrutura cristalográfica de holo-CRABP2 (PDB 2FR3) estão indicados na parte superior da figura. As fitas- β estão representadas por setas e as α -hélices por cilindros. (B) Os resíduos que apresentaram valores de CSP estatisticamente significativos estão mapeados na estrutura cristalográfica de holo-CRABP2 (PDB 2FR3) (≥ 1.5 desvios-padrão, rosa escuro; entre 0.5 e 1.5 desvios-padrão, rosa claro). As cadeias laterais estão representadas por bastões e identificadas. AR está representado em verde. A figura da direita está girada de 180° em y em relação a figura da esquerda.

Os resíduos que apresentaram valores de CSP estatisticamente significativos nos experimentos de titulação por RMN foram comparados com os resíduos que interagem com AR na estrutura cristalográfica de AR:CRABP2 (PDB 2FR3). Os resíduos Arg132 e Tyr134, que mostraram valores de CSP estatisticamente relevantes nos experimentos de RMN, realizam contatos diretos com o grupamento carboxilato do AR via uma ponte salina e uma ligação de

hidrogênio na estrutura cristalográfica de holo-CRABP2, respectivamente (VAEZESLAMI et al., 2006) (**Figura 7**). Adicionalmente, os resíduos Leu19, Ile31, Thr54, Arg59, Asp77 e Leu121, que interagem com AR via contatos hidrofóbicos na estrutura cristalográfica do complexo AR:CRABP2 (VAEZESLAMI et al., 2006) (**Figura 12A**), também apresentaram valores de CSP estatisticamente significativos nos experimentos de RMN. Porém, alguns dos resíduos que mostraram valores de CSP significativos, como Ile9, Ile63 e Leu119 não estão envolvidos em contatos diretos com AR na estrutura cristalográfica do complexo AR:CRABP2. As cadeias laterais de Ile9, Ile63 e Leu119 apontam para o interior da cavidade de interação, sugerindo que os CSPs observados para esses resíduos foram possivelmente induzidos por mudanças conformacionais causadas pela interação com o ligante (**Figura 29B**).

Contudo, a comparação das estruturas cristalográficas de apo (PDB 2FS6) (VAEZESLAMI et al., 2006) e holo-CRABP2 (PDB: 2FR3) (VAEZESLAMI et al., 2006) revelou que a conformação das cadeias laterais dos resíduos que encontram-se voltadas para o interior da cavidade de interação, por exemplo, dos resíduos envolvidos na interação com o ligante, é muito semelhante nos dois estados, o que está em desacordo com dados de CSP obtidos neste trabalho (**Figura 12A**). Sendo assim, as mudanças conformacionais observadas não parecem governar de maneira exclusiva o mecanismo de interação entre CRABP2 e AR. A entropia conformacional de CRABP2, ou seja, a distribuição dos estados conformacionais populados pela proteína, deve ter participação tanto na formação do complexo AR:CRABP2 quanto na interação entre CRABP2 e seus diferentes parceiros moleculares. Apesar de algumas cadeias laterais de resíduos presentes na superfície de apo e holo-CRABP2 também apresentarem diferença de conformação entre os dois estados isso ocorre possivelmente devido a diferenças no empacotamento cristalográfico, pois as proteínas foram cristalizadas em diferentes grupos espaciais.

4.5 CARACTERIZAÇÃO DA DINÂMICA RÁPIDA (ps-ns) de CRABP2 LIVRE E DO COMPLEXO AR:CRABP2 POR RMN

Os parâmetros de relaxação T_1 , T_2 e os efeitos nucleares *Overhauser* ^1H - ^{15}N (NOEs) foram utilizados para a caracterização dos movimentos internos da cadeia polipeptídica (ps-ns) de CRABP2 livre e ligada a AR. Os parâmetros de relaxação foram aferidos para apo e holo-CRABP2 em dois campos magnéticos diferentes (800 e 900 MHz). Porém, como eles se

mostraram semelhantes em ambos os campos utilizados, a análise da dinâmica térmica de CRABP2 levou em consideração apenas os valores obtidos a 900 MHz.

Os valores médios dos parâmetros de relaxação bem como os tempos de correlação rotacional globais obtidos para CRABP2 na ausência e na presença de AR estão mostrados na **Tabela 5**. Um aumento global dos valores de R_2 concomitante a uma diminuição global dos valores de R_1 foram observados na presença de AR. O aumento de R_2 simultâneo a diminuição de R_1 indicou que o complexo AR:CRABP2 apresenta uma massa molecular maior do que a proteína livre em solução. A estimativa dos tempos de correlação rotacionais globais (τ_c) de CRABP2 livre (10,4 ns) e do complexo AR:CRABP2 (15,1 ns) confirmou que holo-CRABP2 apresenta um raio hidrodinâmico em solução maior do que apo-CRABP2. A diferença de comportamento entre as formas livre e ligada a AR de CRABP2 não se deve ao aumento da viscosidade da solução na presença do ligante, uma vez que os experimentos foram conduzidos utilizando a mesma concentração de proteína, tampão e temperatura.

Apesar do τ_c estimado em ambos os casos ter sido maior do que o esperado para o monômero de CRABP2 (15.7 kDa; 8-10 ns) (XIAO et al., 2010), o complexo AR:CRABP2 apresentou um tempo de correlação rotacional mais próximo ao que seria esperado para um dímero de CRABP2, sugerindo a possibilidade de autoassociação de pelo menos uma fração de CRABP2 na presença de ligante. Resultados anteriores para CRABP1, a iLBP mais próxima à CRABP2, indicam que tanto as formas livre e ligada a AR dimerizam em solução (KRISHNAN et al., 2000).

Tabela 5: Valores médios dos parâmetros de relaxação e τ_c obtidos para CRABP2 livre e ligada a AR.

Parâmetro	CRABP2	AR:CRABP2
{ ¹ H}- ¹⁵ N NOE	0.82 ± 0.05	0.81 ± 0.06
R_2 (s ⁻¹)	19.45 ± 1.50	29.94 ± 2.72
R_1 (s ⁻¹)	0.8 ± 0.06	0.61 ± 0.04
τ_c (ns)	10.4	15.1

A comparação dos valores dos parâmetros de relaxação obtidos para apo e holo-CRABP2, bem como os erros associados a cada medida, estão representados na **Figura 30**. Para CRABP2 livre, resíduos presentes nas alças $\beta A-\alpha 1$, $\beta C-\beta D$, $\beta E-\beta F$, $\beta G-\beta H$ e na região C-terminal apresentaram dinâmica térmica, ou seja, altos ou baixos valores de R_1 associados a

baixos valores de R_2 e $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N NOE. Essas regiões fazem parte, ou estão próximas, à região do portal de CRABP2 que se mostra altamente flexível na ausência de ligante (WANG; YAN, 1998). No complexo AR:CRABP2, as alças βA - $\alpha 1$, βG - βH e a região C-terminal também se mostraram flexíveis. Porém, alterações nos valores de R_1 de resíduos presentes nas alças βC - βD e βE - βF sugeriram a supressão da dinâmica térmica dessas regiões com a formação do complexo AR:CRABP2.

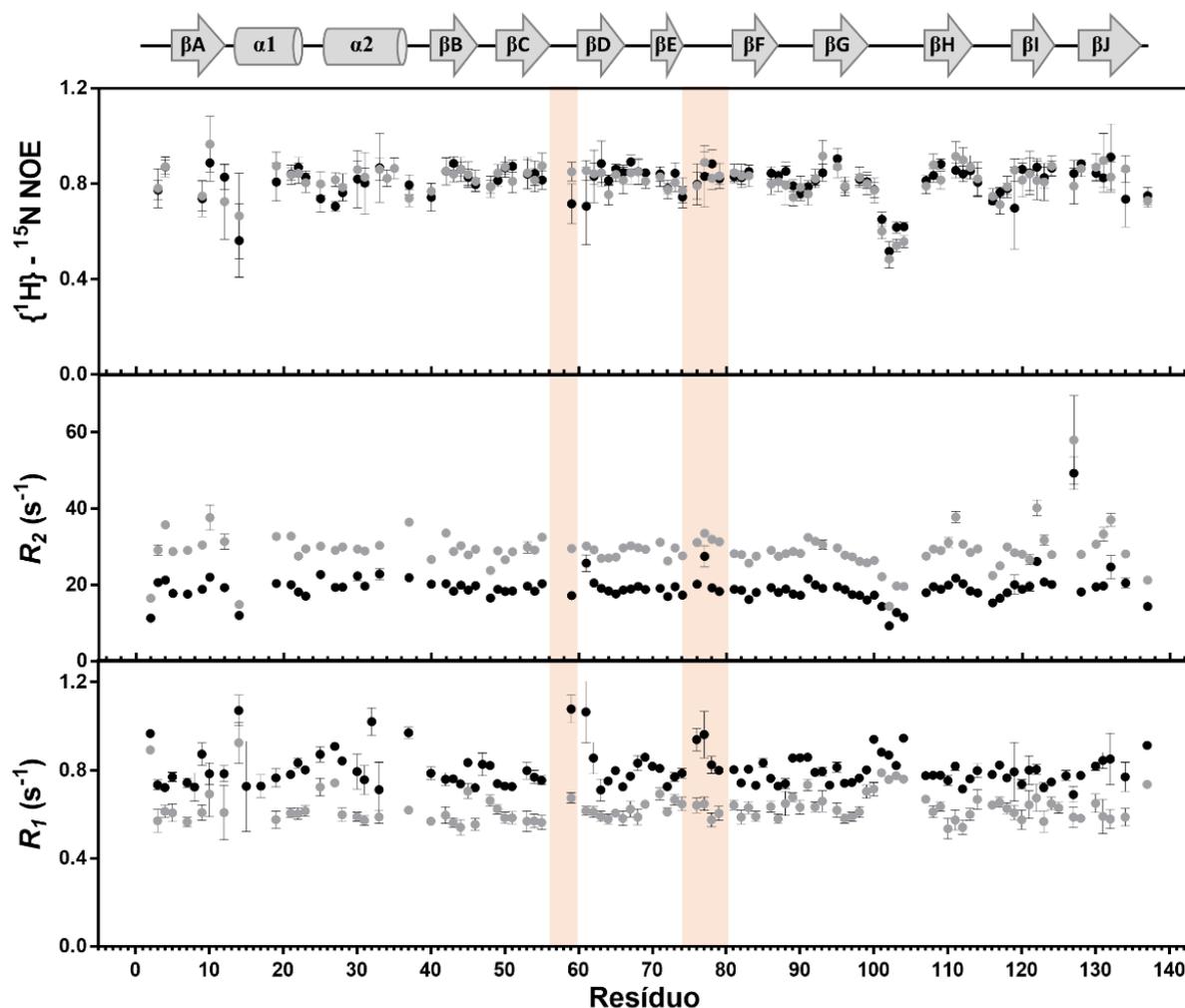


Figura 30: Dinâmica térmica de CRABP2 na presença e na ausência de AR (900 MHz). Os parâmetros de relaxação $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N NOE, R_2 e R_1 , bem como os erros associados a cada medida, estão representados em função dos resíduos da proteína. Em preto estão os valores observados para apo-CRABP2 e em cinza os valores aferidos para holo-CRABP2. As regiões cuja dinâmica térmica foi suprimida com a formação do complexo AR:CRABP2 estão destacadas em bege. Os elementos de estrutura secundária referentes a estrutura cristalográfica de holo-CRABP2 (PDB 2FR3) estão indicados na parte superior da figura. As fitas- β estão representadas por setas e as α -hélices por cilindros. Os experimentos foram realizados com ~ 1 mM de apo-CRABP2 ou ~ 1 mM de CRABP2 e 1.5 mM de AR em tampão fosfato de sódio 20 mM (pH 7.3), NaCl 150 mM, DTT 5 mM e 10% de D₂O, a 25°C e em um espectrômetro Bruker 900 MHz.

No complexo AR:CRABP2, resíduos presentes na região do portal ($\alpha 1$ -alça- $\alpha 2$ e alças βC - βD e βE - βF) interagem com a porção apolar do AR via interações hidrofóbicas (KLEYWEGT et al., 1994) (**Figura 7**). Além disso, o resíduo Arg59 forma uma ligação hidrogênio com Gln74, conectando a porção superior das fitas βD e βE , que formam a região do *gap* das iLBPs (VAEZESLAMI et al., 2006) (**Figura 25B**). Sendo assim, os contatos adicionais promovidos pela ligação de AR a CRABP2 seriam responsáveis pela supressão da dinâmica térmica das alças βC - βD e βE - βF na presença de ligante. Vale destacar que a alça βG - βH , que contém o sítio de SUMOilação Lys101, permaneceu flexível nos dois estados.

4.6 INVESTIGAÇÃO DA AUTOASSOCIAÇÃO DE CRABP2 INDUZIDA POR AR

Tendo em vista a variação dos parâmetros de relaxação e do tempo de correlação rotacional global em função da presença de AR que indicaram a autoassociação do complexo AR:CRABP2 em solução, experimentos de titulação por RMN foram conduzidos com o objetivo de mapear a superfície envolvida nesse processo.

A **Figura 31** mostra a sobreposição dos espectros 2D [1H , ^{15}N] HSQC coletados em concentrações crescentes do complexo AR:CRABP2. Na **Figura 32A**, estão representados os valores de CSP observados entre as concentrações limítrofes de 10 μM e 800 μM . Os resíduos Val26 ($\alpha 2$), Leu28 ($\alpha 2$) e Val58 (βC - βD) apresentaram os maiores valores de CSP (3 desvios-padrão acima da média). Adicionalmente, valores de CSP de 0,25 desvios-padrão acima da média foram observados para os resíduos Ile10 (βA), Lys20 ($\alpha 1$), Asn25 ($\alpha 1$ - $\alpha 2$), Lys30-Ile31 ($\alpha 2$), Val33 ($\alpha 2$), Ala35 ($\alpha 2$), Arg59 (βC - βD) e Asn115 (βH - βI) (**Figura 32B**). Basicamente todos os resíduos que apresentaram valores de CSP estatisticamente relevantes localizam-se na região do portal de iLBPs ($\alpha 1$ -alça- $\alpha 2$ e alças βC - βD e βE - βF), formando uma superfície contínua de interação entre os monômeros do complexo AR:CRABP2.

Na estrutura cristalográfica do complexo AR:CRABP2, a cadeia lateral da Val58 se aproxima da hélice $\alpha 2$, possibilitando que os resíduos Leu28, Ile31, Ala35 e Val58 formem uma superfície hidrofóbica contínua (**Figura 32C**). Os resíduos presentes nessa superfície hidrofóbica contígua estabelecem contatos com um outro monômero de AR:CRABP2 presente na unidade assimétrica do cristal. A superfície hidrofóbica formada na região do portal interage com os resíduos Ile120, Thr122, Thr131 e Val133 presentes no outro monômero de AR:CRABP2 (**Figura 33**). Vale ressaltar que todas as moléculas de água são expulsas da interface de interação entre os dois monômeros de AR:CRABP2, além disso, a cadeia lateral da Asn25 de um monômero forma uma ligação hidrogênio com a cadeia lateral do Asp116 do

outro monômero. A superfície de interação observada para o dímero cristalográfico de AR:CRABP2 se sobrepõe à região mapeada por CSP em função do aumento da concentração de holo-CRABP2, sugerindo que essa região também medeia a autoassociação de holo-CRABP2 em solução.

