

HANS GRAF

**ATIVIDADE DOS RECEPTORES NUCLEARES DOS
HORMÔNIOS TIREOIDEANOS E DO ÁCIDO RETINÓICO 9CIS
EM DIFERENTES ELEMENTOS RESPONSIVOS DO DNA**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Medicina Interna do Departamento de Clínica Médica do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor.

**CURITIBA
2000**



PARECER

PARECER CONJUNTO dos Professores Dr^a. **DORIS ROSENTHAL**, Dr. **FRANCISCO NEVES**, Dr^a. **GISA AMARAL DE CARVALHO**, Dr. **LUIZ CLÁUDIO FERNANDES** e Dr. **RALFF RIBEIRO** sobre a Tese de Doutorado em Medicina Interna da Universidade Federal do Paraná, elaborada por **HANS GRAF**, intitulada: **“Atividade dos Receptores Nucleares dos Hormônios Tiroideanos e do Ácido Retinóico 9CIS em Diferentes Elementos Responsivos do DNA “**

A Banca Examinadora considerou que **Hans Graf** apresentou trabalho adequado para Tese de Doutorado e o defendeu com segurança e propriedade nas arguições que lhe foram feitas, atribuindo-lhe: Conceito "A", correspondente ao Grau "AO", sendo pois unanimemente recomendado à Universidade Federal do Paraná que lhe seja concedido o título de DOUTOR EM MEDICINA e a publicação da Tese em veículo de divulgação conveniente, depois de incorporadas as sugestões apresentadas no decurso das arguições.

Curitiba, 04 de agosto de 2.000.

Prof^a. Dr^a. Doris Rosenthal

Prof. Dr. Francisco Neves

Prof^a. Dra. Gisa Amaral de Carvalho

Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes

Prof. Dr. Ralff Ribeiro

**À Ruth, Christie, Leticia e Juliana,
motivação para toda minha vida.**

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Ralff Ribeiro, orientador, amigo e companheiro, por me encorajar e estimular continuamente, um cientista em busca constante da verdade e exemplo a ser seguido;

Ao Prof. Dr. Lineu Cesar Werneck, Coordenador do Doutorado em Medicina Interna, pelo apoio, estímulo e contínua amizade;

Ao Prof. John D. Baxter, pela receptividade em seu laboratório e a confiança depositada no meu trabalho;

À Dra. Branka Kovacic, pela ajuda, carinho e abrigo nos tempos difíceis;

À Dra. Fran de Noto, pela liberdade em utilizar as facilidades do Metabolic Research Unit (MRU) da Universidade da Califórnia – San Francisco (UCSF);

À Hoa Nguen, pelo ensinamento das técnicas utilizadas no laboratório;

À Prof. Dra. Doris Rosenthal, prestativa ao extremo, com suas incontáveis sugestões e conselhos que influenciaram minha vida acadêmica ;

Ao Prof. Francisco de Assis Rocha Neves, pela ajuda na bancada e no desenvolvimento do trabalho;

Ao Prof. Luiz de Lacerda Filho, responsável por importantes passos na minha caminhada;

À Dra. Cláudia Helena R. M. Costa, por terminar trabalhos apenas iniciados;

Ao Cesar Luiz Boguszewski, exemplo a ser seguido pelos seus ideais universitários, companheirismo e constante e incansável incentivo;

Ao Luis Gonzaga Sant'Ana, pela inestimável ajuda na organização do texto e gráficos;

Ao Roberto Rodrigues, sempre à disposição nas emergências.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	VI
LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE ABREVIATURAS	VIII
RESUMO	X
ABSTRACT	XI
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Considerações gerais	1
1.2. Ação nuclear do hormônio tireoideano e dos retinóides	3
1.3. Receptores dos hormônios tireoideanos e dos ácidos retinóicos	4
1.4. Estrutura modular dos receptores nucleares	6
1.5. Formação de dímeros entre os receptores nucleares	9
1.6. Papel do RXR na heterodimerização	9
1.7. Elementos responsivos aos hormônios (HREs)	10
1.8. Papel do RXR como homodímero	13
1.9. Proteínas co-reguladoras da ação do TR e RXR	15
1.10. Papel da fosforilação dos receptores nucleares	18
1.11. Objetivos	21
2. MATERIAL E MÉTODOS	22
2.1. Construção de plasmídeos	22
2.2. Cultura de células, método de transfecção e ensaio da enzima CAT	23
2.3. Transcrição e tradução <i>In Vitro</i>	25
2.4. Eletroforese de proteínas	25
2.5. Ensaio de ligação com T3	26
2.6. Ensaio de ligação proteína-DNA	26
2.7. Análise estatística	27
3. RESULTADOS	29
3.1. Resposta ao T3 mediada pelo TRb1 humano em células de mamíferos	29
3.1.a. Células HTC	29

3.1.b. Células U937.....	31
3.2. Eletroforese de proteínas.....	32
3.3. Análise da ligação do TR com as DRs.....	33
3.4. Resposta ao ácido retinóico 9cis (9cisRA) mediada pelo RXRa humano em células de mamíferos.....	34
3.4.a. Células HTC.....	34
3.4.b. Células U937.....	36
3.5. Análise de ligação do RXR com as DRs.....	39
3.6. Resposta ao 9cisRA mediada pelo RXRa humano em células U937 na presença do TRb1.....	40
3.7. Ligação de RXR + TR em DR-1.....	43
3.8. Ligação de RXR + TR em DRs.....	44
4. DISCUSSÃO.....	45
5. CONCLUSÕES.....	54
6. APÊNDICE 1.....	55
7. APÊNDICE 2.....	58
8. GLOSSÁRIO.....	66
9. REFERÊNCIAS.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Regra 3,4,5	8
Tabela 2. TREs ideais	11
Tabela 3. RAREs e RXREs mais conhecidos.	13
Tabela 4. Construção do gene repórter	23
Tabela 5. Co-transfecção de TR e gene repórter em células HTC	30
Tabela 6. Transfecção do gene repórter em células HTC.	30
Tabela 7. Co-transfecção de TR e gene repórter em células U937	32
Tabela 8. Transfecção do gene repórter em células U937	32
Tabela 9. Co-transfecção de RXR e gene repórter em células HTC	36
Tabela 10. Transfecção do gene repórter em células HTC	36
Tabela 11. Co-transfecção de RXR e gene repórter em células U937	38
Tabela 12. Co-transfecção de RXR e gene repórter em células U937, média de 3 experimentos	39
Tabela 13. Transfecção do gene repórter em células U937	39
Tabela 14. Co-transfecção de RXR, RXR + TR e gene repórter em células U937.	42
Tabela 15. Co-transfecção de RXR, RXR + TR e gene repórter em células U937, média de 3 experimentos.	42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Seqüência de aminoácidos do DBD dos receptores nucleares	7
Figura 2. Representação esquemática do mecanismo de ação do TR	17
Figura 3. Resposta ao T3 mediada por TR em células HTC (hepatocarcinoma de rato)	30
Figura 4. Resposta ao T3 mediada por TR em células U937 (células promonocíticas humanas)	31
Figura 5. Determinação do peso aparente dos receptores sintetizados pelo método de transcrição e tradução <i>in vitro</i> em reticulócitos de coelho	33
Figura 6. Ligação do TR com DRs na ausência e na presença de T3, em eletroforese de gel de poliacrilamida	34
Figura 7. Resposta ao 9cisRA mediada por RXR em células HTC (hepatocarcinoma de rato)	35
Figura 8. Resposta ao 9cisRA mediada por RXR em células U937 (células promonocíticas humanas)	37
Figura 9. Resposta ao 9cisRA mediada por RXR em células U937 (células promonocíticas humanas), média de tres experimentos	38
Figura 10. Ligação do RXR com DRs na ausência e na presença de 9cisRA, em eletroforese de gel de poliacrilamida	40
Figura 11. Resposta ao 9cisRA + forskolina mediada por RXR em células U937 (células promonocíticas humanas), na presença de TR	41
Figura 12. Resposta ao 9cisRA + forskolina mediada por RXR em células U937 (células promonocíticas humanas), na presença de TR, média de três experimentos	41
Figura 13. Ligação homodimérica de RXR em DR1 na presença de TR	43
Figura 14. Formação de heterodímeros entre RXR e TR em diferentes DRs	44