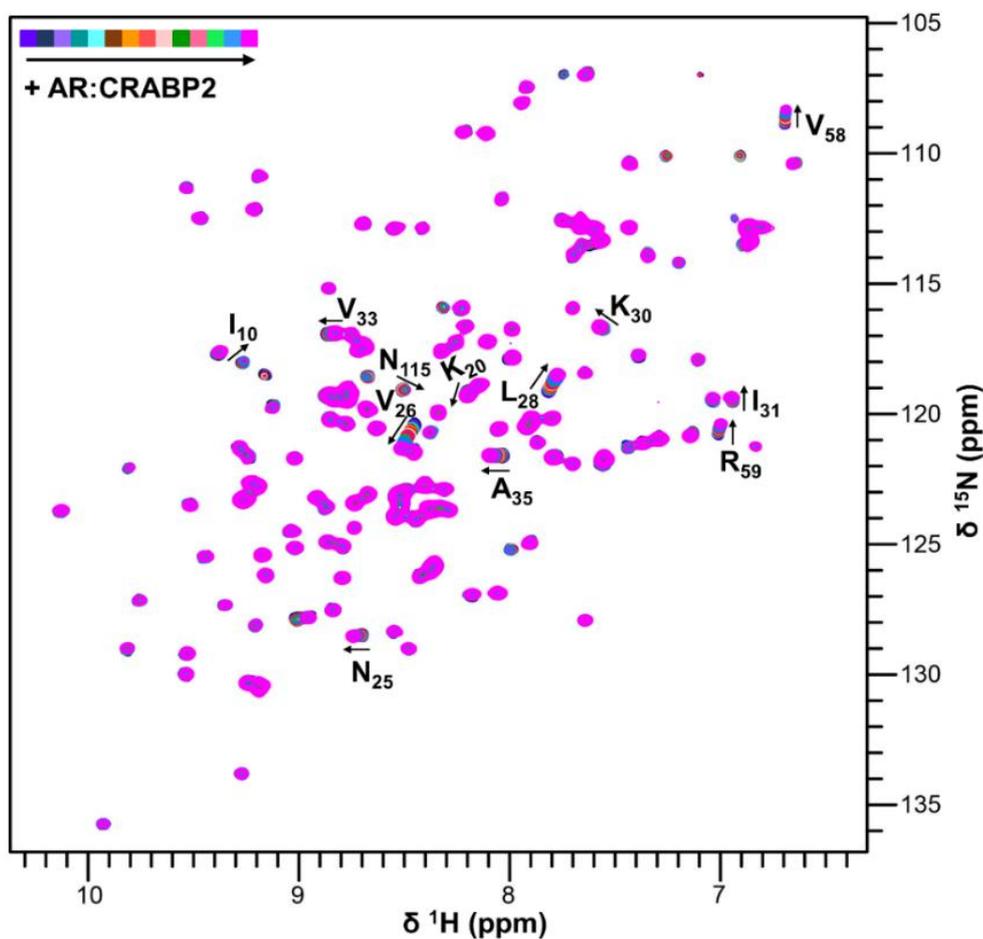


Figura 31: Sobreposição dos espectros 2D [^1H , ^{15}N] HSQC adquiridos em concentrações crescentes de holo-CRABP2. As concentrações de holo-CRABP2 utilizadas foram: 10 μM (azul), 20 μM (azul marinho), 40 μM (lilás), 60 μM (verde-azulado), 80 μM (ciano), 100 μM (marrom), 125 μM (laranja), 150 μM (salmão), 200 μM (rosa claro), 250 μM (verde), 300 μM (rosa), 400 μM (verde claro), 500 μM (azul claro) e 800 μM (magenta). Os resíduos que apresentaram CSPs estatisticamente significativos em função do aumento da concentração de holo-CRABP2 estão identificados. Os espectros foram adquiridos em tampão NaP 20 mM (pH 6,8), NaCl 50 mM e TCEP 0.5 mM e 5% de D_2O , a 25°C e em um espectrômetro Bruker 600 MHz.

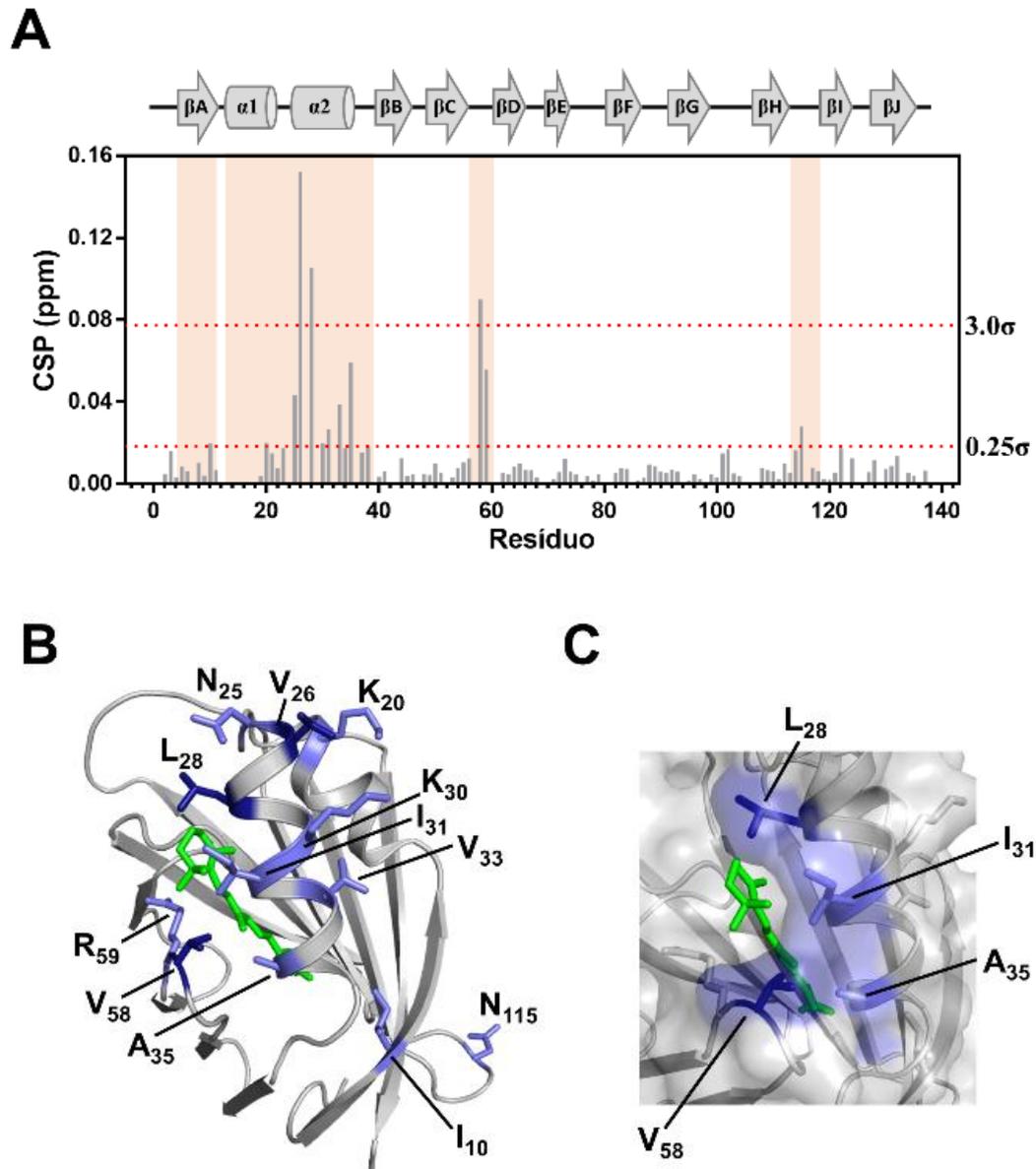


Figura 32: Resíduos que medeiam a auto associação de holo-CRABP2 identificados por CSP. (A) Valores de CSP observados para AR:CRABP2 considerando as concentrações de 10 μM e 800 μM mostrados em função dos resíduos de CRABP2. As linhas pontilhadas em vermelho indicam os valores 0.25 e 3.0 desvios-padrão acima da média. As regiões de holo-CRABP2 que apresentam CSPs significativos estão destacadas em bege. Os elementos de estrutura secundária referentes a estrutura cristalográfica de holo-CRABP2 (PDB 2FR3) estão indicados na parte superior da figura. As fitas- β estão representadas por setas e as α -hélices por cilindros. (B) Os resíduos que apresentaram valores de CSP estatisticamente significativos estão mapeados na estrutura cristalográfica de holo-CRABP2 (PDB 2FR3) (≥ 3.0 desvios-padrão, azul escuro; entre 0.25 e 3.0 desvios-padrão, azul claro). As cadeias laterais estão representadas por bastões e identificadas. AR está representado em verde. (C) Zoom da interface de dimerização mapeada por CSP. Os resíduos que formam a superfície hidrofóbica contígua estão destacados em azul na estrutura cristalográfica de AR:CRABP2 (2FR3).

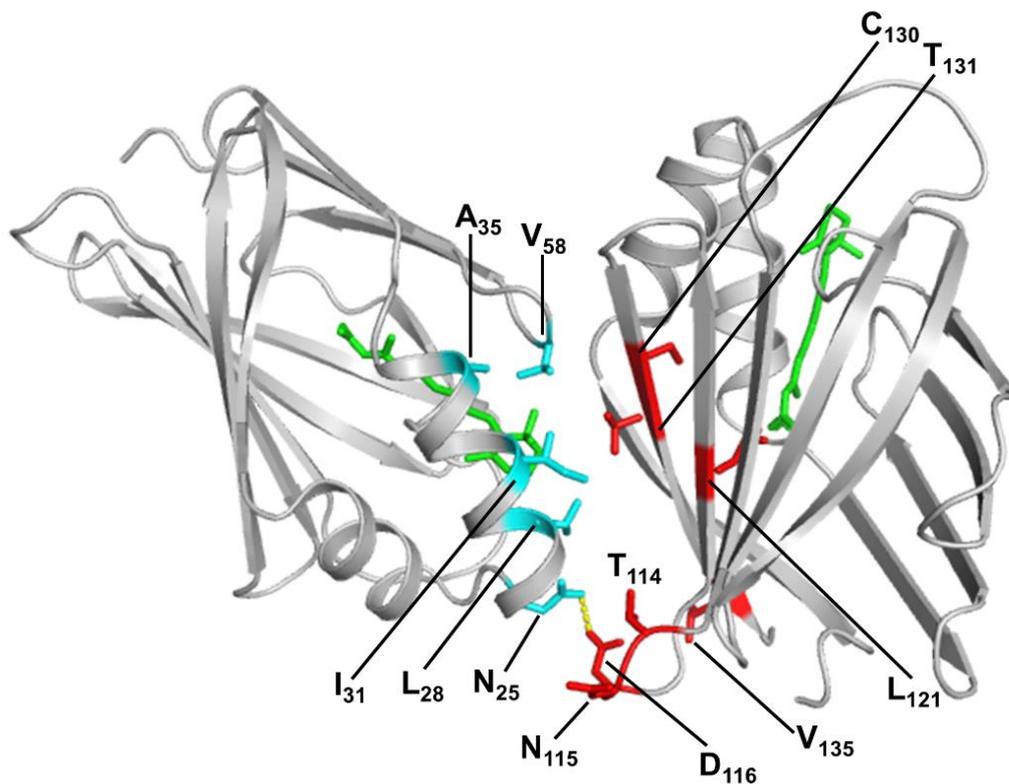


Figura 33: Resíduos que medeiam a auto associação de holo-CRABP2 identificados por CSP e diminuição da intensidade relativa dos sinais. Os resíduos envolvidos na dimerização de AR:CRABP2 estão mapeados na estrutura cristalográfica do dímero de holo-CRABP2 (2FR3). As cadeias laterais dos resíduos localizados na região do portal estão coloridas em ciano. As cadeias laterais dos resíduos localizados nas fitas β I- β A e na alça β H- β I do monômero de simetria relacionada estão mostradas em vermelho. A ligação de hidrogênio conectando os resíduos Asn25 (monômero A) e Asp116 (monômero B) está representada por uma linha pontilhada amarela. As cadeias laterais estão representadas por bastões e identificadas. AR está representado em verde.

Além das mudanças de deslocamento químico, alguns picos de correlação apresentaram diminuição de intensidade em função do aumento da concentração de AR:CRABP2 (**Figura 34A**). Os resíduos Ile10 (β A), Arg11 (β A), Asn115 (β H- β I) e Thr131 (β J) apresentaram a maior diminuição de intensidade (≤ 2 desvios-padrão da média) com o aumento da concentração de AR:CRABP2. Os resíduos Phe3, Lys8 (β A), Leu19 (α 1), Lys38 (α 2- β B), Ile63 (β D), Thr110 (β H), Thr114 (β H- β I), Leu121 (β I), Cys130 (β J) e Val135 (β J) apresentaram diminuição de intensidade entre 0,75 e 2 desvios-padrão da média (**Figura 34B**). Surpreendentemente, os resíduos Thr114 (β H- β I), Asn115 (β H- β I), Leu121 (β I), Cys130 (β J), Thr131 (β J) e Val135 (β J) localizam-se na superfície hidrofóbica contínua que interage com a região do portal no dímero cristalográfico de AR:CRABP2, sugerindo que a diminuição da intensidade relativa desses resíduos foi causada pela dimerização do complexo em solução (**Figura 34C**).

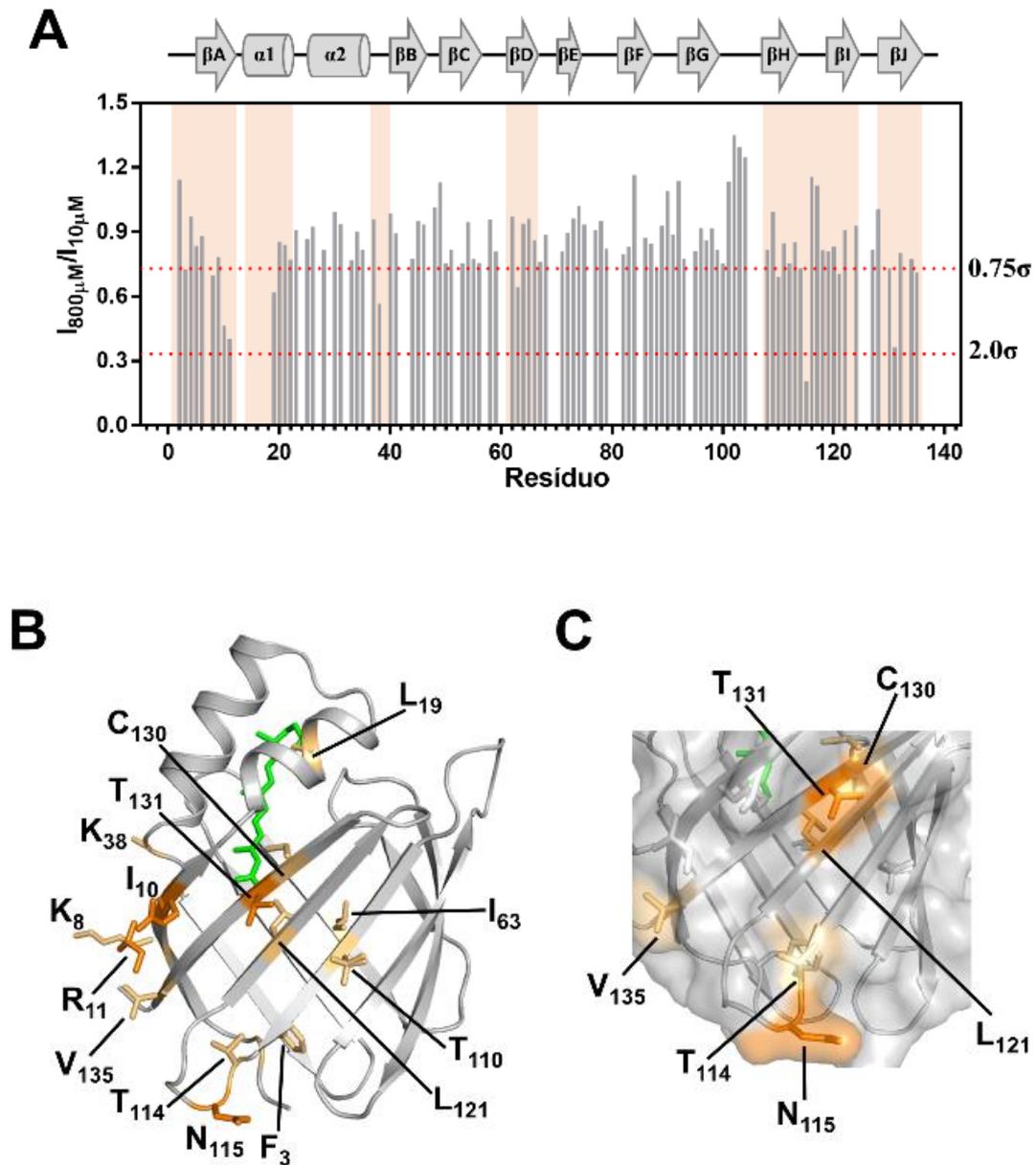


Figura 34: Resíduos que medeiam a auto associação de holo-CRABP2 identificados por diminuição da intensidade relativa dos sinais. (A) Razão entre as intensidades relativas de holo-CRABP2 a 10 μM e 800 μM ($I_{800\mu\text{M}}/I_{10\mu\text{M}}$) em função dos resíduos de CRABP2. As linhas pontilhadas em vermelho indicam os valores 0.75 e 2.0 desvios-padrão abaixo da média. As regiões de holo-CRABP2 que apresentam os menores valores de $I_{800\mu\text{M}}/I_{10\mu\text{M}}$ estão destacadas em bege. Os elementos de estrutura secundária referentes a estrutura cristalográfica de holo-CRABP2 (PDB 2FR3) estão indicados na parte superior da figura. As fitas- β estão representadas por setas e as α -hélices por cilindros. (B) Os resíduos que apresentaram valores de $I_{800\mu\text{M}}/I_{10\mu\text{M}}$ estatisticamente significativos estão mapeados na estrutura cristalográfica de holo-CRABP2 (PDB 2FR3) (≤ 2.0 desvios-padrão, laranja escuro; entre 0.75 e 2.0 desvios-padrão, laranja claro). As cadeias laterais estão representadas por bastões e identificadas. AR está representado em verde. (C) Zoom da interface de dimerização identificada por perda de intensidade relativa. Os resíduos que formam a superfície hidrofóbica contígua estão destacados em laranja na estrutura cristalográfica de AR:CRABP2 (2FR3).