LISTA DE ABREVIATURAS

- AF-1, Activating function 1 (Função ativadora 1)
- AF-2, Activating function 2 (Função ativadora 2)
- AMPc, Adenosina 5'-monofosfato cíclico
- AP-1, Activating protein 1 (Proteína ativadora 1)
- atRA, all-trans retinoic acid (Ácido all-trans-retinóico)
- cAMP, Cyclic adenosine monophosphate (Adenosina 5'-monofosfato cíclico)
- CAT, Chloramphenicol acetyltransferase
- CBP, CREB binding protein (Proteína ligadora do CREB)
- 9cRA, 9-cis retinoic acid (Ácido 9cis-retinóico)
- cDNA, Complementar DNA (DNA Complementar)
- CRE, cAMP-responsive element (Elemento responsivo do AMPc)
- CREB, cAMP-Responsive element binding protein (Proteína ligadora do elemento responsivo ao AMPc)
- DBD, DNA binding domain (Domínio ligador do DNA)
- DNA, Desoxirribonucleic acid (Ácido desoxirribonucléico)
- ER, Estrogen receptor (Receptor do estrogênio)
- fmol, femtomoles
- forsk, forskolina
- GR, Glucocorticoid receptor (Receptor do glicocorticoide)
- HDAC, Hystone deacetylase (Deacetilase da histona)
- HTC, Hepatocarcinoma cells (Células de hepatocarcinoma)
- kDa, Kilodalton
- LBD, Ligand binding domain (Domínio ligador do ligante)
- NCoR, Nuclear receptor corepressor (Co-repressor dos receptores nucleares)
- P – Phosphate (Fósforo)

PBS, Phosphate buffered saline (Solução salina tamponada com fosfato)

p/CAF, CBP-associated factor (Fator associado ao CBP)

P/CIP, CBP/cointegrator-associated protein (Proteína associada ao co-integrador)

PKA, Protein kinase A (Proteína cinase A)

PKC, Protein kinase C (Proteína cinase C)

PPAR, Peroxisomal proliferator-activated receptors (Receptores ativados dos proliferadores peroxisômicos)

PR, Progesterone receptor (Receptor da progesterona)

RA, Retinoid acid (Ácido retinóico)

RAR, Retinoid acid receptor (Receptor do ácido retinóico)

RARE, Retinoid acid responsive element (Elemento responsivo do ácido retinóico)

RNAM, Ribonucleic acid messenger (Mensageiro do ácido ribonucleico)

SMRT, Silencing mediator for RAR/TR (Mediador silencioso do TR e RAR)

RXR, Retinoid X receptor (Receptor do retinóide X)

RXRE, Retinoid X responsive element (Elemento responsivo do retinóide X)

Sin3, Intermediary protein (Proteína intermediária Sin 3)

SRC-1, Steroid receptor coactivator-1 (Coativador 1 do receptor dos esteróides)

TK, Thymidine kinase (Timidina cinase)

TR, Thyroid hormone receptor (Receptor do hormônio tireoideano)

TRE, Thyroid responsive element (Elemento responsivo do hormônio tireoideano)

UCSD, University of California, San Diego (Universidade da Califórnia, San Diego)

UCSF, University of California, San Francisco (Universidade da Califórnia, San Francisco)

V, Volts

Vit A, Vitamina A (Vitamina A)

Vit D, Vitamina D (Vitamina D)

VDRE, Vitamin D responsive element (Elemento responsivo da vitamina D)

RESUMO

O receptor do hormônio tireoideano (TR) e o receptor do retinóide X (RXR) fazem parte de uma superfamília de receptores nucleares, que em resposta aos seus respectivos ligantes, atuam como fatores de transcrição no DNA. Os receptores nucleares possuem uma estrutura modular e a ligação dos mesmos ao DNA se faz como monômeros ou dímeros através do módulo ligador ao DNA (DBD) que se liga a seqüências nucleotídicas específicas do DNA, conhecidas como elementos responsivos hormonais (HRE). TR e RXR se ligam a HREs conhecidos como repetições diretas (DRs) do hexâmero AGGTCA (AGGTCA_nAGGTCA). T3 e o ácido 9cis-retinóico se ligam a porção carboxi-terminal do TR e RXR respectivamente, ativando a transcrição gênica. O TR atua principalmente como homodímero ou heterodímero, ligando-se no último caso ao RXR. Nosso estudo analisou a ligação do TR e do RXR a um grupo de DRs separadas por um número variável de nucleotídeos, de 0 a 6, com o objetivo de estabelecer a importância desses HREs na transcrição gênica destes receptores nucleares. Confirmamos através de cultura de células e eletroforese em gel de poliacrilamida que o espaçamento ideal para a resposta do T3 mediada pelo TR é de 4 nucleotídeos (DR4). A forskolina, um potencializador da proteína cinase A (PKA), foi capaz de potencializar a resposta transcricional do TR ao T3. O RXR pode atuar como parceiro silencioso de outros receptores nucleares, ou como homodímero em resposta ao ácido 9cis-retinóico. Nossos ensaios de eletroforese demonstraram que o RXR pode se ligar como homodímero não só ao conhecido elemento responsivo DR1, mas também a DR2, DR3, DR4, DR5 e DR6, numa forma dependente de 9cisRA. Em cultura de células a forskolina demonstrou uma evidente ação sinérgica do RXR nos elementos DR1 a DR5. Desta forma, demonstramos que homodímeros de RXR podem possuir uma atividade transcricional mais ampla do que se acreditava e verificamos a importância de mecanismos de conversa cruzada entre os receptores nucleares TR e RXR com o sistema de sinalização via AMP cíclico.

ABSTRACT

Thyroid hormone receptor (TR) and retinoid X receptor (RXR) belong to the nuclear receptor superfamily, which in response to their respective ligands, act as transcriptional factors at the DNA level. Nuclear receptors have a modular structure and their binding to DNA occurs as monomers or dimers through the DNA binding domain (DBD), which, in turn, binds to specific nucleotide sequences, known as hormone responsive elements (HREs). TR and RXR bind to HREs known as direct repeats (DRs) of the hexamer AGGTCA (AGGTCA_nAGGTCA). Triiodothyronine and 9cis-retinoid acid bind to the carboxi-terminal of TR and RXR respectively, which modifies these receptors to regulate gene transcription. TR acts mainly as a homodimer or heterodimer with RXR. The aim of the present study was to analyze the binding of TR and RXR to a group of DRs, separated by a variable number of nucleotides, from 0 to 6, in order to determine the importance of these HREs on the transcriptional activity of these receptors. We have confirmed through cell culture and polyacrylamide gel electrophoresis that the ideal spacing for the T3 response mediated by TR is 4 nucleotides (DR4). Forskolin, a protein kinase A (PKA) stimulator, was able to enhance the transcriptional response of TR to T3. RXR can act as a silent partner of other nuclear receptors or as a homodimer in response to 9cis-retinoid acid. Our gel mobility assays showed that RXR can bind as a homodimer not only to the known hormone response element DR1, but also to DR2, DR3, DR4, DR5 and DR-6, in a 9cis-dependent fashion. In cell cultures, forskolin and 9cis activated in a synergistic fashion RXR on elements DR1 to DR5. From this perspective, we have demonstrated that RXR homodimers have a wider transcriptional activity than previously suggested and that important crosstalks occur between the nuclear receptors TR and RXR with cyclic AMP signaling pathway.

ATIVIDADE DOS RECEPTORES NUCLEARES DOS HORMÔNIOS TIREOIDEANOS E DO ÁCIDO RETINÓICO 9CIS EM DIFERENTES ELEMENTOS RESPONSIVOS DO DNA

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações Gerais

As células somáticas estão sujeitas a uma grande variedade de estímulos externos que regulam a expressão de funções especializadas, como o ciclo de divisão celular, que são essenciais à sobrevivência celular (Oppenheimer 1991). A maioria destes sinais externos são detectados por receptores específicos, situados na membrana celular e traduzidos por uma cascata de eventos moleculares desencadeados pela interação sinal-receptor. São exemplos de receptores localizados nas membranas celulares os receptores acoplados à proteína G e os receptores com atividade tirosina cinase, como os receptores de insulina e do fator de crescimento epitelial.

Outra categoria de receptores, conhecida como receptores nucleares, está localizada no interior da célula, mais especificamente no citoplasma e no núcleo. Os receptores localizados no citoplasma também são denominados receptores nucleares porque se deslocam até o núcleo para exercerem sua ação. Estes receptores regulam a transcrição dos genes alvo da ação hormonal. Para isto necessitam se ligar aos hormônios específicos que ingressam na célula ao atravessar a membrana celular por difusão simples ou por ação de proteínas transportadoras. Estes receptores fazem parte de uma superfamília de receptores nucleares que congregam mais de 60 membros diferentes, que estão presentes em todos os organismos multicelulares, de insetos ao homem, o que demonstra que os receptores nucleares surgiram precocemente na escala evolutiva, antes da divergência entre vertebrados e invertebrados (Mangelsdorf, Thummel et al. 1995).

A superfamília de receptores hormonais nucleares inclui os receptores para glucocorticóides, mineralocorticóides, androgênios, estrogênio, progesterona, hormônios tireoideanos, calcitriol, ácido *all-trans*-retinóico (atRA, *all-trans retinoic*

acid, ácido 9-*cis*-retinóico (9*cis*RA, 9-*cis* retinoic acid) e prostaglandinas (Lazar and Chin 1990). Além destes, esta superfamília inclui os “receptores órfãos”, para os quais ainda não se identificou ligantes específicos (Evans 1988; O'Malley and Conneely 1992). Até o momento, foram caracterizadas mais de 30 diferentes subfamílias de receptores órfãos, cada uma com múltiplos membros (Mangelsdorf, Thummel et al. 1995). O termo órfão para muitos receptores nucleares é de caráter transitório, uma vez que ligantes específicos para estes receptores começam a ser descobertos (Mangelsdorf and Evans 1995). Por exemplo, os receptores de ativadores da proliferação peroxisômica (PPAR, *peroxisomal proliferator-activated receptors*) α e γ , previamente classificados como órfãos, tem seus ligantes atualmente conhecidos, que são as prostaglandinas e outros lípides bioativos (Kliewer, Lenhard et al. 1995).

Os receptores nucleares são proteínas modulares com regiões ou domínios estruturais distintos, os quais exercem ações específicas. O domínio que se liga ao DNA na região central do receptor, (DBD, *DNA binding domain*), é extremamente conservado em toda superfamília e é responsável por ligar o receptor à seqüências específicas de DNA que promovem a resposta hormonal, os HRE (*Hormone responsive element*). O domínio situado na porção carboxi-terminal é menos conservado que o DBD, e é essencial para a ligação do hormônio ou ligante (LBD, *ligand binding domain*). O LBD é também importante para a formação de dímeros e para a associação com outras proteínas como co-repressores e co-ativadores, que participam nos processos de repressão ou de ativação da transcrição. O domínio amino-terminal é extremamente variável dentro da superfamília e tem propriedades transativadoras da transcrição que são peculiares para cada receptor (Brent, Moore et al. 1991; Utiger 1995). Apesar dos diferentes domínios desempenharem funções específicas quando separados e testados isoladamente, sabe-se que eles também interagem entre si e participam conjuntamente de processos como a dimerização e a ativação da transcrição (Ribeiro et al, 1995).

Os receptores nucleares quando ativados pelos seus respectivos ligantes regulam a transcrição gênica ao se ligar aos HRE de genes alvo (Williams and Brent 1995). Os HREs são localizados geralmente no promotor do gene alvo, onde os receptores nucleares se ligam especificamente e com alta afinidade. Os HREs funcionam como elementos amplificadores da transcrição (*enhancers*) e produzem este efeito

independentemente de sua localização em relação ao ponto de início da transcrição ou de sua orientação (5' ou 3') no promotor do gene alvo (Mitchell and Tjian 1989). Estas seqüências são distintas da região do promotor onde se liga a maquinaria básica de transcrição, que inclui os fatores de transcrição basal e a RNA polimerase II.

As respostas hormonais podem variar dependendo do contexto celular, pois além dos receptores há outros fatores necessários para a resposta hormonal. Nesses casos, a ausência de expressão do gene repórter pode indicar apenas a ausência destes fatores nas células não responsivas. Por outro lado, uma resposta em uma célula hospedeira artificial pode não refletir exatamente a função fisiológica, já que os experimentos de transfecção, nos quais DNA complementar (cDNA, *complementar DNA*) para o receptor é co-transfectado, geralmente hiperexpressam o receptor (Oppenheimer, Schwartz et al. 1995).

1.2. Ação nuclear do hormônio tireoideano e dos retinóides

Os hormônios tireoideanos, principalmente a sua forma mais ativa (triiodotironina, T3) afetam o desenvolvimento e a diferenciação celular, além de influenciar inúmeros processos metabólicos (Carlstedt-Duke, J. et al. 1994). As ações destes hormônios são, por sua vez, influenciadas pelo contexto tissular e celular e pelos níveis de outros hormônios que tenham efeitos sinérgicos ou antagônicos aos do T3.

A ligação entre T3 e seus receptores nucleares TRs (*Thyroid hormone receptors*) ocorre com grande afinidade e especificidade, alterando fundamentalmente a estrutura tridimensional do TR e conseqüentemente a sua associação com outras proteínas. Após a ligação com T3, o TR se dissocia de um complexo com proteínas co-repressoras e se liga a outro complexo com proteínas co-ativadoras. Portanto, a ligação com T3 transforma o TR de um estado repressor para um estado ativador da transcrição (Oppenheimer, Schwartz et al. 1995). Os TRs, na ausência de T3, encontram-se intimamente associados à cromatina. Nesta situação as histonas são deacetiladas por co-repressores recrutados pelo TR, através da ação das HDAC (*Hystone deacetylase*), que mantém a cromatina compacta e inibem a transcrição. Após a ligação com o T3, os co-repressores se dissociam dos TRs e outras proteínas co-ativadoras se associam ao TR,

acetilam as histonas relaxando a cromatina, permitindo o início da transcrição (Chin and Yen 1997) O TR se liga ao DNA como monômero, homodímero ou associado como heterodímero ao receptor do retinóide X (RXR, *retinoid X receptor*). O RXR, assim como o receptor para o ácido trans-retinóico (RAR, *retinoid acid receptor*), liga-se aos retinóides, que são pequenas moléculas lipofílicas derivadas da vitamina A (Vit A), o Retinol, que, como os esteróides e hormônios tireoideanos, afetam a morfogênese, o desenvolvimento, o crescimento e a diferenciação celular (Chambon 1994; Gudas 1994)

A Vit A é um nutriente que em condições nutricionais adequadas está presente de forma constante em níveis relativamente elevados no plasma e, portanto, encontra-se sempre disponível para todas as células. O retinol serve como precursor metabólico dos ácidos retinóicos biologicamente ativos, o atRA e o 9cisRA (Giguere 1994). Assim como os hormônios tireoideanos, os retinóides exercem a maior parte de seus efeitos modulando a expressão gênica ao se ligarem a receptores nucleares específicos (Chambon 1994).