A intensidade relativa dos resíduos presentes na alça β G- β H (Lys101-Gly104) aumentou com a dimerização de AR:CRABP2, indicando que esses resíduos tornaram-se mais flexíveis com a formação do homodímero. O sítio de SUMOilação de CRABP2, que é responsável pela dissociação da proteína da membrana do retículo endoplasmático, está presente nessa região (Lys101) e é possível que esse aumento de flexibilidade seja importante para os processos subsequentes de sinalização mediados por holo-CRABP2.

Apesar da saturação não ter sido alcançada no experimento de titulação de AR:CRABP2 devido a limitações na solubilidade do complexo, a constante de dissociação aparente para a homodimerização de holo-CRABP2 foi estimada utilizando os valores de CSP de todos os resíduos envolvidos na autoassociação de AR:CRABP2 ($K_d \sim 1.0 \pm 0.2$ mM). O alto valor de K_d é indicativo de uma interação fraca, sugerindo que a homodimerização de AR:CRABP2 possa ser inespecífica. Entretanto, a homodimerização de outras iLBPs na presença de seus ligantes cognatos já foi descrita na literatura e relacionada a modulação da translocação dessas proteínas entre o núcleo e o citoplasma (AVERS et al., 2007).

4.7 CARACTERIZAÇÃO DA DINÂMICA INTERMEDIÁRIA (μ s-ms) de CRABP2 LIVRE E DO COMPLEXO AR:CRABP2 POR RMN

O alargamento de alguns sinais de ressonância observados para apo-CRABP2 é indicativo de que esses resíduos experimentam troca conformacional em regime intermediário. Sendo assim, a dinâmica na escala de tempo de μ s-ms foi investigada para CRABP2, tanto na ausência quanto na presença de AR, utilizando experimentos de dispersão de relaxação por CPMG (15 N).

As taxas de relaxação efetiva R_{2eff} (s^{-1}) obtidas a 25 °C, utilizando frequências de CPMG iguais a 66,7 e 1000 Hz e em campos magnéticos de 800 MHz e 900 MHz para CRABP2 livre estão apresentadas na **Figura 35**. Resíduos distribuídos ao longo de toda a estrutura tridimensional de CRABP2 livre, excetuando-se os segmentos β G, β H e a alça β G- β H, apresentaram valores de ΔR_{2eff} (R_{2eff} 66.7 Hz - R_{2eff} 1000 Hz), em ambos os campos utilizados, indicativos de eventos de troca conformacional. Na **Figura 36A** estão representados os valores de ΔR_{2eff} em ambos os campos magnéticos utilizados. Tanto resíduos hidrofóbicos quanto carregados apresentaram dinâmica intermediária na ausência de ligante. Muitos dos resíduos que apresentaram CSPs com a formação do complexo AR:CRABP2 também mostraram dinâmica intermediária nos experimentos de CPMG.

De todos os resíduos que apresentaram troca conformacional no tempo de escala de μ s-ms, os resíduos Lys8 (β A), Leu19 (α 1), Leu22 (α 1), Lys30-Ala32 (α 2), Thr51-Ile53 (β C), Arg59

(β C- β D), Glu73-Gln74 (β E), Val76 (β E- β F), Thr114 (β H- β I), Thr131 (β J) e Tyr134 (β J) formaram o grupo principal por apresentarem valores de k_{ex} e p_B semelhantes (**Figura 36B** e **Figura 36C**). Os valores de k_{ex} e p_B médios obtidos com o ajuste global dos dados de CPMG obtidos para apo-CRABP2 foram 320 ± 40 /s e 0.2 ± 0.03 , respectivamente. Os resíduos envolvidos em eventos de troca conformacional localizam-se principalmente na região do portal (α 1-alça- α 2, alças β C- β D e β E- β F) e do *gap* (β D e β E) de CRABP2. Em concordância com os resultados de CPMG, os resíduos que não puderam ser assinalados devido ao alargamento dos sinais de RMN estão localizados nas mesmas regiões que apresentaram dinâmica intermediária - β A (Glu13), α 1 (Glu16), α 2 (Arg29, Ala34-Ala36), α 2- β B (Lys38), β B (Val41), β C- β D (Thr56-Val58), β D (Thr60), β H- β I (Asn115) e β J (Val133) (**Figura 36B**).

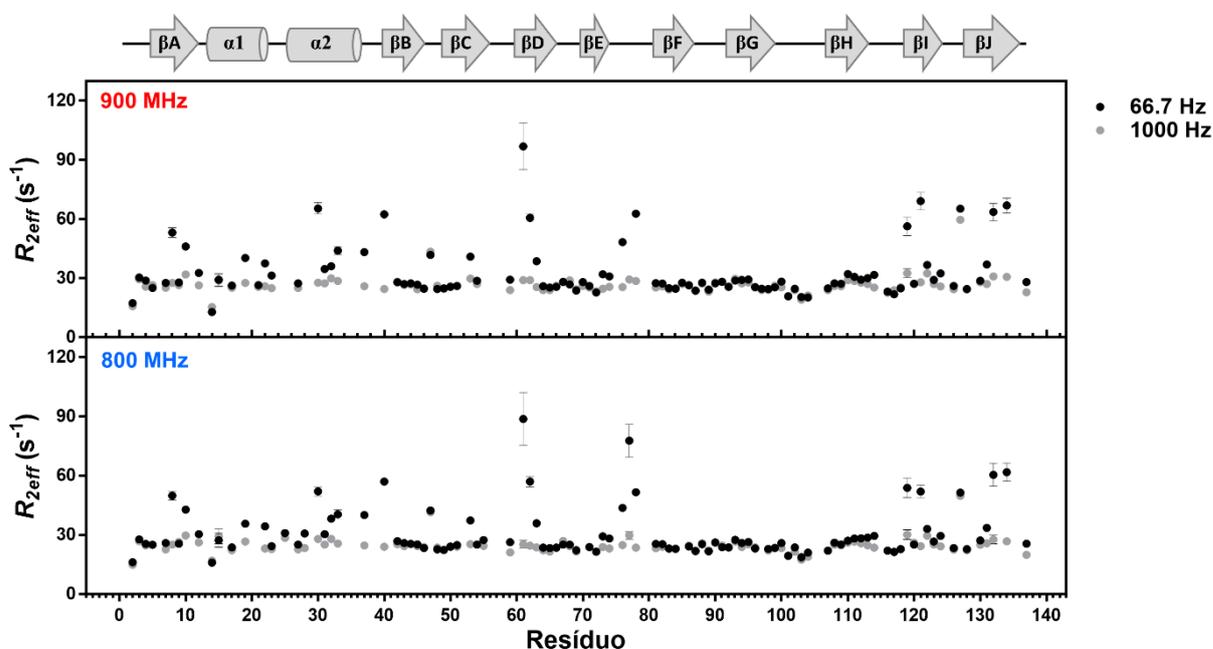


Figura 35: Taxas de relaxação efetiva R_{2eff} (s^{-1}) aferidas para apo-CRABP2 no 900 MHz e no 800 MHz a 25°C com frequências de CPMG (ν_{CPMG}) de a 66,7 Hz e 1000 Hz. Os valores de R_{2eff} (s^{-1}) estão representados em função dos resíduos da proteína. Em preto estão os valores observados para $\nu_{CPMG} = 66.7$ Hz e em cinza os valores aferidos com $\nu_{CPMG} = 1000$ Hz. As barras representam os erros associados a cada medida. Os elementos de estrutura secundária referentes a estrutura cristalográfica de holo-CRABP2 (PDB 2FR3) estão indicados na parte superior da figura. As fitas- β estão representadas por setas e as α -hélices por cilindros. Os experimentos foram realizados com ~ 1 mM de apo-CRABP2 em tampão fosfato de sódio 20 mM (pH 7.3), NaCl 150 mM, DTT 5 mM a 25 °C.

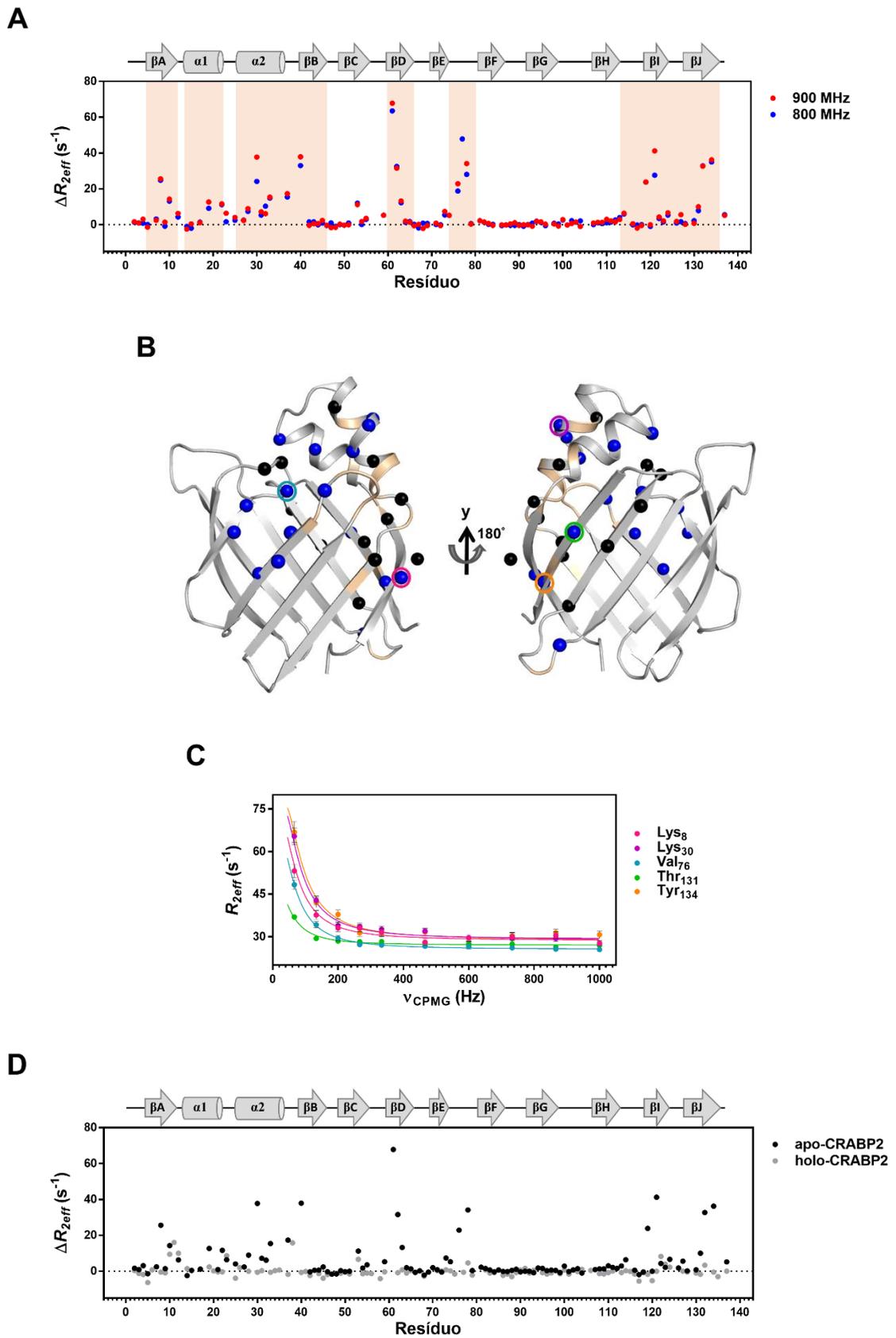


Figura 36: Dinâmica intermediária de CRABP2 livre. (A) Valores de ΔR_{2eff} em função dos resíduos de CRABP2, adquiridos para a proteína livre a 25 °C nos campos magnéticos de 800 MHz (azul) e 900 MHz (vermelho). Os elementos de estrutura secundária referentes a estrutura cristalográfica de holo-CRABP2 (PDB

2FR3) estão indicados na parte superior da figura. As fitas- β estão representadas por setas e as α -hélices por cilindros. As regiões que exibiram dinâmica intermediária estão destacadas em bege. **(B)** Os resíduos que apresentaram parâmetros de troca semelhantes em apo-CRABP2 ($k_{ex} = 320 \pm 40$ /s e $p_B = 0.2 \pm 0.03$) estão representados por esferas azuis na estrutura cristalográfica de CRABP2 livre (PDB 2FS6). Os resíduos que não foram incluídos no grupo principal de maneira estatisticamente significativa estão representados por esferas pretas. Os resíduos que não foram assinalados estão coloridos em bege na representação em cartoon. **(C)** Perfis representativos de dispersão de relaxação obtidos por ^{15}N CPMG no 900 MHz (R_{2eff} vs. ν_{CPMG}) para os resíduos Lys8 (rosa), Lys30 (roxo), Val76 (azul), Thr131 (verde) e Tyr134 (laranja); os resíduos correspondentes estão destacados em **B** por círculos nas mesmas cores utilizadas em suas respectivas curvas em **C**. As linhas correspondem ao ajuste dos perfis de relaxação a equação de Carver–Richards. **(D)** Valores de ΔR_{2eff} em função dos resíduos de CRABP2, adquiridos para a proteína livre (preto) e ligada a AR (preto) a 25 °C no 900 MHz.

Os experimentos de CPMG-RD foram repetidos na presença de AR. As taxas de relaxação efetiva R_{2eff} (s^{-1}) obtidas a 25 °C, utilizando frequências de CPMG iguais a 66,7 e 1000 Hz e em campos magnéticos de 18.79 e 21.14 T para holo-CRABP2 estão apresentadas na **Figura 37**. A dinâmica intermediária de CRABP2 foi suprimida com a formação do complexo AR:CRABP2 (**Figura 36D**). Os perfis de dispersão de relaxação dos resíduos Lys8, Lys30, Val76, Thr131 e Tyr134, que integram o grupo principal de resíduos que apresentaram parâmetros de troca conformacional semelhantes em apo-CRABP2, observados para CRABP2 livre e na presença de AR estão representados na **Figura 38**. Os perfis de relaxação observados para esses resíduos na ausência de AR são indicativos de eventos de troca conformacional, apresentando altos valores de R_{2eff} em baixas frequências de CPMG e decaimento da taxa de relaxação com o aumento de ν_{CPMG} . A análise desses perfis de relaxação aferidos para apo e holo-CRABP2 permite a observação da inibição dos eventos de troca conformacional na presença do ligante.