1.3. Receptores dos hormônios tireoideanos e dos ácidos retinóicos

Em 1986, foram identificados dois protooncogenes relacionados, que codificam proteínas com alta afinidade e especificidade para T3 (Sap, Munoz et al. 1986; Weinberger, Thompson et al. 1986). Estes genes eram homólogos ao gene do receptor do glicocorticóide, então recém identificado. O gene nativo, denominado TR α , encontra-se no cromossomo 17, enquanto o outro gene, clonado simultaneamente, foi denominado TR β e encontra-se no cromossoma 3 (Sap, Munoz et al. 1986; Weinberger, Thompson et al. 1986; Chin 1991).

Cada gene do TR produz, por processamento alternativo do RNA mensageiro (RNAm), duas isoformas adicionais: TR- α 1, TR- α 2, TR- β 1 e TR- β 2 que, com exceção do TR- α -2, se ligam ao T3 e podem ativar TREs (*Thyroid responsive elements*) no DNA. O TR- α 2 é incapaz de se ligar ao T3 porque é modificado na sua porção carboxi-terminal, e admite-se que esta isoforma possa exercer ação inibitória sobre os outros TRs ao competir com estes pela formação de heterodímeros com RXR ou pela ligação aos TREs (Brent 1994). A isoforma α -2 seria assim um inibidor endógeno dos

outros TRs e esta ação inibitória é aparentemente regulada pelo seu estado de fosforilação (Santos, Freake et al. 1988; Hodin, Lazar et al. 1989; Mitsuhashi and Nikodem 1989; Sakurai, Nakai et al. 1989; Hodin, Lazar et al. 1990; Strait, Schwartz et al. 1990; Katz, Reginato et al. 1995). Os aminoácidos do DBD do TR- α e TR- β tem homologia de aproximadamente 86% (Jameson and DeGroot 1995). Os TRs α e β diferem principalmente no domínio amino-terminal, tanto na extensão como na identidade dos aminoácidos (Brent, Moore et al. 1991; Oppenheimer 1991). Esta região amino-terminal do TR contém uma função ativadora AF-1 (*Activating function-1*) de transativação constitutiva, ao passo que a região carboxi-terminal do LBD contém uma função ativadora AF-2 (*Activating function-2*), de transativação que depende da presença do ligante (Barettino, Vivanco Ruiz et al. 1994; Tone, Collingwood et al. 1994; Chin and Yen 1997). Mutações no domínio AF-2 do TR resultam em receptores que se ligam ao DNA, ao T3, se dimerizam, mas são incapazes de ativar a transcrição gênica (Chin and Yen 1997).

A expressão dos RNAm dos TRs varia com o desenvolvimento e com a diferenciação celular. RNAm do TR- α 1, TR- α 2 e TR- β 1 são expressos em quase todos os tecidos, ao passo que a expressão do TR- β 2 está praticamente limitada à hipófise, com expressão pequena no hipotálamo e em outros tecidos (Hodin, Lazar et al. 1989; Bradley, Towle et al. 1992; Cook, Kakucska et al. 1992; Lazar 1993; Brent 1994; Chin and Yen 1997). Nem sempre existe uma correlação linear entre os níveis de RNAm e das proteínas que estes codificam. A relação entre os níveis de RNAm e proteína dos TRs é linear no fígado mas não no coração (Schwartz, Strait et al. 1992; Tagami, Nakamura et al. 1993).

Diferentes tecidos possuem, portanto, quantidades variáveis das diferentes isoformas de TRs, sugerindo que isto poderia constituir um mecanismo usado pelo T3 para a regulação da expressão gênica em tecidos de forma seletiva (Brent 1994). Os efeitos dos retinóides sobre a expressão gênica dependem da presença dos seus receptores nucleares, o RAR e o RXR, que atuam, assim como os TRs, como fatores de transcrição. Os RARs foram inicialmente clonados devido a homologia do seu DBD com a de outros membros da superfamília de receptores nucleares (Giguere, Ong et al. 1987). Até o momento, foram identificados três RARs, denominados respectivamente

α , β e γ (Giguere, Ong et al. 1987; Krust, Kastner et al. 1989) e também foram clonados três tipos de RXRs, α , β e γ (Mangelsdorf, Ong et al. 1990). O 9cisRA se liga ao RAR e com alta afinidade ao RXR, ao passo que o atRA liga-se apenas ao RAR (Heyman, Mangelsdorf et al. 1992; Levin, Sturzenbecker et al. 1992; Mangelsdorf, Borgmeyer et al. 1992). Os subtipos α , β e γ tanto de RAR quanto de RXR possuem domínios amino e carboxi-terminais distintos (Chambon 1994). Os mesmos subtipos de RAR ou RXR (seja α , β ou γ) guardam em diferentes espécies maior homologia entre si do que os diferentes subtipos dentro de uma mesma espécie, sugerindo que as diferentes isoformas são funcionalmente distintas e assim podem regular a expressão de diferentes genes responsivos ao atRA e 9cisRA (Carlstedt-Duke, J. et al. 1994).

Assim como o TR possui os seus TREs, o RAR e o RXR também encontram no DNA seus respectivos elementos responsivos, RARE (*Retinoid acid responsive element*) e RXRE (*Retinoid X responsive element*), (Durand, Saunders et al. 1992; Dowhan, Downes et al. 1994; Nakshatri and Chambon 1994). Todos os três genes das isoformas de RAR possuem um RARE em seus promotores (Sucov, Murakami et al. 1990). Desta forma, a auto-indução da expressão do RAR pelo atRA pode levar a uma amplificação do sinal mediado pelo ácido retinóico (Giguere 1994). De todas as isoformas, a expressão da RAR- β parece ser a mais fortemente regulada pelos retinóides (Lotan, Xu et al. 1995).

1.4. Estrutura modular dos receptores nucleares

O DBD dos receptores nucleares é composto de dois “dedos de zinco” (Figura 1) Na base de cada um dos “dedos de zinco”, um átomo isolado de zinco coordena tetrahedricamente quatro cisteínas. Cada dedo de zinco contém uma alça de aminoácidos que forma o “dedo” que se estende do complexo cisteína-zinco. Os dois dedos de zinco são separados por uma seqüência de 15 a 17 aminoácidos (Jameson and DeGroot 1995).

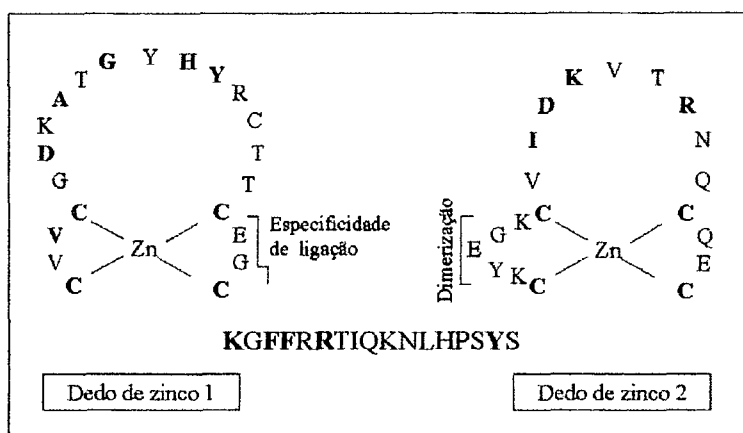


Figura 1. Seqüência de aminoácidos do DBD dos receptores nucleares. As letras representam aminoácidos específicos.

Três aminoácidos na base do primeiro dedo (referida como P-box) são responsáveis pelo reconhecimento específico da seqüência de bases do HRE no DNA (Oppenheimer, Schwartz et al. 1974; Umesono and Evans 1989; Nelson, Faris et al. 1993), ao passo que uma seqüência de cinco aminoácidos, entre a primeira e a segunda cisteína na base do segundo dedo de zinco (referida como D-box), é necessária para que um determinado receptor discrimine o espaçamento ideal (número de bases que separam os dois hexâmeros que formam o HRE) para que eles formem corretamente homo ou heterodímeros no HRE (Umesono and Evans 1989). Os termos P-box e D-box, são baseados na posição relativa proximal e distal destas regiões, funcionalmente distintas, em relação a terminação amino-terminal do receptor (Glass 1994).

O hexâmero consiste na seqüência de bases do HRE onde se liga um monômero do receptor nuclear. Geralmente, os HREs contém dois hexâmeros, pois os receptores nucleares se ligam habitualmente como dímeros. Os TRs, RARs e RXRs se ligam a repetições diretas (DRs, *direct repeats*) da seqüência AGGTCA, enquanto os receptores para esteróides se ligam a palíndromos do tipo AGAACA nnn TGTTCT (n=qualquer nucleotídeo) espaçados por tres nucleotídeos. O espaçamento entre as DRs é crítico para

diferenciar a ligação do TR, RAR, RXR e do receptor da vitamina D (VDR, *vitamin D receptor*) que se ligam a DRs de AGGTCA. Assim, uma DR espaçada por 4 bases é o HRE ideal do TR, enquanto DRs espaçadas por 3 e 5 bases são os HREs específicos para VDR (VDRE, *vitamin D responsive element*) e RAR (RARE), respectivamente, constituindo a “regra 3,4,5” (tabela 1). Frequentemente as DRs encontradas nos promotores de genes nativos apresentam variações na seqüência AGGTCA, e o espaçamento entre os hexâmeros é o principal determinante na especificidade da ligação entre estes receptores e o HRE (Jameson and DeGroot 1995).

Tabela 1. Regra 3,4,5. O espaçamento entre os hexâmeros é crítico para a ligação dos diferentes receptores nucleares.

VDRE (DR3)	AGGTCA	nnn	AGGTCA
TRE (DR4)	AGGTCA	nnnn	AGGTCA
RARE (DR5)	AGGTCA	nnnnn	AGGTCA

O conhecimento da estrutura cristalográfica do LBD do TR- α do rato ligado ao hormônio tireoideano contribuiu significativamente para a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na ativação do TR pelo T3 (Wagner, Apriletti et al. 1995). Assim foi demonstrado que ao se ligar ao receptor, o T3 fica completamente envolvido no interior do LBD, e passa a fazer parte do núcleo hidrofóbico do TR. Também se observou que o LBD é predominantemente formado por α hélices. A função ativadora AF-2 engloba 3 destas hélices (3, 5 e 12), e é formada pela ligação do T3 que mobiliza a hélice 12 de encontro as hélices 3 e 5. A junção destas 3 hélices forma uma superfície hidrofóbica no TR que se presta a ligação de proteínas co-ativadoras. Estes resultados cristalográficos sugerem um papel estrutural para o T3 que ao se ligar, modifica a conformação do TR colocando-o na sua forma ativa, responsável pela regulação hormonal da expressão gênica (Wagner, Apriletti et al. 1995).

1.5. Formação de dímeros entre os receptores nucleares

Estudos cristalográficos com fragmentos isolados de receptores, DBDs ou LBDs, demonstraram a presença de superfícies de dimerização no LBD e no DBD quando associados ao DNA (Glass, Lipkin et al. 1989; Katz, Berrodin et al. 1992; Kurokawa, Yu et al. 1993). A dimerização entre os LBDs é formada por aminoácidos hidrofóbicos situados na hélice 11 que promovem a interação proteína-proteína em solução, ou seja, antes de atingir o DNA. Ao contrário, a interface de dimerização entre os DBDs forma-se apenas quando estes se ligam ao DNA, porque mesmo em concentrações milimolares, DBDs isolados não formam dímeros em solução (Forman, Yang et al. 1989; Forman and Samuels 1990; Habener 1990; Mader, Chen et al. 1993; Glass 1994; Jameson and DeGroot 1995). A dimerização entre DBDs foi demonstrada cristalograficamente com fragmentos do RXR associado ao TR, ligados a DR-4 (Luisi, Xu et al. 1991; Rastinejad, Perlmann et al. 1995). A estrutura deste complexo mostra que o RXR adota a posição 5' confirmando a polaridade prevista pelos estudos bioquímicos, que indicavam que o RXR ocupa a posição 5' quando se dimeriza com o TR, VDR, RAR ou PPAR, que ocupam a posição 3'. A estrutura mostra também que o espaçamento entre as DRs é essencial para que a interface de dimerização entre os DBDs de RXR e TR se estabeleça de maneira apropriada (Rastinejad, Perlmann et al. 1995).

Assim, os estudos mencionados indicam que os receptores contêm duas regiões independentes para dimerização, uma no LBD e outra no DBD. As duas regiões parecem operar em seqüência e sugerem que a formação de dímeros se dê em duas etapas, uma entre os LBDs em solução e a segunda entre os DBDs quando estes se ligam ao DNA (Kurokawa, DiRenzo et al. 1994; Mangelsdorf and Evans 1995).

1.6. Papel do RXR na heterodimerização

A presença de proteínas acessórias que aumentam a ligação de TRs e RARs ao DNA foi primeiramente observada em extratos nucleares (Glass, Lipkin et al. 1989; Murray and Towle 1989; Burnside, Darling et al. 1990; Beebe, Darling et al. 1991; Darling, Beebe et al. 1991). Em 1991 e 1992, vários grupos demonstraram

simultaneamente que as três isoformas do RXR (α , β e γ) eram os principais agentes que se heterodimerizavam com o TR, RAR e VDR, aumentando a capacidade destes receptores de se ligar aos seus HREs (Yu, Delsert et al. 1991; Berrodin, Marks et al. 1992; Bugge, Pohl et al. 1992; Kliewer, Umesono et al. 1992; Leid, Kastner et al. 1992; Mangelsdorf, Borgmeyer et al. 1992; Wahlstrom, Sjoberg et al. 1992; Zhang, Hoffmann et al. 1992; Kurokawa, DiRenzo et al. 1994; Ribeiro, Apriletti et al. 1994).