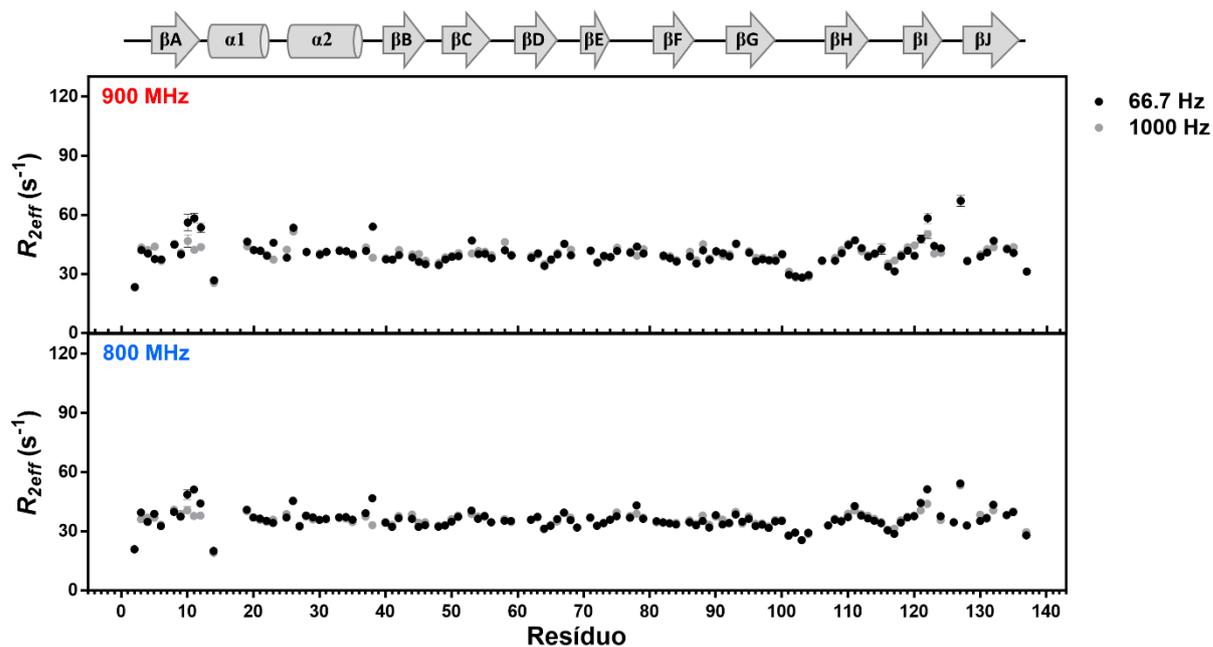


Figura 37: Taxas de relaxação efetiva R_{2eff} (s^{-1}) aferidas para holo-CRABP2 no 900 MHz e no 800 MHz a 25°C com frequências de CPMG (ν_{CPMG}) de a 66,7 Hz e 1000 Hz. Os valores de R_{2eff} (s^{-1}) estão representados em função dos resíduos da proteína. Em preto estão os valores observados para $\nu_{CPMG} = 66.7$ Hz e em cinza os valores aferidos com $\nu_{CPMG} = 1000$ Hz. As barras representam os erros associados a cada medida. Os elementos de estrutura secundária referentes a estrutura cristalográfica de holo-CRABP2 (PDB 2FR3) estão indicados na parte superior da figura. As fitas- β estão representadas por setas e as α -hélices por cilindros. Os experimentos foram realizados com ~ 1 mM de CRABP2 e 1.5 mM de AR em tampão fosfato de sódio 20 mM (pH 7.3), NaCl 150 mM, DTT 5 mM a 25 °C.

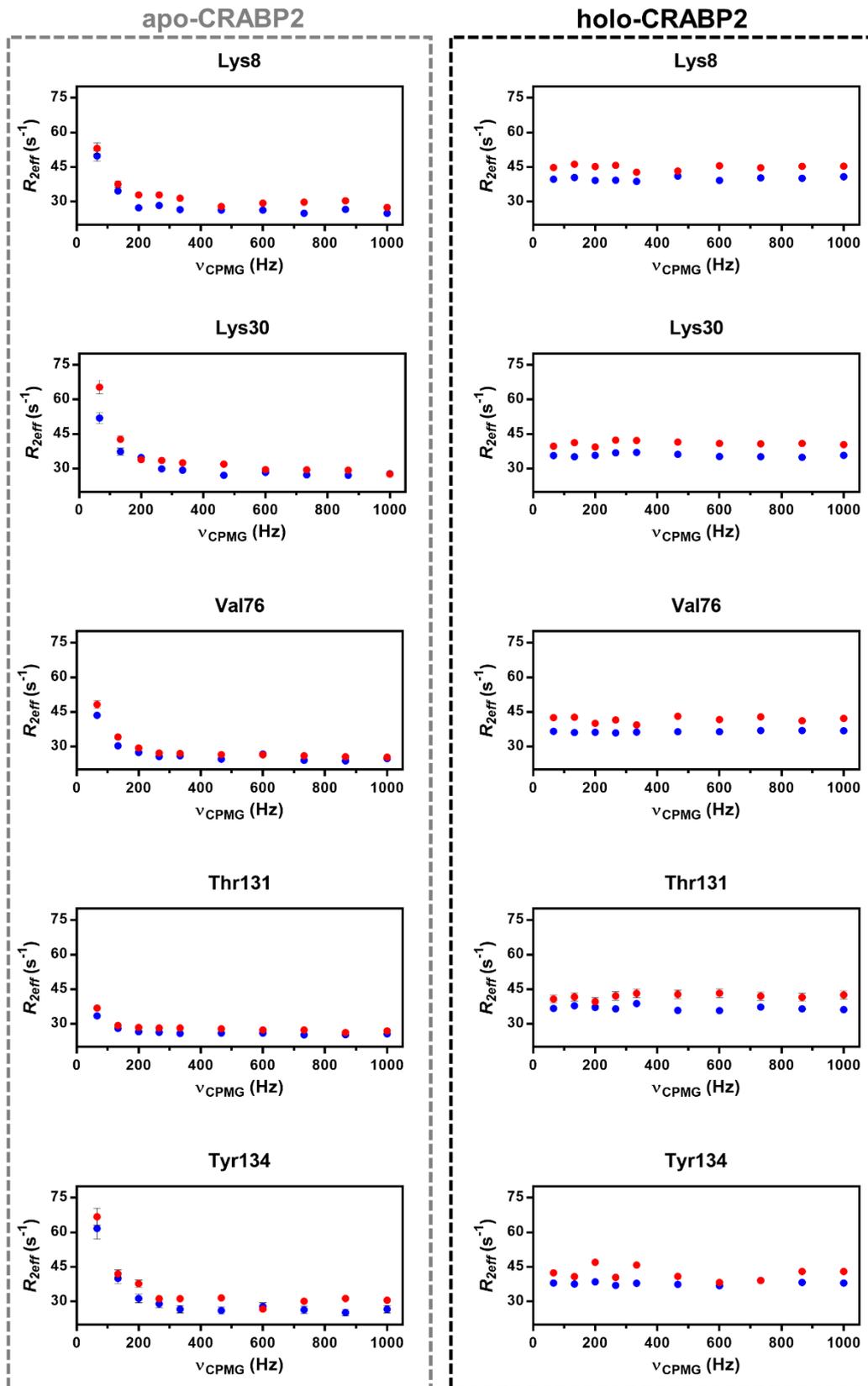


Figura 38: Perfis de dispersão de relaxação observados para Lys8, Lys30, Val76, Thr131 e Tyr134 em apo e holo-CRABP2. Os valores de R_{2eff} (s^{-1}) em função da variação de ν_{CPMG} estão mostrados no painel da esquerda para a proteína livre e no painel da direita para o complexo atRA:CRABP2. Em azul estão os valores aferidos no 800 MHz e em vermelho estão os valores observados no 900 MHz.

Alguns resíduos em holo-CRABP2 apresentaram movimentos em uma escala de tempo mais rápida (ps- μ s): Ile10-Ser12 (β A), Leu19 (α 1), Lys38 (α 2- β B), Thr122-Thr124 (β I) e Arg132 (β J) (**Figura 39A**). Esses resíduos constituíram o grupo principal por apresentarem valores de k_{ex} e p_B semelhantes (**Figura 39B** e **Figura 39C**). Os k_{ex} e p_B médios obtidos com o ajuste global dos dados de CPMG obtidos para holo-CRABP2 foram $k_{ex} > 2000$ /s e $p_B \sim 0.05$, respectivamente. Em concordância com os resultados de CPMG, os resíduos que não puderam ser assinalados devido ao alargamento dos sinais de RMN estão localizados nas mesmas regiões que apresentaram flutuação rápida - Glu13 (β A), Phe15-Glu17 (α 1), Gly47 (β B- β C), Thr57 (β C- β D) e Thr60 (β D) (**Figura 39B**).

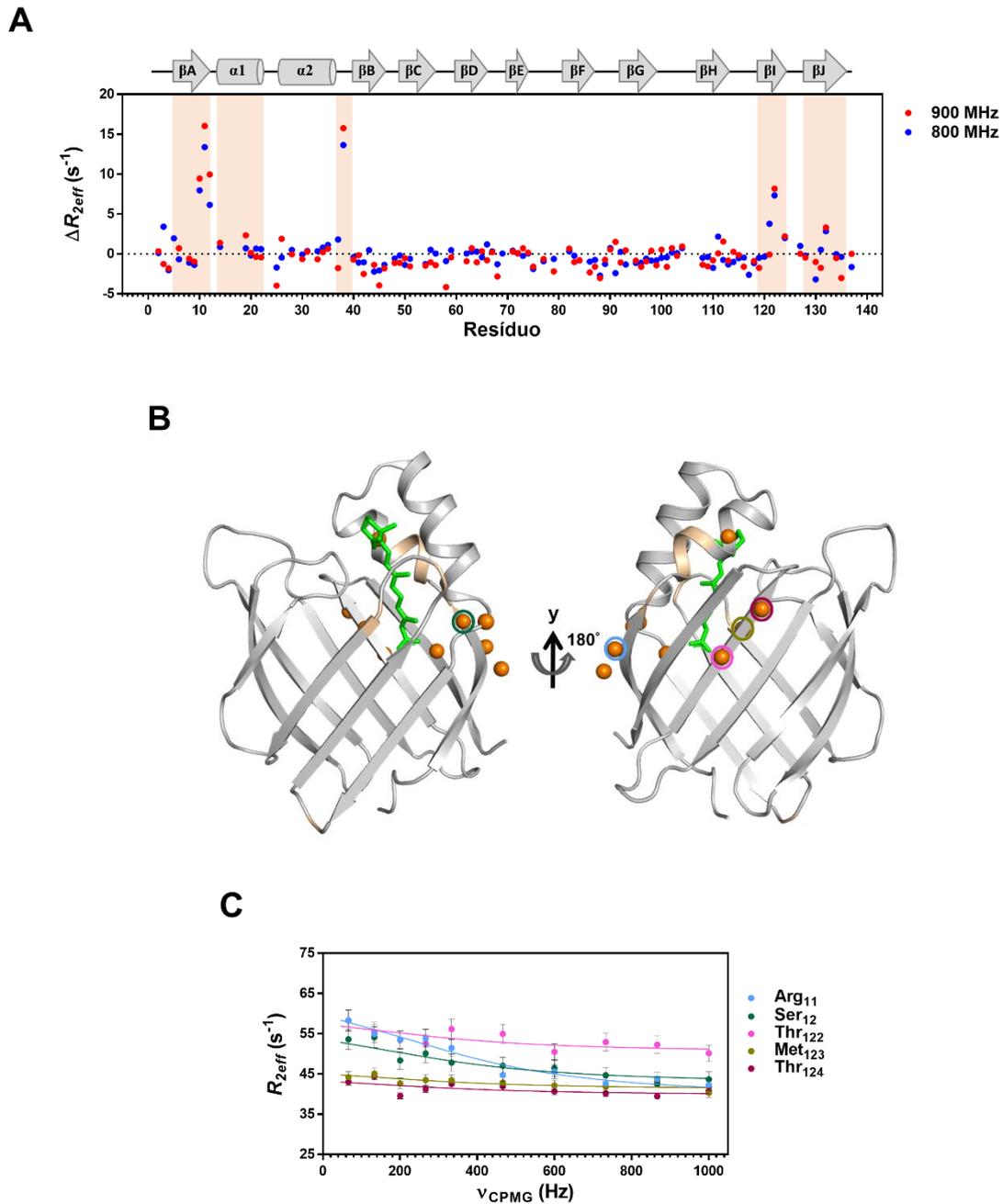


Figura 39: Dinâmica intermediária de AR-CRABP2. (A) Valores de ΔR_{2eff} em função dos resíduos de CRABP2, adquiridos para holo-CRABP2 a 25 °C nos campos magnéticos de 800 MHz (azul) e 900 MHz (vermelho). Os elementos de estrutura secundária referentes a estrutura cristalográfica de holo-CRABP2 (PDB 2FR3) estão indicados na parte superior da figura. As fitas- β estão representadas por setas e as α -hélices por cilindros. As regiões que exibiram dinâmica intermediária estão destacadas em bege. (B) Os resíduos que apresentaram parâmetros de troca semelhantes em holo-CRABP2 ($k_{ex} > 2000/s$ e $p_B \sim 0.05$) estão representados por esferas laranja na estrutura cristalográfica de holo-CRABP2 (PDB 2FR3). Os resíduos que não foram assinalados estão coloridos em bege na representação em cartoon. AR está representado em verde. (C) Perfis representativos de dispersão de relaxação obtidos por ^{15}N CPMG no 900 MHz (R_{2eff} vs. ν_{CPMG}) para os resíduos Arg11 (azul), Ser12 (verde), Thr122 (rosa), Met123 (verde-oliva) e Thr124 (vinho); os resíduos correspondentes estão destacados em B por círculos nas mesmas cores utilizadas em suas respectivas curvas em C. As linhas correspondem ao ajuste dos perfis de relaxação a equação de Carver–Richards.

Essa flutuação rápida apresentada por holo-CRABP2 é distinta da dinâmica intermediária verificada para apo-CRABP2, como pode ser observado na **Figura 40** que mostra os perfis de dispersão de relaxação dos resíduos Arg11, Ser12, Thr122, Met123 e Thr124 observados na ausência e na presença de AR.

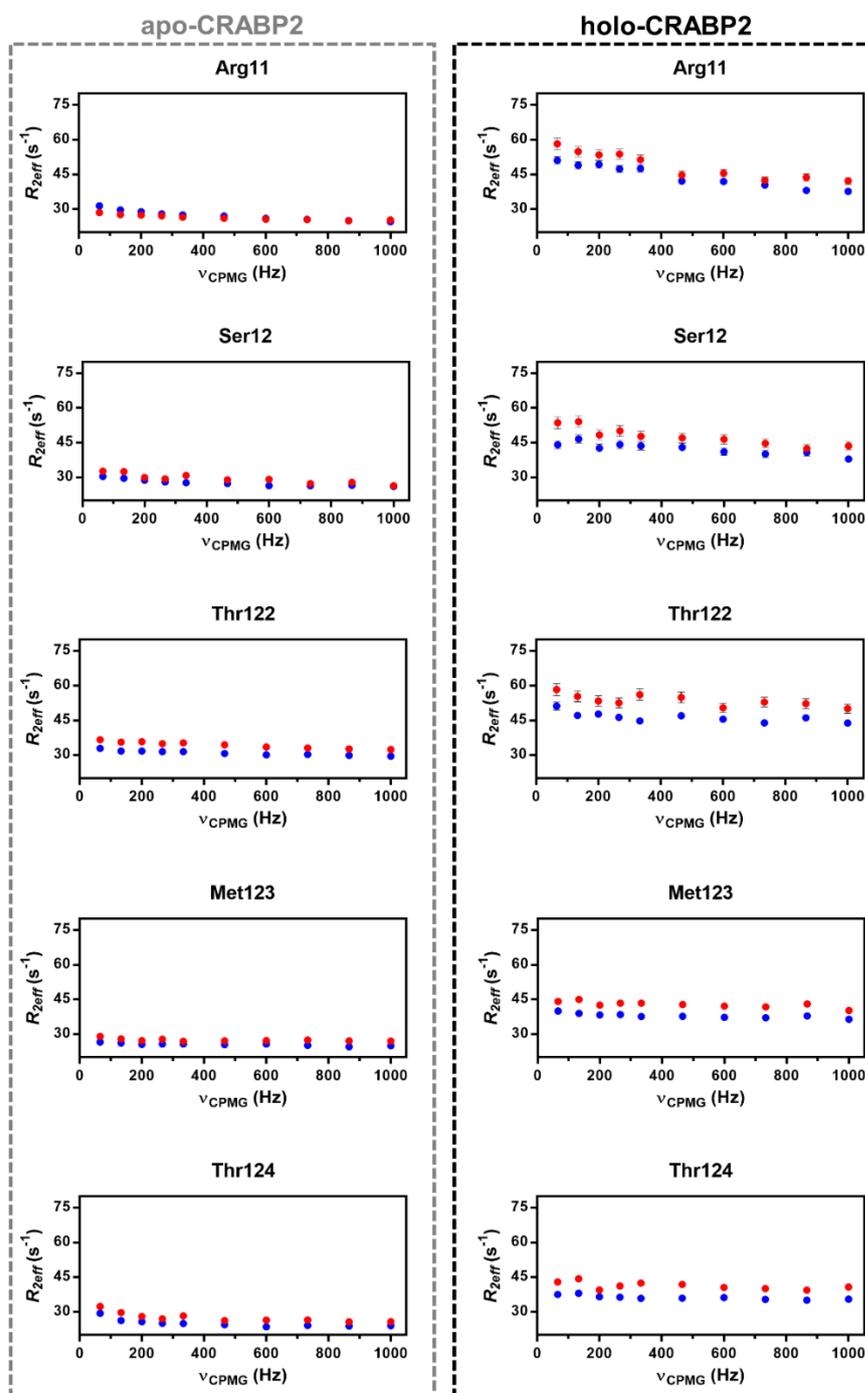


Figura 40: Perfis de dispersão de relaxação observados para Arg11, Ser12, Thr122, Met123 e Thr124 em apo e holo-CRABP2. Os valores de R_{2eff} (s^{-1}) em função da variação de ν_{CPMG} estão mostrados no painel da esquerda para a proteína livre e no painel da direita para o complexo AR:CRABP2. Em azul estão os valores aferidos no 800 MHz e em vermelho estão os valores observados no 900 MHz.

Na estrutura do complexo AR:CRABP2, o resíduo de Arg59 passa a formar uma ligação hidrogênio com Gln74 que não é observada na proteína livre (**Figura 25B**). Essa ligação hidrogênio parece eliminar os eventos de troca conformacional dos resíduos presentes na fita β D e na alça β E- β F, favorecendo o estado menos flexível e de menor energia de CRABP2. A supressão da dinâmica rápida da alça β E- β F causada pela interação com o ligante corrobora com o aumento da rigidez estrutural de CRABP2. Além disso, a dinâmica intermediária de resíduos presentes na região do portal também é suprimida com a formação do complexo AR:CRABP2. Isso ocorre devido a múltiplas interações hidrofóbicas formadas entre o anel β -ionona do ligante e os resíduos presentes na região do portal de CRABP2 (WANG; YAN, 1998) (VAEZESLAMI et al., 2006) (**Figura 7**). Em conjunto, essas interações parecem reduzir de maneira significativa a entropia conformacional não apenas na região do portal, mas também nas fitas- β adjacentes, incluindo β A, β I e β J, indicando novamente que o AR desloca o equilíbrio conformacional de CRABP2 para uma conformação mais rígida e de menor energia. A interação entre proteína e ligante estabiliza a interface de dimerização de holo-CRABP2, tornando-a disponível para o evento de autoassociação (**Figura 33**).

A pré-organização da superfície de dimerização garante que não ocorra gasto de energia conformacional adicional durante o processo de dimerização. A superfície hidrofóbica presente na hélice α 2 de um dos monômeros interage com os resíduos Thr131 e Val133 do outro monômero no dímero cristalográfico de AR:CRABP2 (**Figura 33**). Enquanto as cadeias laterais de Thr131 e Val133 apontam para o solvente, as de Arg132 e Tyr134, localizadas na face oposta da mesma fita, apontam para o interior da cavidade e interagem diretamente com o grupamento carboxilato do AR (**Figura 41**). Desta forma, a formação do complexo AR:CRABP2 estabiliza tanto a superfície de dimerização quanto o sítio de interação com o ligante.

A restrição da dinâmica de CRABP2 e a estabilização da interface de dimerização com a formação do complexo AR:CRABP2 também têm efeito na formação do NLS tridimensional constituído pelos resíduos Lys20, Arg29 e Lys30. As cadeias laterais destes resíduos estão expostas ao solvente e apresentam conformações semelhantes nos estados livre e ligado a AR de CRABP2 (**Figura 12C**). Portanto, isto não explica como a interação com AR induz a translocação de AR para o núcleo. Os resíduos Leu19, Leu22 e Lys30-Ala32 apresentaram dinâmica intermediária na ausência de ligante, que foi suprimida com a formação do complexo AR:CRABP2 (**Figura 36D**). A estabilização dessa região em resposta a interação com AR permite que o NLS tridimensional seja formado na presença de ligante, permitindo o reconhecimento do complexo AR:CRABP2 por importinas.

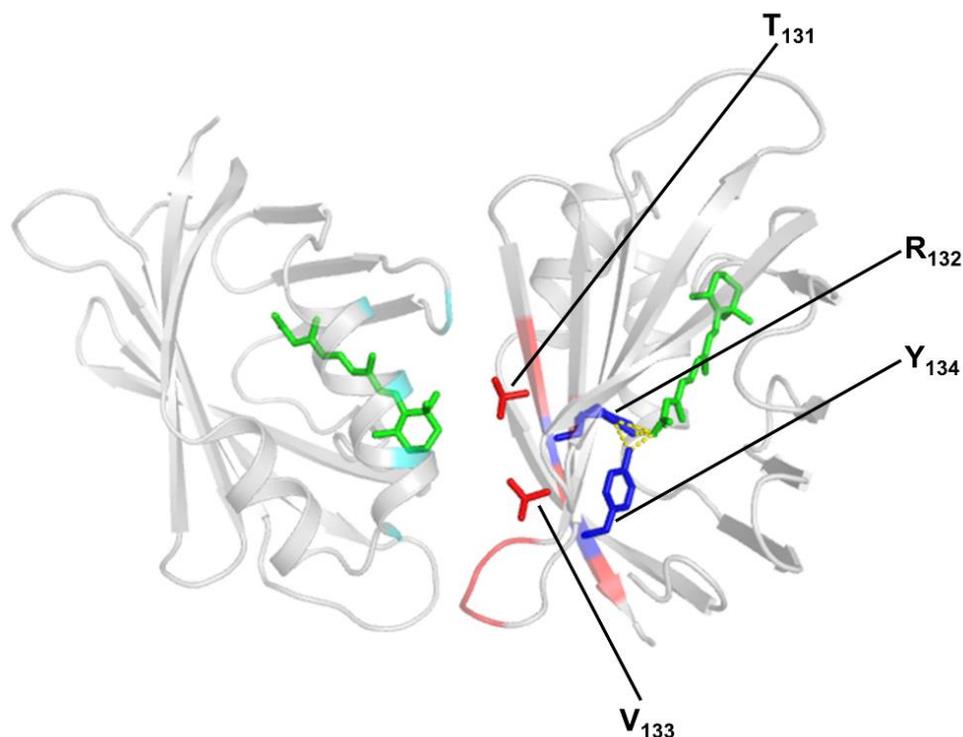


Figura 41: Pré-organização da interface de dimerização de CRABP2 mediada pela interação com AR. A ligação de AR a CRABP2 estabiliza os dois lados da superfície de dimerização. As cadeias laterais dos resíduos Thr131 e Val 133 (bastões vermelhos), localizadas na fita β J, apontam para o solvente e interagem com a superfície hidrofóbica da hélice 2 do outro monômero na estrutura cristalográfica de AR:CRABP2 (PDB 2FR3). As cadeias laterais dos resíduos Arg132 e Tyr134, localizados na face oposta da fita β J (bastões azuis), interagem diretamente com o grupamento carboxilado de AR. Os resíduos envolvidos na interface de dimerização localizada na região do portal estão coloridos em ciano. Resíduos localizados nas fitas β I- β A e na alça β H- β I do monômero de simetria relacionada estão mostrados em vermelho. A ligação de H entre os resíduos Arg132 e Tyr134 e o AR estão representadas por linhas amarelas pontilhadas. AR está representado em verde.

Resultados adicionais suportam os nossos dados. A titulação de CRABP2 com AR foi realizada em diferentes razões molares. Devido à alta afinidade entre CRABP2 e AR, a interação entre proteína e ligante acontece em regime lento no tempo de escala de RMN. Assim, observou-se a diminuição da intensidade do sinal referente ao estado livre da proteína de maneira simultânea ao aumento da intensidade do sinal referente ao estado ligado de CRABP2, em função do aumento da razão molar entre AR:CRABP2 (**Figura 42**). Neste experimento, os resíduos de CRABP2 foram divididos em dois grupos, de acordo com a razão estequiométrica onde os sinais referentes a forma ligada da proteína foram observados (**Figura 43A**). No primeiro grupo (roxo) foram alocados os resíduos cujos sinais referentes ao estado ligado de CRABP2 foram observados em razões estequiométricas $0.1 \leq \text{AR:CRABP2} \leq 0.9$. Os resíduos que fazem parte deste grupo estão envolvidos na interação com a porção hidrofóbica de AR. Resíduos localizados na β A (Lys8-Ile9), α 1 (Leu19, Leu22), α 1- α 2 (Asn25), α 2 (Lys30-Ile31,

Val33-Ala35), α 2- β B (Ser37-Lys38), β B (Ala40-Val41), β C (Thr54-Thr56), β D (Glu62), β D- β E (Gly68), β E (Gln74), β E- β F (Asp77-Gly78) e β H- β I (Thr114-Asn115) constituem o primeiro grupo (**Figura 43B**).

O segundo grupo (laranja) contém resíduos sensíveis a supressão da dinâmica intermediária de apo-CRABP2 e a homodimerização de holo-CRABP2, cujos sinais referentes ao estado ligado de CRABP2 foram observados em razões estequiométricas AR:CRABP2 ≥ 1.0 . Além disso, resíduos que fazem contatos diretos com a porção polar de AR também fazem parte deste grupo. O grupo dois compreende resíduos presentes na porção N-terminal (Phe3), β A (Ile10), β C (Thr54), β C- β D (Val58-Arg59), β H (109W ϵ 1), β I (Leu121-Thr122) e β J (Thr131-Arg132, Tyr134) (**Figura 43B**).

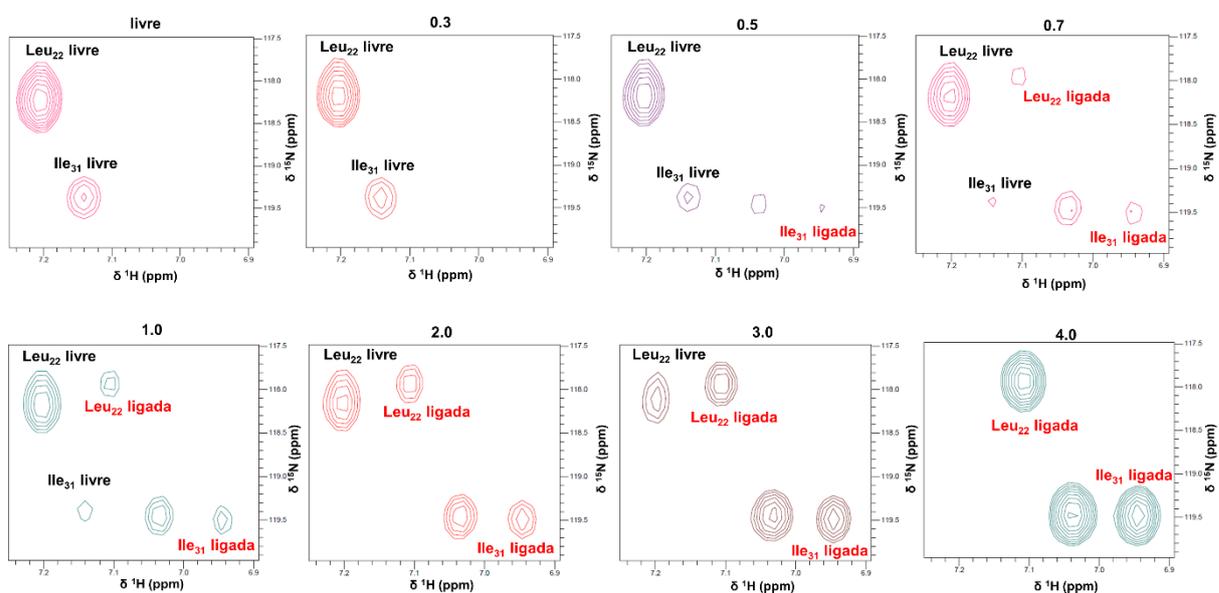


Figura 42: Espectros 2D [^1H - ^{15}N] de CRABP2 adquiridos em diferentes razões molares AR:CRABP2. Na região destacada na figura, os picos referentes as conformações livre e ligada de Leu22 e Ile 31 estão indicadas para cada razão molar AR:CRABP2 utilizada. Os espectros foram adquiridos com $\sim 50 \mu\text{M}$ de holo-CRABP2 em tampão NaP 20 mM (pH 6,8), NaCl 50 mM e TCEP 0.5 mM e 5% de D_2O , a 25°C e em um espectrômetro Bruker 800 MHz.