O papel do RXR como parceiro na heterodimerização é de aumentar a capacidade de ligação do complexo ao DNA (Kliewer, Umesono et al. 1992; Rosen, O'Donnell et al. 1992; Wahlstrom, Sjoberg et al. 1992; Hallenbeck, Phyllaier et al. 1993; Lee, Driggers et al. 1994). O modelo atual propõe que o RXR é o principal parceiro de heterodimerização não apenas para o TR, mas também para o VDR, RAR, PPAR e vários receptores órfãos (Mangelsdorf and Evans 1995). Geralmente, quando o RXR se dimeriza com VDR, TR ou RAR, o complexo formado responde apenas aos ligantes destes receptores e o RXR, neste caso, é considerado um parceiro silencioso. Portanto, a atividade intrínseca induzida pelo ligante do RXR é suprimida quando o RXR forma complexos com o VDR, TR ou o RAR, devido a uma alteração alostérica no LBD que impede o RXR de se ligar ao 9cisRA (Forman, Umesono et al. 1995; Leblanc and Stunnenberg 1995). Por outro lado, o RXR se liga ao 9cisRA quando associado com PPAR, e neste caso particular, o ligante do RXR determina a ativação da transcrição (Mangelsdorf and Evans 1995). O T3, a Vitamina D (Vit D) e o atAR são capazes de ativar a transcrição gênica na ausência do ligante do RXR (9cisRA), demonstrando que a ocupação de um único receptor é suficiente para uma resposta transcricional dependente do ligante (Glass 1994).

1.7. Elementos responsivos aos hormônios (HREs)

Apesar da tentativa de simplificação com regras do tipo 3-4-5, sabe-se que não há regras simples que determinem a ligação dos receptores nucleares aos seus respectivos HREs. Se tais regras existirem, elas não são rígidas e permitem uma certa promiscuidade no reconhecimento dos HREs pelos receptores (Williams and Brent 1995). Num determinado HRE que consista de duas seqüências AGGTCA, a orientação

relativa destas, seu espaçamento e a identidade das seqüências flanqueadoras irão influenciar a interação com um determinado receptor (Brent, Williams et al. 1991; Chin, Carr et al. 1993; Katz and Koenig 1993; Mader, Leroy et al. 1993; Katz and Koenig 1994; Schrader, Becker-Andre et al. 1994). Assim, no caso do TR, este pode se ligar a DRs espaçadas por 4 bases (DR-4), ou a outros TREs como agrupamentos AGGTCA isolados (onde se ligam monômeros de TR), palíndromos do tipo 5'-AGGTCA TGACCT-3' (TREpal, cujos hexâmeros não são espaçados), ou do tipo 5'-TGACCT nnnnnn AGGTCA-3', também chamados de palíndromos invertidos (n = qualquer nucleotídeo) (Glass, Lipkin et al. 1989) (Glass, Holloway et al. 1988; Baniahmad, Steiner et al. 1990; Naar, Boutin et al. 1991; Umesono, Murakami et al. 1991; Forman, Casanova et al. 1992). (Tabela 2)

Tabela 2. TREs ideais. DR-4. Pal-Inv e TRE-Pal são considerados os agrupamentos ideais para o TR.

DR-4	<u>AGGTCA</u> nnnn <u>AGGTCA</u> , TCCAGT nnnn ACTGGA
Pal-inv	TGACCT nnnnnn <u>AGGTCA</u> <u>ACTGGA</u> nnnnnn TCCAGT
TRE-pal	<u>AGGTCATGACCT</u> TCCAGT <u>ACTGGA</u>

Em alguns casos, como no gene do TSH, os hormônios tireoideanos inibem a transcrição gênica. Nestes casos, os elementos responsivos não são representados pelos TRE clássicos ou positivos, que estimulam a transcrição, contendo duas seqüências AGGTCA. Inicialmente, postulou-se que os TREs negativos encontrariam-se no promotor dos genes reprimidos, como os do TSH- α e TSH- β do camundongo, do rato e do homem (Carr, Kaseem et al. 1992; Yen, Sugawara et al. 1992; Chin, Carr et al.

1993). É possível que o TR possa inibir a transcrição ao se ligar a outros fatores de transcrição ligados no promotor dos genes-alvo, mecanismo este similar ao descrito na repressão mediada por receptores esteróides que se ligam ao complexo AP1 (*Activating Protein 1*) para reprimir a transcrição gênica (Ribeiro 1995). Recentemente, um novo modelo foi proposto para explicar a repressão de genes que não contém TREs. Nestes casos, como não há TREs, a repressão envolveria o seqüestro (“*squelching*”) ou desvio da região promotora por ação dos TRs, de co-ativadores da transcrição e, concomitantemente, a disponibilização de co-repressores para inibirem diretamente no promotor a transcrição gênica. Assim, a ligação do hormônio ao TR facilitaria a ação de co-repressores, que reprimiriam diretamente o promotor, ao mesmo tempo que levaria ao seqüestro de co-ativadores, evitando que estes estimulem o promotor (Tagami, Park et al. 1999)

Em certos TREs, a ligação do T3 ao TR diminui a ligação homodimérica TR/TR, sem alterar a ligação heterodimérica TR/RXR (Yen, Darling et al. 1992). Se demonstrou que o T3, em concentrações fisiológicas, diminui a ligação de homodímeros, mas não a de monômeros ou de heterodímeros, a TREs do tipo DR-4 e Pal-inv (Yen, Darling et al. 1992; Yen, Sugawara et al. 1992), sem alterar a ligação de homodímeros em TREpal (Andersson, Nordstrom et al. 1992; Ribeiro, Kushner et al. 1992; Miyamoto, Suzuki et al. 1993). Desta forma, o T3 em concentrações fisiológicas, poderia modificar o equilíbrio entre os TRs que se ligam ao DNA como monômeros, homodímeros e heterodímeros (Ribeiro, Apriletti et al. 1998).

O RAR atua predominantemente como heterodímero com o RXR. Estes complexos RXR/RAR ocupam preferencialmente DRs separados por 2 (DR-2) e 5 nucleotídeos (DR-5). Tem sido mostrado que tanto em DR-2 como em DR-5 o RXR ocupa a posição 5', a montante, ao passo que o RAR ocupa a posição 3', a jusante (Predki, Zamble et al. 1994). Nas tabela 3 encontramos respectivamente os genes que contém os RAREs e os RXREs mais conhecidos:

Tabela 3. RAREs e RXREs mais conhecidos. CRBP I, CRBP II e CRABP II representam proteínas transportadoras do ácido retinóico (Glass, DiRenzo et al. 1991; Giãuere 1994).

RARES

Apo I (DR2)	gatc AGGGCAG <u>GGGTCA</u> AG <u>GGTCA</u> GT gatc
Beta 2 (DR5)	gatct GTAG <u>GGTCA</u> CCGAA <u>AGTCA</u> CTC agatc
CRBP I (DR2)	gatcc <u>AGGTCA</u> AA <u>AAGTCA</u> G atc
CRABP II (DR2)	cc <u>AGTCA</u> CC <u>AGGTCA</u> agg

RXRES

CRBP II (DR1)	gatc C <u>AGGTCA</u> C <u>AGGTCA</u> C <u>AGGTCA</u> C <u>AGGTCA</u> A gatc
CRABP II (DR1)	ga <u>AGGGCA</u> G <u>AGGTCA</u> aca

O espaçamento de cinco nucleotídeos é observado no promotor do RAR β -2 (Hoffmann, Lehmann et al. 1990; Sucov, Murakami et al. 1990), enquanto o de dois nucleotídeos é observado no RARE presente no gene da apolipoproteína AI (Rottman, Widom et al. 1991) e no gene da CRBP-I (Durand, Saunders et al. 1992).

É interessante notar que a região promotora do gene do CRABP-II (uma proteína citosólica envolvida no transporte do ácido retinóico, cuja ativação pode levar a um aumento do catabolismo do atRA), contém tanto um elemento RARE (DR-2) como RXRE (DR-1) (Durand, Saunders et al. 1992; Nakshatri and Chambon 1994). Este último achado mostra que o gene do CRABP-II é sujeito a uma regulação dupla pelas vias do RAR e RXR e sugere um amplo papel para a CRABP-II na sinalização retinóide (Giguere 1994).