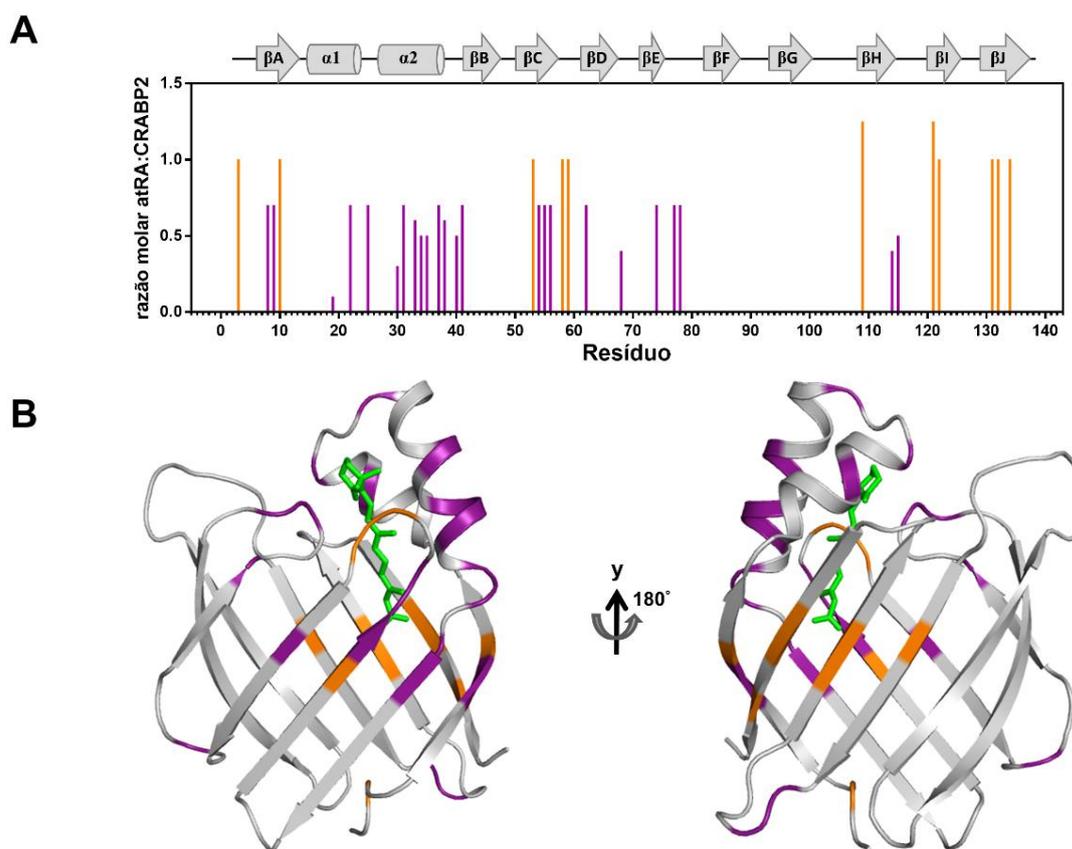


Figura 43: Titulação de CRABP2 com AR. (A) Razões molares nas quais os sinais referentes ao estado ligado de holo-CRABP2 foram observados pela primeira vez em função dos resíduos de CRABP2. Os resíduos de CRABP2 afetados pela adição de AR foram divididos em 2 classes, de acordo com a razão molar entre AR e CRABP2 que eles foram primariamente observados. Razão ≤ 0.9 (roxo) e razão ≥ 1.0 (laranja). Os elementos de estrutura secundária referentes a estrutura cristalográfica de holo-CRABP2 (PDB 2FR3) estão indicados na parte superior da figura. As fitas- β estão representadas por setas e as α -hélices por cilindros. (B) Os resíduos foram mapeados na estrutura de AR:CRABP2 (PDB 2FR3). AR está representado em verde.

As estruturas cristalográficas de apo e holo-CRABP2 são virtualmente idênticas (**Figura 8**), sugerindo que a conformação ligada esteja presente mesmo na ausência de ligante, ou ainda, que esta seja majoritária. Sendo assim, o sítio de interação com AR estaria pré-formado. Embora conformações mais abertas possam estar presentes no conjunto de conformações de apo-CRABP2, como foi sugerido anteriormente (WANG et al., 1998), a conformação livre/ligada já é suficientemente aberta para permitir a entrada do AR na cavidade de interação (VAEZESLAMI et al., 2006).

Sendo assim, nossos dados mostram que a dinâmica intermediária de CRABP2 não estaria correlacionada a um estado mais aberto da proteína, necessário para permitir a entrada de AR na cavidade de ligação. Além disso, nos experimentos de SPR, a constante de associação obtida para CRABP2 e AR foi influenciada pela difusão do ligante em detergente, que teve que ser adicionado à solução devido à baixa solubilidade de AR em tampão aquoso. Isso é consistente

com resultados anteriores que demonstram que a taxa de ligação de AR a CRABP2 é limitada pela difusão de AR (DONG et al., 1999). É provável que restrições semelhantes se apliquem *in vivo* e que a taxa de formação do complexo AR:CRABP2 seja limitada pela captação de AR do ambiente lipofílico da membrana do retículo endoplasmático ou de gotículas lipídicas.

5 DISCUSSÃO

O mecanismo de interação entre iLBPs e seus ligantes é principalmente atribuído a sua dinâmica molecular, uma vez que as estruturas tridimensionais referentes as formas livre e ligada dessas proteínas não apresentam diferenças significativas (RAGONA et al., 2014). Para entender o mecanismo de captação de AR por CRABP2 e, para entender como a formação do complexo AR:CRABP2 altera as funções celulares e a localização subcelular de holo-CRABP2, a caracterização da dinâmica molecular de CRABP2 na presença e na ausência de ligante foi realizada em nível atômico e em diferentes escalas de tempo.

Nossos resultados mostraram que a dinâmica rápida de CRABP2 foi pouco afetada pela presença de AR. A dinâmica das alças β C- β D (Arg59) e β E- β F (Val76 e Asp77) na escala de tempo de ps-ns foi suprimida pela interação entre CRABP2 e AR. A dinâmica rápida de iLBPs é bastante diversa e nem sempre é alterada pela presença de seus ligantes (KRISHNAN et al., 2000; MENOZZI et al., 2017). CRBPs 1 e 2, por exemplo, não apresentam dinâmica térmica tanto na ausência quanto na presença de ligante (LU; CISTOLA; LI, 2003; LU et al., 1999). Em contraste, FABP1 se mostra bastante flexível na forma apo e tem dinâmica rápida suprimida pela formação do complexo com seu ligante (CAI et al., 2012).

A interação entre CRABP2 e AR promove a formação de uma ligação hidrogênio entre os resíduos Arg59 (β D) e Gln74 (β E), que conecta a parte superior do *gap* neste estado (KLEYWEGT et al., 1994). A mutação do resíduo de Arg59 promove uma grande perda de afinidade entre CRABP2 e AR (VASILEIOU et al., 2009). Sendo assim, é possível que a região do *gap* atue como um portal adicional para a entrada e saída de AR em CRABP2. Simulações de dinâmica molecular com as proteínas FABP1 de sapo (*Rhinella arenarum*) (TSFADIA et al., 2007) e a CRBP humana mostraram que o *gap* nessas proteínas atua como um portal adicional para a entrada e saída de ligante (AALTEN et al., 1995). Além disso, os resíduos Gln74, Pro80 e Lys101, responsáveis por mediar a interação de CRABP2 com RARs estão localizados próximos ao *gap* e, sendo assim, esta região poderia ser um potencial portal de saída para o AR no complexo holo-CRABP2:RAR (BUDHU; GILLILAN; NOY, 2001).

Apesar da dinâmica térmica de CRABP2 não ser fortemente alterada pela interação com AR, foi observado um aumento global dos valores de R_2 , concomitante a diminuição dos valores de R_1 , indicando a auto associação da proteína induzida pela interação com o ligante. Nos experimentos de titulação por RMN, foi possível identificar por CSP que resíduos hidrofóbicos presentes na hélice α 2 e na alça β C- β D fazem parte da superfície envolvida na homodimerização de holo-CRABP2. As cadeias laterais dos resíduos mais afetados (Val26,

Leu28 e Val58) apontam para o solvente, indicando que os mesmos podem estar envolvidos em interações proteína-proteína (PENZES; NAPOLI, 1999). Já foi mostrado que CRABP1, a iLBP mais homóloga à CRABP2, também forma dímeros. Entretanto, isso acontece na ausência de ligante (KRISHNAN et al., 2000; THOMPSON; BRATT; BANASZAK, 1995). Holo-CRABP2 e apo-CRABP1 apresentam superfícies de dimerização diferentes. A região do *gap* é responsável por mediar a dimerização de apo-CRABP1, formando um barril constituído por 20 fitas- β e que apresenta uma cavidade mais aberta e acessível ao ligante (THOMPSON; BRATT; BANASZAK, 1995).

A proteína FABP4, uma iLBP que, assim como CRABP2, possui uma sequência NLS tridimensional não-canônica localizada no motivo hélice-alça-hélice e ativada por interação com ligante, também dimeriza via uma interface hidrofóbica presente na hélice $\alpha 2$. A dimerização de FABP4 tem consequências para a sua translocação para o núcleo, visto que ligantes que não são capazes de ativar o NLS de FABP4 e que induzem a sua dimerização, previnem a sua interação com importinas nucleares (GILLILAN; AYERS; NOY, 2007). Em contraste ao que se observa para FABP4, com a dimerização de CRABP2, o NLS fica exposto ao solvente, potencialmente aumentando as chances de importação de holo-CRABP2 para o núcleo e, conseqüentemente, a ativação de RARs. Com a dimerização de holo-CRABP2, duas moléculas seriam transportadas para o núcleo de maneira simultânea, acelerando o aumento da concentração de AR no núcleo. A dimerização de uma subpopulação de holo-CRABP2 pode ter um papel na regulação fina das múltiplas ações desempenhadas pela proteína, além de promover o uso eficiente de AR nas células, protegendo uma pequena concentração de AR, que é uma molécula relativamente escassa, da degradação por CYP26B1, por exemplo (NELSON et al., 2016).

Eventos de troca conformacional já foram previamente descritos para outras iLBPs e a correlação entre a dinâmica dessas proteínas na escala de μ s-ms e o evento de interação com o ligante foi alvo de muitas investigações (RAGONA et al., 2014). Sugere-se que os estados livre e ligado das iLBPs oscilem entre uma conformação aberta e fechada, respectivamente, mediada por transições ordem-desordem (HORVÁTH et al., 2017). Os resultados de dispersão de relaxação por CPMG mostraram que os resíduos presentes na região do portal e do *gap* de apo-CRABP2 apresentam dinâmica intermediária na forma livre. A dinâmica de CRABP2 nesta escala de tempo foi suprimida pela presença de AR, inclusive para resíduos que fazem parte do sítio de interação com AR (KLEYWEGT et al., 1994). Porém, apesar de ter sido observada uma boa correlação entre os resíduos que tiveram sua dinâmica intermediária suprimida pela presença de AR nos experimentos de CPMG e os resíduos que apresentaram CSPs entre apo e

holo-CRABP2, os valores de $\Delta\omega$ obtidos a partir dos resultados de CPMG não concordam com as diferenças de deslocamento químico ($\Delta\delta$) medidas por CSP (**Figura 44**). Isso sugere que o estado excitado de CRABP2 é estruturalmente distinto do complexo AR:CRABP2. Além disso, a partir da caracterização cinética da interação entre AR e CRABP2, foi possível concluir que os eventos de troca conformacional observados para apo-CRABP2 não constituem a etapa limitante para a interação com o ligante, visto que esses eventos ocorrem em escalas de tempo distintas. O evento de formação do complexo AR:CRABP2 ocorre em uma escala de tempo muito mais rápida do que os eventos de troca conformacional observados para apo-CRABP2.

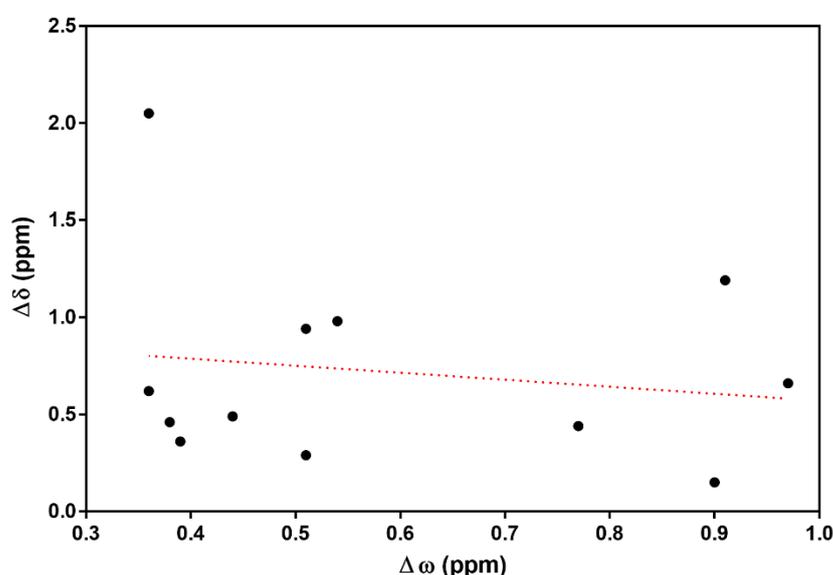


Figura 44: Comparação entre os valores de $\Delta\delta$ e $\Delta\omega$ (ppm) obtidos para apo-CRABP2 nos experimentos de CSP e CPMG, respectivamente.

De maneira análoga ao que foi observado para CRABP2, os eventos de troca conformacional observados para FABP1 humana na forma livre foram suprimidos na presença de ligante. Entretanto, também foi observada uma incompatibilidade entre os tempos de escala desses eventos de troca e a cinética de interação com o ligante (LONG; YANG, 2010). A supressão de eventos de troca conformacional na presença de ligante também foi verificada para a proteína FABP6 (COGLIATI et al., 2010). Assim como para CRABP2, foi observada a sobreposição entre os resíduos que apresentaram dinâmica intermediária na ausência de ligante e resíduos que apresentaram CSPs significativos entre os estados livre e ligado de FABP6. Porém, também não foi observada uma relação linear entre as diferenças de deslocamento químico determinadas por CPMG e por CSP (COGLIATI et al., 2010). Entretanto, quando a comparação foi feita com resíduos distantes do ligante, uma correlação entre os valores de $\Delta\omega$

(CPMG) e $\Delta\delta$ (CSP) foi observada, sugerindo que o equilíbrio conformacional de FABP6 envolve uma conformação correspondente a forma ligada da proteína.

A conformação “invisível” experimentada por apo-CRABP2 não está necessariamente envolvida com o mecanismo de interação com AR. Entretanto, a existência desse equilíbrio conformacional parece ser crítico para a realização das diferentes funções de CRABP2 que são mediadas via interação com múltiplos parceiros moleculares. Holo-CRABP2 deve ser transportada para o núcleo por importinas nucleares e, uma vez no núcleo, interage com RARs e entrega AR diretamente a eles. As regiões críticas para a interação com importinas (NLS formado por Lys20, Arg29 e Lys30), ligação a RARs (Gln74, Pro80 e Lys101) e dimerização de holo-CRABP2 são todas dinâmicas na ausência de ligante, mas têm sua dinâmica suprimida na presença de AR. Por exemplo, o complexo formado entre AR:CRABP2 e RARs é transiente e nunca foi isolado, mesmo com a utilização de diferentes técnicas. Ou seja, após a liberação do AR da cavidade de CRABP2 a partir da interação com RARs, a superfície que realiza a interação entre as duas proteínas passa a apresentar dinâmica intermediária, como é observado para apo-CRABP2, desfazendo rapidamente o complexo. A desestabilização do NLS com a liberação de AR para RARs também pode potencialmente ser responsável pela translocação da proteína para o citoplasma. Sendo assim, a amplitude do conjunto de conformações experimentada por CRABP2 livre reflete uma entropia conformacional que interfere na capacidade de interação entre a proteína e seus diferentes parceiros moleculares. A formação do complexo entre AR e CRABP2 tem como efeito primário a restrição drástica do número de conformações experimentadas por apo-CRABP2. Essa mudança faz com que holo-CRABP2 possa ser distinguida de apo-CRABP2, mesmo que a interação com o ligante não cause mudanças significativas na estrutura tridimensional dos dois estados. A “rigidificação” de CRABP2 causada por AR diminui o custo entrópico da interação com outros parceiros moleculares.

Devido as similaridades observadas entre as estruturas livre e ligada a AR de CRABP2, estudos anteriores sugeriram que a interação entre CRABP2 e seus parceiros moleculares deve ser mediada por mudanças na flexibilidade de CRABP2 (VAEZESLAMI et al., 2006). No presente trabalho foi possível quantificar essas mudanças na dinâmica de CRABP2, identificar o tempo de escala em que elas acontecem (μs - ms) e correlacioná-las a regiões funcionalmente importantes de CRABP2, racionalizando a ativação da proteína para interações com parceiros moleculares por AR, apesar das poucas diferenças estruturais observadas entre apo e holo-CRABP2.