1.8. Papel do RXR como Homodímero

O fato de que o 9cisRA é detectado *in vivo* no fígado e no rim sugere que o 9cisRA é um hormônio natural, derivado da isomerização do atRA em certos tipos celulares. O 9cisRA também foi encontrado em tecido mamário junto com o atRA, onde

os dois retinóides podem funcionar como ligantes específicos, sendo que a isomerização do atRA pode estar envolvida no controle da tradução do sinal mediado pelo ácido retinóico (Mangelsdorf, Ong et al. 1990). A alta expressão do RXR em órgãos como fígado, rim e intestino dão suporte adicional para um papel do RXR na sinalização por retinóides (Mangelsdorf, Ong et al. 1990).

A ligação do 9cisRA ao RXR estimula fortemente a ligação de homodímeros de RXR a DR-1 (Lucas, O'Brien et al. 1991; Rottman, Widom et al. 1991; Durand, Saunders et al. 1992; hu and Siddiqui 1992; Levin, Sturzenbecker et al. 1992; Mangelsdorf, Borgmeyer et al. 1992; Zhang, Lehmann et al. 1992). Não está claro se este efeito do 9cisRA é devido a uma ação direta nos eventos de dimerização que ocorrem em solução, ou se resulta de uma interação mais favorável do homodímero de RXR com o DNA. Também se descreveu a ligação homodimérica do RXR a DRs espaçados por 2 e 5 pares de base, embora a ligação a DR-1 seja a mais característica (Zhang, Lehmann et al. 1992; Dowhan, Downes et al. 1994; Subauste, Katz et al. 1994; Castelein, A et al. 1996). Enquanto o 9cisRA estimula a formação de homodímeros de RXR, ele não tem efeito na formação de heterodímeros de RXR, pois neste complexo o 9cisRA não consegue se ligar ao RXR. Este efeito diferencial do 9cisRA sobre a capacidade dos RXR de formar homodímeros e não heterodímeros pode ter conseqüências para a ativação transcricional dependente do ligante. Concentrações suficientemente elevadas de 9cisRA podem favorecer a formação de homodímeros de RXR, levando não apenas a maiores índices de transcrição de genes que contém RXRE, mas também a níveis reduzidos de transcrição de genes dependentes da formação de heterodímeros com RXR (Glass 1994). Estes resultados indicam que duas vias de ação do RXR podem ser ativadas de forma independente.

O papel do 9cisRA na ação do RXR ainda não está completamente esclarecido. Exemplos onde 9cisRA tem uma ação definida incluem a ação do heterodímero formado entre RXR e PPAR (Kliewer, Umesono et al. 1992), e na ação aditiva do RXR e RAR através de um DR-2, como demonstrado no promotor do CRABP-II (Durand, Saunders et al. 1992). Outras evidências de um papel ligante-dependente do RXR na transcrição foram obtido com retinóides seletivos para o RXR (Lehmann, Jong et al.

1992) e na demonstração recente da ativação do RXR no desenvolvimento da medula espinhal em camundongos (Solomin, Johansson et al. 1998).

Um problema na análise da ação de homodímeros de RXR é que a formação de RAR/RXR em elementos DR-1 ou de outros elementos dificulta a mensuração do que é devido à formação de homo ou de heterodímeros nestes elementos, principalmente nas situações onde RXR não é expresso em altas concentrações (Durand, Saunders et al. 1992).

Outro fator complicador na análise do papel de homodímeros ou de heterodímeros de RXR é que o RXR também se heterodimeriza com receptores órfãos formando complexos responsivos ao 9cisRA. Portanto, a simples resposta a ligantes específicos do RXR não seria suficiente para comprovar a ação de homodímero (Rottman, Widom et al. 1991; Kliewer, Umesono et al. 1992; Kliewer, Umesono et al. 1992; Tran, Zhang et al. 1992; Keller, Dreyer et al. 1993; Forman, Umesono et al. 1995; Perlmann and Jansson 1995; Teboul, Enmark et al. 1995; Willy, Umesono et al. 1995).

1.9. Proteínas co-reguladoras da ação do TR e RXR

A maioria dos genes responsivos aos hormônios tireoideanos são inibidos diretamente pela ligação do TR não ocupado pelo T3. Esta repressão se dá por uma inibição ativa (“silenciadora”) do TR que desaparece com a ligação ao T3 (Brent, Dunn et al. 1989; Zhang, Wills et al. 1991; Baniahmad, Tsai et al. 1992; Baniahmad, Ha et al. 1993; Fondell, Roy et al. 1993; Ribeiro, Apriletti et al. 1995). O T3, além de abolir a repressão, também promove a ativação da transcrição. Esta repressão é provocada por proteínas co-repressoras que interagem com TRs e com RARs na ausência do hormônio, e que é revertida pela ligação dos respectivos ligantes aos seus receptores (Casanova, Helmer et al. 1994; Baniahmad, Leng et al. 1995; Chen and Evans 1995; Horlein, Naar et al. 1995).

Duas destas proteínas co-repressoras são a N-Cor (*Nuclear receptor corepressor*), com peso molecular de 270 kilodalton (kDa) (Horlein, Naar et al. 1995) e a SMRT (*Silencing mediator for RAR/TR*), de 170 kDa (Chen and Evans 1995). Em geral, os receptores têm que estar ligados ao DNA e, no caso dos heterodímeros com

RXR, na polaridade apropriada para que os ligantes dissociem o N-Cor do complexo receptor-DNA. O complexo RXR/RAR ativa a transcrição quando RXR ocupa a posição 5' e RAR ocupa o sítio 3', como nos elementos DR-2 e DR-5. Entretanto, quando heterodímeros RAR-RXR se ligam a DR-1, onde RAR ocupa o sítio 5' e o RXR o 3', e conseqüentemente é trocada a posição do RAR e RXR em relação aos elementos DR-2 e DR-5, o ligante não dissocia o co-repressor do complexo RAR-RXR-DR-1 (Kurokawa, Soderstrom et al. 1995). Neste caso, o heterodímero RAR-RXR é um potente repressor. (Kurokawa, Yu et al. 1993; Kurokawa, DiRenzo et al. 1994; Predki, Zamble et al. 1994; Ribeiro, Apriletti et al. 1998).

Recentemente, descobriu-se que N-Cor possui atividade enzimática e promove a deacetilação de histonas (Hallenbeck, Phyllaier et al. 1993). Esta atividade de deacetilação da histona promove uma organização mais compacta da cromatina facilitando a repressão transcricional (Ribeiro, Apriletti et al. 1998). Em relação ao TR, a ligação do T3 causa uma alteração na sua conformação que resulta na liberação do co-repressor e no recrutamento de proteínas co-ativadoras, cuja ligação principal ocorre no domínio AF-2 do TR. Uma das mais importantes proteínas co-ativadoras e a primeira a ser clonada foi o coativador-1 do receptor esteróide, SRC-1 (*Steroid receptor coactivator-1*), que está presente de forma ubíqua nas células e que aumenta a expressão gênica para vários receptores nucleares, incluindo o TR (Koenig 1998) (Onate, Tsai et al. 1995; Takeshita, Yen et al. 1996), Chin and Yen 1997). O SRC-1 é o protótipo de uma família de proteínas relacionadas, de cerca de 160 kDa, com a mesma função. Outra proteína identificada como co-ativadora do TR é a que se liga ao CREB (CREB, *cAMP-responsive element binding protein*) conhecida como CBP (CBP, *CREB binding protein*). Inicialmente se acreditava que a CBP era específica para este fator de transcrição, mas subseqüentemente foi demonstrado que a sua ação é muito mais ampla na sinalização nuclear, inclusive nas ações de outros receptores nucleares como o TR. A CBP representa o protótipo de uma segunda família de proteínas relacionadas, com cerca de 300 kDa e que também interage com SRC-1 (Koenig 1998). Assim, forma-se um complexo ativador com várias proteínas, entre elas receptores nucleares e membros da família SRC-1 e CBP. As proteínas coativadoras possuem atividade enzimática e

acetilam as histonas, tornando a cromatina mais frouxa, facilitando a interação com componentes chave da maquinaria de transcrição (Koenig 1998).