6 CONCLUSÃO

- Holo-CRABP2 apresenta estabilidade térmica maior do que apo-CRABP2 ($\Delta T_m = 15$ °C).
- A dinâmica rápida de CRABP2 (ps-ns) foi pouco alterada pela presença de AR. A flexibilidade das alças $\beta C-\beta D$ e $\beta E-\beta F$ foi suprimida pela presença do ligante enquanto a alça $\beta G-\beta H$ se mostrou flexível em ambos os casos.
- A presença de AR levou a autoassociação de CRABP2, mediada por resíduos presentes na região do portal e das fitas $\beta I-\beta J$. A superfície de dimerização de CRABP2 mapeada por RMN coincide com a interface que medeia a formação de um dímero na estrutura cristalográfica de holo-CRABP2 (2FR3).
- Eventos de troca conformacional foram observados para resíduos presentes na região do portal e do *gap* de CRABP2 na ausência de ligante (^{15}N CPMG). A dinâmica intermediária de CRABP2 foi suprimida com a formação do complexo AR:CRABP2.
- Em holo-CRABP2, resíduos presentes nas fitas $\beta I-\beta A$, na hélice $\alpha 1$ e na alça $\alpha 2-\beta B$ apresentaram movimentos em uma escala de tempo mais rápida que não estão relacionados a dinâmica intermediária de apo-CRABP2.
- Os eventos de troca conformacional presentes em CRABP2 livre não são a etapa limitante do mecanismo de interação entre a proteína e AR, visto que não existe uma relação linear entre os valores de $\Delta\delta$ e $\Delta\omega$ obtidos nos experimentos de titulação da proteína com o ligante e no ajuste dos dados de CPMG, respectivamente. Além disso, a caracterização cinética da interação entre CRABP2 e AR realizada por SPR mostrou que os eventos de troca conformacional e de interação com o ligante não acontecem na mesma escala de tempo.

REFERÊNCIAS

- AALTEN, D. M. F. V. et al. Essential dynamics of the cellular retinol-binding protein evidence for ligand-induced conformational changes. **Protein Engineering, Design and Selection**, 1995.
- AL TANOURY, Z.; PISKUNOV, A.; ROCHETTE-EGLY, C. Vitamin A and retinoid signaling: genomic and nongenomic effects. **Journal of Lipid Research**, v. 54, n. 7, p. 1761–1775, 2013.
- ALBALAT, R. The retinoic acid machinery in invertebrates: Ancestral elements and vertebrate innovations. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 313, n. 1–2, p. 23–35, 10 dez. 2009.
- ALTUCCI, L. et al. RAR and RXR modulation in cancer and metabolic disease. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 6, n. 10, p. 793–810, out. 2007.
- ALTUCCI, L.; GRONEMEYER, H. The promise of retinoids to fight against cancer. **Nature reviews. Cancer**, v. 1, n. 3, p. 181–193, 2001.
- ARANDA, A.; PASCUAL, A. Nuclear Hormone Receptors and Gene Expression. **Physiological Reviews**, v. 81, n. 3, p. 1269–1304, jul. 2001.
- AVERS, S. D. et al. Continuous nucleocytoplasmic shuttling underlies transcriptional activation of PPAR γ by FABP4. **Biochemistry**, v. 46, n. 23, p. 6744–6752, 2007.
- BALMER, J. E.; BLOMHOFF, R. Gene expression regulation by retinoic acid. **Journal of lipid research**, v. 43, n. 11, p. 1773–808, nov. 2002.
- BANASZAK, L. et al. Lipid-Binding Proteins: A Family of Fatty Acid and Retinoid Transport Proteins. **Adv Protein Chem**, v. 45, p. 89–151, 1994.
- BAR-EL DADON, S.; REIFEN, R. Vitamin A and the epigenome. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 11, p. 2404–2411, 24 jul. 2017.
- BARBUS, S. et al. Differential Retinoic Acid Signaling in Tumors of Long- and Short-term Glioblastoma Survivors. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 103, n. 7, p. 598–601, 6 abr. 2011.
- BERRY, D. C.; NOY, N. Is PPARbeta/delta a Retinoid Receptor? **PPAR research**, v. 2007, p. 73256, 2007.
- BLOMHOFF, R. et al. In vivo uptake of chylomicron [3H]retinyl ester by rat liver: evidence for retinol transfer from parenchymal to nonparenchymal cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 79, n. 23, p. 7326–30, 1 dez. 1982.
- BLOMHOFF, R. et al. Transport and storage of vitamin A. **Science**, v. 250, n. 4979, p. 399–404, 19 out. 1990.

BLOMHOFF, R.; BLOMHOFF, H. K. Overview of retinoid metabolism and function. **Journal of Neurobiology**, v. 66, n. 7, p. 606–630, jun. 2006.

BOIVIN, S.; KOZAK, S.; MEIJERS, R. Optimization of protein purification and characterization using Thermofluor screens. **Protein expression and purification**, v. 91, n. 2, p. 192–206, out. 2013.

BOLLAG, W. VITAMIN A AND RETINOIDS: FROM NUTRITION TO PHARMACOTHERAPY IN DERMATOLOGY AND ONCOLOGY. **The Lancet**, v. 321, n. 8329, p. 860–863, abr. 1983.

BOOKOUT, A. L. et al. Anatomical Profiling of Nuclear Receptor Expression Reveals a Hierarchical Transcriptional Network. **Cell**, v. 126, n. 4, p. 789–799, 25 ago. 2006.

BRINKMANN, A. O. Steroid Hormone Receptors: Activators of Gene Transcription. **Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism**, v. 7, n. 4, jan. 1994.

BUDHU, A.; GILLILAN, R.; NOY, N. Localization of the RAR interaction domain of cellular retinoic acid binding protein-II. **Journal of Molecular Biology**, v. 305, n. 4, p. 939–949, 26 jan. 2001.

BUDHU, A.; NOY, N. Direct channeling of retinoic acid between cellular retinoic acid-binding protein II and retinoic acid receptor sensitizes mammary carcinoma cells to retinoic acid-induced growth arrest. **Mol Cell Biol**, v. 22, p. 2632–2641, 2002.

CAI, J. et al. Solution Structure and Backbone Dynamics of Human Liver Fatty Acid Binding Protein: Fatty Acid Binding Revisited. **Biophysical Journal**, v. 102, n. 11, p. 2585–2594, 6 jun. 2012.

CARR, H. Y.; PURCELL, E. M. Effects of Diffusion on Free Precession in Nuclear Magnetic Resonance Experiments. **Physical Review**, v. 94, n. 3, p. 630–638, 1 maio 1954.

CARVER, J. P.; RICHARDS, R. E. A general two-site solution for the chemical exchange produced dependence of T2 upon the carr-Purcell pulse separation. **Journal of Magnetic Resonance (1969)**, v. 6, n. 1, p. 89–105, 1972.

CHANDRA, V. et al. The quaternary architecture of RAR β -RXR α heterodimer facilitates domain-domain signal transmission. **Nature communications**, v. 8, n. 1, p. 868, 11 dez. 2017.

CHAWLA, A. et al. Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. **Science (New York, N.Y.)**, v. 294, n. 5548, p. 1866–70, 30 nov. 2001.

CHEN, R.; FENG, C.; XU, Y. Cyclin-dependent kinase-associated protein Cks2 is associated with bladder cancer progression. **The Journal of international medical research**, v. 39, n. 2, p. 533–40, abr. 2011.

CHEN, X. et al. Crystal structure of apo-cellular retinoic acid-binding protein type II (R111M) suggests a mechanism of ligand entry. **Journal of Molecular Biology**, v. 278, n. 3, p. 641–653, 8 maio 1998.

CHIU, M.; DILLON, A.; WATSON, S. Vitamin A deficiency and xerophthalmia in children of a developed country. **Journal of Paediatrics and Child Health**, v. 52, n. 7, p. 699–703, jul. 2016.

COGLIATI, C. et al. Site-Specific Investigation of the Steady-State Kinetics and Dynamics of the Multistep Binding of Bile Acid Molecules to a Lipid Carrier Protein. **Chemistry - A European Journal**, v. 16, n. 37, p. 11300–11310, 16 ago. 2010.

COLLINS, M. D.; MAO, G. E. Teratology of Retinoids. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 39, n. 1, p. 399–430, 28 abr. 1999.

DE LUCA, L. M. Retinoids and their receptors in differentiation, embryogenesis, and neoplasia. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 5, n. 14, p. 2924–33, 1 nov. 1991.

DELAGLIO, F. et al. NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. **Journal of biomolecular NMR**, v. 6, n. 3, p. 277–93, nov. 1995.

DELFOSSÉ, V. et al. A structural perspective on nuclear receptors as targets of environmental compounds. **Acta pharmacologica Sinica**, v. 36, n. 1, p. 88–101, 15 jan. 2015.

DESVERGNE, B.; WAHLI, W. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: Nuclear Control of Metabolism*. **Endocrine Reviews**, v. 20, n. 5, p. 649–688, 1 out. 1999.

DEVERY, J.; MILBORROW, B. V. β -Carotene-15,15'-dioxygenase (EC 1.13.11.21) isolation reaction mechanism and an improved assay procedure. **British Journal of Nutrition**, v. 72, n. 3, p. 397–414, 9 set. 1994.

DONG, D. et al. Distinct roles for cellular retinoic acid-binding proteins I and II in regulating signaling by retinoic acid. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 34, p. 23695–23698, 1999.

DONOVAN, M. et al. The cellular retinoic acid binding proteins. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 53, p. 459–465, 1995.

DUESTER, G. Retinoic Acid Synthesis and Signaling during Early Organogenesis. **Cell**, v. 134, n. 6, p. 921–931, 19 set. 2008.

EBERHARDT, J. et al. A revisited version of the apo structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor retinoic X receptor α . **Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications**, v. 75, n. 2, p. 98–104, 1 fev. 2019.

EDWARDS, D. A.; EVANS, R. M.; LI, W. Measuring kinetic rate constants of multiple-component reactions with optical biosensors. **Analytical biochemistry**, v. 533, p. 41–47, 15 set. 2017.

FARBER, P. J.; MITTERMAIER, A. Relaxation dispersion NMR spectroscopy for the study of protein allostery. **Biophysical Reviews**, v. 7, n. 2, p. 191–200, 2015.

FARROW, N. A. et al. Backbone dynamics of a free and phosphopeptide-complexed Src homology 2 domain studied by ^{15}N NMR relaxation. **Biochemistry**, v. 33, n. 19, p. 5984–6003, 17 maio 1994.

FOGH, K.; VOORHEES, J. J.; ASTROM, A. Expression, Purification, and Binding Properties of Human Cellular Retinoic Acid-Binding Protein Type I and Type II. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 300, n. 2, p. 751–755, fev. 1993.

GERMAIN, P. et al. International Union of Pharmacology. LX. Retinoic Acid Receptors. **Pharmacological Reviews**, v. 58, n. 4, p. 712–725, dez. 2006.

GILLILAN, R. E.; AYERS, S. D.; NOY, N. Structural Basis for Activation of Fatty Acid Binding Protein 4 Richard. v. 100, n. 2, p. 130–134, 2007.

GLATZ, J. F. C. Lipids and lipid binding proteins: A perfect match. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 93, p. 45–49, 2015.

GOTTESMAN, M. E.; QUADRO, L.; BLANER, W. S. Studies of vitamin A metabolism in mouse model systems. **BioEssays**, v. 23, n. 5, p. 409–419, maio 2001.

GRONEMEYER, H.; GUSTAFSSON, J.-Å.; LAUDET, V. Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 11, p. 950–964, nov. 2004.

HANAHAN, D. Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. **Journal of molecular biology**, v. 166, n. 4, p. 557–80, 5 jun. 1983.

HARRISON, E. H. Enzymes catalyzing the hydrolysis of retinyl esters. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1170, n. 2, p. 99–108, 13 out. 1993.

HARRISON, E. H. MECHANISMS OF DIGESTION AND ABSORPTION OF DIETARY VITAMIN A. **Annual Review of Nutrition**, v. 25, n. 1, p. 87–103, 21 ago. 2005.

HERR, F. M.; ONG, D. E. Differential interaction of lecithin-retinol acyltransferase with cellular retinol binding proteins. **Biochemistry**, v. 31, n. 29, p. 6748–55, 28 jul. 1992.

HODSDON, M. E.; CISTOLA, D. P. Discrete backbone disorder in the nuclear magnetic resonance structure of apo intestinal fatty acid-binding protein: implications for the mechanism of ligand entry. **Biochemistry**, v. 36, n. 6, p. 1450–60, 11 fev. 1997.

HORVÁTH, G. et al. Structural insight into a partially unfolded state preceding aggregation in an intracellular lipid-binding protein. **FEBS Journal**, v. 284, n. 21, p. 3637–3661, 2017.

HUANG, P.; CHANDRA, V.; RASTINEJAD, F. Retinoic Acid Actions through Mammalian Nuclear Receptors. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 1, p. 233–254, 8 jan. 2014.

ISHIMA, R.; TORCHIA, D. A. Protein dynamics from NMR. **Nature structural biology**, v. 7, n. 9, p. 740–3, set. 2000.

JAMISON, R. S.; NEWCOMER, M. E.; ONG, D. E. Cellular retinoid-binding proteins:

limited proteolysis reveals a conformational change upon ligand binding. **Biochemistry**, v. 33, n. 10, p. 2873–2879, 15 mar. 1994.

JUGE-AUBRY, C. et al. DNA binding properties of peroxisome proliferator-activated receptor subtypes on various natural peroxisome proliferator response elements. Importance of the 5'-flanking region. **The Journal of biological chemistry**, v. 272, n. 40, p. 25252–9, 3 out. 1997.

KAWAGUCHI, R. et al. A Membrane Receptor for Retinol Binding Protein Mediates Cellular Uptake of Vitamin A. **Science**, v. 315, n. 5813, p. 820–825, 9 fev. 2007.

KAY, L. E. New Views of Functionally Dynamic Proteins by Solution NMR Spectroscopy. **Journal of Molecular Biology**, v. 428, n. 2, p. 323–331, 2016.

KAY, L. E.; TORCHIA, D. A.; BAX, A. Backbone dynamics of proteins as studied by ¹⁵N inverse detected heteronuclear NMR spectroscopy: application to staphylococcal nuclease. **Biochemistry**, v. 28, n. 23, p. 8972–9, 14 nov. 1989.

KLECKNER, I. R.; FOSTER, M. P. An introduction to NMR-based approaches for measuring protein dynamics. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1814, n. 8, p. 942–968, 2011.

KLEYWEGT, G. J. et al. Crystal structures of cellular retinoic acid binding proteins I and II in complex with all-trans-retinoic acid and a synthetic retinoid. **Structure**, v. 2, n. 12, p. 1241–1258, 1994.

KOVERMANN, M.; ROGNE, P.; WOLF-WATZ, M. Protein dynamics and function from solution state NMR spectroscopy. **Quarterly Reviews of Biophysics**, v. 49, p. e6, 14 mar. 2016.

KRISHNAN, V. V. et al. Dynamics of cellular retinoic acid binding protein I on multiple time scales with implications for ligand binding. **Biochemistry**, v. 39, n. 31, p. 9119–9129, 2000.

KUMAR, G. S. et al. Dynamic activation and regulation of the mitogen-activated protein kinase p38. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 18, p. 4655–4660, 2018.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–5, 15 ago. 1970.

LANGE, O. F. et al. Recognition dynamics up to microseconds revealed from an RDC-derived ubiquitin ensemble in solution. **Science**, v. 320, n. 5882, p. 1471–1475, 13 jun. 2008.

LEID, M.; KASTNER, P.; CHAMBON, P. Multiplicity generates diversity in the retinoic acid signalling pathways. **Trends in biochemical sciences**, v. 17, n. 10, p. 427–33, out. 1992.

LEVI, L. et al. Genetic Ablation of the Fatty Acid-Binding Protein FABP5 Suppresses HER2-Induced Mammary Tumorigenesis. **Cancer Research**, v. 73, n. 15, p. 4770–4780, 1 ago. 2013.

LI, E.; TSO, P. Vitamin A uptake from foods. **Current opinion in lipidology**, v. 14, n. 3, p. 241–7, jun. 2003.

LIN, Q. et al. Ligand Selectivity of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α [†]. **Biochemistry**, v. 38, n. 1, p. 185–190, 5 jan. 1999.

LONG, D.; YANG, D. Millisecond timescale dynamics of human liver fatty acid binding protein: Testing of its relevance to the ligand entry process. **Biophysical Journal**, v. 98, n. 12, p. 3054–3061, 2010.

LORIA, J. P.; RANCE, M.; PALMER, A. G. Transverse-relaxation-optimized (TROSY) gradient-enhanced triple-resonance NMR spectroscopy. **Journal of magnetic resonance (San Diego, Calif. : 1997)**, v. 141, n. 1, p. 180–4, nov. 1999.

LU, J. et al. The structure and dynamics of rat apo-cellular retinol-binding protein II in solution: Comparison with the X-ray structure. **Journal of Molecular Biology**, v. 286, n. 4, p. 1179–1195, 1999.

LU, J.; CISTOLA, D. P.; LI, E. Two homologous rat cellular retinol-binding proteins differ in local conformational flexibility. **Journal of molecular biology**, v. 330, n. 4, p. 799–812, 2003.

LÜCKE, C. et al. New insights into intracellular lipid binding proteins: The role of buried water. **Protein Science**, v. 11, n. 10, p. 2382–2392, 2002.

MAJUMDAR, A. et al. Nuclear translocation of cellular retinoic acid-binding protein II is regulated by retinoic acid-controlled SUMOylation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 49, p. 42749–42757, 2011.

MANOR, D. et al. Mammary carcinoma suppression by cellular retinoic acid binding protein-II. **Cancer Research**, v. 63, p. 4426–4433, 2003.

MARK, M.; GHYSELINCK, N. B.; CHAMBON, P. Function of retinoid nuclear receptors: lessons from genetic and pharmacological dissections of the retinoic acid signaling pathway during mouse embryogenesis. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 46, n. 1, p. 451–80, fev. 2006.

MASOUYÉ, I.; SAURAT, J.-H.; SIEGENTHALER, G. Epidermal Fatty-Acid-Binding Protein in Psoriasis, Basal and Squamous Cell Carcinomas: An Immunohistological Study. **Dermatology**, v. 192, n. 3, p. 208–213, 1996.

MEIBOOM, S.; GILL, D. Modified Spin-Echo Method for Measuring Nuclear Relaxation Times. **Review of Scientific Instruments**, v. 29, n. 8, p. 688–691, 29 ago. 1958.

MENOZZI, I. et al. Structural and molecular determinants affecting the interaction of retinol with human CRBP1. **Journal of Structural Biology**, v. 197, n. 3, p. 330–339, 2017.

MITTERMAIER, A. K.; KAY, L. E. Observing biological dynamics at atomic resolution using NMR. **Trends in biochemical sciences**, v. 34, n. 12, p. 601–11, 2009.

MITTERMAIER, A.; KAY, L. E. New Tools Provide New Insights in NMR Studies of Protein Dynamics. **Science**, v. 312, n. 5771, p. 224–228, 14 abr. 2006.

MORRISS-KAY, G. M.; WARD, S. J. Retinoids and mammalian development. **International review of cytology**, v. 188, p. 73–131, 1999.

MYSZKA, D. G. et al. Kinetic analysis of a protein antigen-antibody interaction limited by mass transport on an optical biosensor. **Biophysical chemistry**, v. 64, n. 1–3, p. 127–37, 28 fev. 1997.

NAGY, L.; SCHWABE, J. W. R. Mechanism of the nuclear receptor molecular switch. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 29, n. 6, p. 317–324, jun. 2004.

NAPOLI, J. L. Biosynthesis and metabolism of retinoic acid: roles of CRBP and CRABP in retinoic acid homeostasis. **The Journal of Nutrition**, v. 123, n. suppl_2, p. 362–366, 1993.

NAPOLI, J. L. Biochemical pathways of retinoid transport, metabolism, and signal transduction. **Clinical immunology and immunopathology**, v. 80, n. 3 Pt 2, p. S52–62, set. 1996.

NAPOLI, J. L. Physiological insights into all-trans-retinoic acid biosynthesis. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1821, n. 1, p. 152–167, 2012.

NAPOLI, J. L. Functions of Intracellular Retinoid Binding-Proteins. In: **Sub-cellular biochemistry**. [s.l: s.n.]. v. 81p. 21–76.

NELSON, C. H. et al. Direct protein–protein interactions and substrate channeling between cellular retinoic acid binding proteins and CYP26B1. **FEBS Letters**, v. 590, n. 16, p. 2527–2535, 2016.

NEWMAN, J.; IUCR. Novel buffer systems for macromolecular crystallization. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, v. 60, n. 3, p. 610–612, 1 mar. 2004.

NORRIS, A. W. et al. Measurement of subnanomolar retinoic acid binding affinities for cellular retinoic acid binding proteins by fluorometric titration. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1209, n. 1, p. 10–8, 1994.

NOY, N. Ligand specificity of nuclear hormone receptors: sifting through promiscuity. **Biochemistry**, v. 46, n. 47, p. 13461–7, 27 nov. 2007.

NOY, N. Between Death and Survival: Retinoic Acid in Regulation of Apoptosis. **Annual Review of Nutrition**, v. 30, n. 1, p. 201–217, 2010.

NOY, N. Non-classical Transcriptional Activity of Retinoic Acid. In: **Sub-cellular biochemistry**. [s.l: s.n.]. v. 81p. 179–199.

OLSON, J. A. Needs and Sources of Carotenoids and Vitamin A. **Nutrition Reviews**, v. 52, n. 2, p. S67–S73, 27 abr. 2009.

PAIK, J. et al. Vitamin A: overlapping delivery pathways to tissues from the circulation. **The Journal of nutrition**, v. 134, n. 1, p. 276S-280S, 1 jan. 2004.

PALCZEWSKI, K. Chemistry and Biology of Vision. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 3, p. 1612–1619, 13 jan. 2012.

PALMER, A. G. Nmr probes of molecular dynamics: overview and comparison with other techniques. **Annual review of biophysics and biomolecular structure**, v. 30, p. 129–55, jan. 2001.

PALMER, A. G. NMR characterization of the dynamics of biomacromolecules. **Chemical reviews**, v. 104, n. 8, p. 3623–40, ago. 2004.

PARÉS, X. et al. Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families : Medium-chain and short-chain dehydrogenases/reductases in retinoid metabolism. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 65, n. 24, p. 3936–49, 14 dez. 2008.

PENG, J. W.; WAGNER, G. Mapping of the spectral densities of N-H bond motions in eglin c using heteronuclear relaxation experiments. **Biochemistry**, v. 31, n. 36, p. 8571–86, 15 set. 1992.

PENZES, P.; NAPOLI, J. L. Holo-cellular retinol-binding protein: Distinction of ligand-binding affinity from efficiency as substrate in retinal biosynthesis. **Biochemistry**, v. 38, n. 7, p. 2088–2093, 1999.

PETKOVICH, P. M. Retinoic acid metabolism. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 45, n. 5, p. S136-42, nov. 2001.

RAGONA, L. et al. The role of dynamics in modulating ligand exchange in intracellular lipid binding proteins. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1844, n. 7, p. 1268–1278, 2014.

RASTINEJAD, F. et al. Understanding nuclear receptor form and function using structural biology. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 51, n. 3, p. T1–T21, dez. 2013.

RLJ., K. **The Computer Aided Resonance Assignment Tutorial**. First ed. [s.l.] CANTINA Verlag, Germany, 2004.

ROSS, A. C.; TERNUS, M. E. Vitamin A as a hormone: recent advances in understanding the actions of retinol, retinoic acid, and beta carotene. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 93, n. 11, p. 1285–90; quiz 1291–2, nov. 1993.

SCHUG, T. et al. Opposing effects of retinoic acid on cell growth result from alternate activation of two different nuclear receptors. **Cell**, v. 129, p. 723–733, 2007.

SCHUG, T. et al. Overcoming retinoic acid-resistance of mammary carcinomas by diverting retinoic acid from PPARbeta/delta to RAR. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, p. 7546–7551, 2008a.

SCHUG, T. T. et al. Overcoming retinoic acid-resistance of mammary carcinomas by

diverting retinoic acid from PPAR / to RAR. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 21, p. 7546–7551, 27 maio 2008b.

SENOO, H. Structure and function of hepatic stellate cells. **Medical Electron Microscopy**, v. 37, n. 1, p. 3–15, 1 mar. 2004.

SESSLER, R.; NOY, N. A ligand-activated nuclear localization signal in cellular retinoic acid binding protein-II. **Mol. Cell**, v. 18, p. 343–353, 2005.

SHAW, N.; ELHOLM, M.; NOY, N. Retinoic acid is a high affinity selective ligand for the peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta. **J Biol Chem**, v. 278, p. 41589–41592, 2003a.

SHAW, N.; ELHOLM, M.; NOY, N. Retinoic Acid is a High Affinity Selective Ligand for the Peroxisome Proliferator-activated Receptor β/δ . **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 43, p. 41589–41592, 2003b.

SHEN, Y.; BAX, A. Protein backbone and sidechain torsion angles predicted from NMR chemical shifts using artificial neural networks. **Journal of biomolecular NMR**, v. 56, n. 3, p. 227–41, 2 jul. 2013.

SMATHERS, R. L.; PETERSEN, D. R. The human fatty acid-binding protein family: evolutionary divergences and functions. **Human genomics**, v. 5, n. 3, p. 170–91, mar. 2011.

SOPRANO, D.; QIN, P.; SOPRANO, K. Retinoic acid receptors and cancers. **Annu. Rev. Nutr**, v. 24, p. 201–221, 2004.

STEPHENSON, C. B. V ITAMIN A, I NFECTION , AND I MMUNE F UNCTION *. **Annual Review of Nutrition**, v. 21, n. 1, p. 167–192, jul. 2001.

STONE, M. J. et al. Backbone dynamics of the Bacillus subtilis glucose permease IIA domain determined from ^{15}N NMR relaxation measurements. **Biochemistry**, v. 31, n. 18, p. 4394–406, 12 maio 1992.

THEODOSIOU, M.; LAUDET, V.; SCHUBERT, M. From carrot to clinic: an overview of the retinoic acid signaling pathway. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 67, n. 9, p. 1423–45, 7 maio 2010.

THOMPSON, J. R.; BRATT, J. M.; BANASZAK, L. J. Crystal Structure of Cellular Retinoic Acid Binding Protein I Shows Increased Access to the Binding Cavity due to Formation of an Intermolecular β -Sheet. **Journal of Molecular Biology**, v. 252, n. 4, p. 433–446, 29 set. 1995.

TSFADIA, Y. et al. Molecular dynamics simulations of palmitate entry into the hydrophobic pocket of the fatty acid binding protein. **FEBS Letters**, v. 581, n. 6, p. 1243–1247, 2007.

VAEZESLAMI, S. et al. The Structure of Apo-wild-type Cellular Retinoic Acid Binding Protein II at 1.4 Å and its Relationship to Ligand Binding and Nuclear Translocation. **Journal of Molecular Biology**, v. 363, n. 3, p. 687–701, 2006.

- VAEZESLAMI, S. et al. Structural analysis of site-directed mutants of cellular retinoic acid-binding protein II addresses the relationship between structural integrity and ligand binding. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 64, n. 12, p. 1228–1239, 1 dez. 2008.
- VALENTE, A. P.; MIYAMOTO, C. A.; ALMEIDA, F. C. L. Implications of protein conformational diversity for binding and development of new biological active compounds. **Current medicinal chemistry**, v. 13, n. 30, p. 3697–703, 2006.
- VASILEIOU, C. et al. Dissection of the critical binding determinants of cellular retinoic acid binding protein II by mutagenesis and fluorescence binding assay. **Proteins: Structure, Function and Bioinformatics**, v. 76, n. 2, p. 281–290, 2009.
- VOGEL HERTZEL, A.; BERNLOHR, D. A. The Mammalian Fatty Acid-binding Protein Multigene Family: Molecular and Genetic Insights into Function. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 11, n. 5, p. 175–180, jul. 2000.
- VRANKEN, W. F. et al. The CCPN data model for NMR spectroscopy: development of a software pipeline. **Proteins**, v. 59, n. 4, p. 687–96, 1 jun. 2005.
- VREELAND, A. C. et al. Cellular retinoic acid-binding protein 2 inhibits tumor growth by two distinct mechanisms. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 49, p. 34065–34073, 2014a.
- VREELAND, A. C. et al. Transcript Stabilization by the RNA-Binding Protein HuR Is Regulated by Cellular Retinoic Acid-Binding Protein 2. **Molecular and Cellular Biology**, v. 34, n. 12, p. 2135–2146, jun. 2014b.
- WALD, G. Molecular Basis of Visual Excitation. **Science**, v. 162, n. 3850, p. 230–239, 11 out. 1968.
- WANG, D. et al. Crosstalk between peroxisome proliferator-activated receptor delta and VEGF stimulates cancer progression. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 103, p. 19069–19074, 2006.
- WANG, L. et al. NMR solution structure of type II human cellular retinoic acid binding protein: Implications for ligand binding. **Biochemistry**, v. 37, n. 37, p. 12727–12736, 1998.
- WANG, L.; LI, Y.; YAN, H. Structure-function relationships of cellular retinoic acid-binding proteins. Quantitative analysis of the ligand binding properties of the wild-type proteins and site-directed mutants. **The Journal of biological chemistry**, v. 272, n. 3, p. 1541–7, 17 jan. 1997.
- WANG, L.; YAN, H. NMR study suggests a major role for Arg111 in maintaining the structure and dynamical properties of type II human cellular retinoic acid binding protein. **Biochemistry**, v. 37, n. 37, p. 13021–13032, 1998.
- WANG, L.; YAN, H. NMR study of the binding of all-trans-retinoic acid to type II human cellular retinoic acid binding protein. **Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1433, n. 1–2, p. 240–252, 1999.

WARDLAW, S. A. et al. Variable expression of cellular retinol- and cellular retinoic acid-binding proteins in the rat uterus and ovary during the estrous cycle. **Biology of reproduction**, v. 56, n. 1, p. 125–32, 1 jan. 1997.

WATANABE, R. et al. Immunohistochemical distribution of cutaneous fatty acid-binding protein in human skin. **Journal of dermatological science**, v. 16, n. 1, p. 17–22, nov. 1997.

WEI, L.-N. Cellular Retinoic Acid Binding Proteins: Genomic and Non-genomic Functions and their Regulation. In: **Sub-cellular biochemistry**. [s.l: s.n.]. v. 81p. 163–178.

WOLF, G. Cellular retinoic acid-binding protein II: a coactivator of the transactivation by the retinoic acid receptor complex RAR.RXR. **Nutr Rev**, v. 58, n. 5, p. 151–153, 2000.

YAMAMOTO, M. et al. Retinoid-binding proteins in the cerebellum and choroid plexus and their relationship to regionalized retinoic acid synthesis and degradation. **European Journal of Biochemistry**, v. 257, n. 2, p. 344–350, 15 out. 1998.

YOUNG, A. C. et al. Structural studies on human muscle fatty acid binding protein at 1.4 Å resolution: binding interactions with three C18 fatty acids. **Structure (London, England : 1993)**, v. 2, n. 6, p. 523–34, 15 jun. 1994.

ZANOTTI, G.; BERNI, R. Plasma Retinol-Binding Protein: Structure and Interactions with Retinol, Retinoids, and Transthyretin. In: **Vitamins and hormones**. [s.l: s.n.]. v. 69p. 271–295.

ZHANG, W.; VREELAND, A. C.; NOY, N. RNA-binding protein HuR regulates protein nuclear import. **Journal of Cell Science**, v. 129, n. 21, p. 4025–4033, 2016.

ZHENG, W. L. et al. Localization of cellular retinoic acid-binding protein (CRABP) II and CRABP in developing rat testis. **Endocrinology**, v. 137, n. 11, p. 5028–35, nov. 1996.

ZHENG, W. L.; ONG, D. E. Spatial and Temporal Patterns of Expression of Cellular Retinol-Binding Protein and Cellular Retinoic Acid-Binding Proteins in Rat Uterus during Early Pregnancy¹. **Biology of Reproduction**, v. 58, n. 4, p. 963–970, 1 abr. 1998.