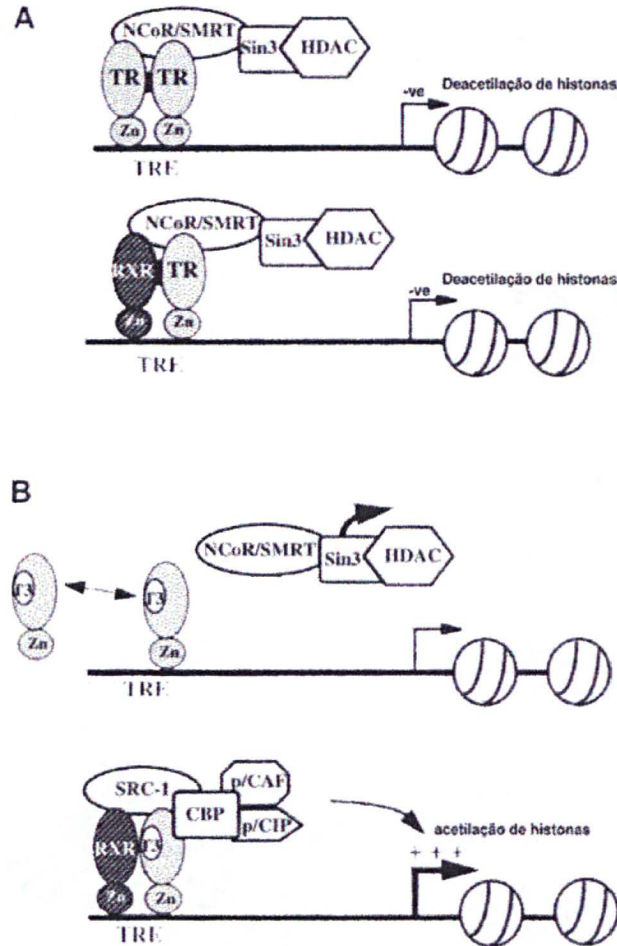


Figura 2. Representação esquemática do mecanismo de ação do TR. (A) Repressão da transcrição basal. Na ausência do ligante, o TR se liga ao TRE como homodímero (painel superior) ou heterodímero com RXR (painel inferior). A transcrição basal é inibida pelo recrutamento de um complexo contendo co-repressores (NCoR ou SMRT) que se associa com deacetilases de histona (HDAC) via uma proteína intermediária (Sin3). A deacetilação de histonas e possivelmente de fatores gerais de transcrição resulta em repressão transcripcional. (B) Alterações hormônio induzidas. Homodímeros de TR se dissociam após a ligação do T3, enquanto o complexo heterodímero-DNA é estável. O complexo co-repressor também é liberado, permitindo o recrutamento de coativadores (SRC-1, CBP, p/CIP, p/CAF). A atividade intrínseca de acetilação de histona do último permite o remodelamento da transcrição cromatina induzida.

1.10. Papel da Fosforilação dos Receptores Nucleares

Influências sinérgicas entre hormônios que atuam através de receptores nucleares e de ligantes que atuam via receptores de membranas e que estimulam a concentração de “segundos mensageiros” são importantes para a regulação de numerosos processos metabólicos e de transcrição gênica. Hormônios peptídicos e fatores de crescimento ligam-se a receptores da membrana celular, estimulando uma ou mais vias de segundo mensageiros. Estes, por sua vez, podem ativar uma cascata de eventos intracelulares que resultam em alterações de fosforilação protéica e subseqüentemente da transcrição gênica (Jameson 1995).

Tanto a ligação do T3 ao TR como modificações pós-traducionais, particularmente a fosforilação, alteram a conformação do receptor, influenciando a natureza dos complexos de TR ligados aos TREs (Leng, Tsai et al. 1993; Jones, Brubaker et al. 1994; Chin and Yen 1997). A observação de que a ação do T3 é aumentada pela inibição farmacológica das fosfatases fosfoproteicas e que é diminuída pela inibição das proteínas cinases celulares sugere que um ou mais destes eventos de fosforilação dos receptores são importantes *in vivo* (Jones, Brubaker et al. 1994).

Os receptores nucleares são fosfoproteínas, ou seja, são proteínas fosforiladas. A fosforilação do TR pode modificar a sua função (Leng, Tsai et al. 1993; Jones, Brubaker et al. 1994; Chin and Yen 1997). TRs fosforilados aumentam a sua ligação a TREs como homodímeros, mas não como heterodímeros ou monômeros (Lin, Ashizawa et al. 1992; Sugawara, Yen et al. 1994). Em contraste, a fosforilação do TR- α -2 inibe a sua ligação ao DNA (Lazar 1993). Este poderia ser um mecanismo importante na regulação do efeito dominante negativo do TR- α -2, que é dependente da competição com os outros TRs pela ligação aos TREs (Katz and Lazar 1993).

Em eucariontes, o AMPc (AMPc, adenosina 5'-monofosfato cíclico) produz a maior parte de seus múltiplos efeitos celulares pela ativação da proteína cinase A, PKA (Protein kinase A). Na sua forma inativa, esta cinase existe como uma enzima tetramérica composta de duas subunidades reguladoras e duas subunidades catalíticas. Admite-se que a subunidade catalítica é liberada pela ligação do AMPc à PKA, estimulando a transcrição gênica através da fosforilação de proteínas alvo (Jameson

1995). O tratamento de células com agentes que elevam a concentração intracelular de AMPc, como a forskolina, se acompanha da translocação da subunidade catalítica da PKA do citoplasma para o núcleo (Nigg, Hilz et al. 1988), induzindo a transcrição gênica em resposta ao AMPc.

Um alvo importante para a PKA é a proteína CREB que se liga ao elemento responsivo CRE no DNA (CRE, *cAMP-responsive element*) e que, possivelmente junto com outras proteínas fosforiladas pela PKA, atua no núcleo para regular a transcrição (Jameson 1995). Assim, o CREB é um fator de transcrição que se liga ao DNA e regula genes responsivos ao AMPc. O estudo de vários genes responsivos ao AMPc levou à identificação do CRE, que é composto pela sequência TGACGTCA (Jameson 1995). Entretanto, o CRE não está presente na região promotora de todos os genes que respondem ao AMPc. A responsividade ao AMPc também é afetada por bases adjacentes ao CRE, sugerindo que atividade do CRE é modificada por outras proteínas reguladoras, presumivelmente específicas a um determinado tipo celular (Jameson 1995).

Apesar do grande número de membros da família CREB, outros fatores são também capazes de estimular a transcrição gênica em resposta ao AMPc. A regulação da expressão gênica pela conversa cruzada ("*crosstalk*") entre receptores hormonais nucleares e outras vias de transdução de sinais pode ser um aspecto geral para a integração da informação extracelular importante para o crescimento, desenvolvimento e regulação de processos fisiológicos. Os mecanismos de integração de sinais provenientes de diferentes vias são ainda pouco conhecidos.

Estudos clínicos demonstram que a responsividade do tecido cardíaco ao T3, que atua em receptores nucleares, é alterada pela presença de hormônios β -adrenérgicos que atuam em receptores de membrana, mas não se conhecem os mecanismos moleculares responsáveis pela integração destes dois sistemas (Ribeiro, 1995).

A fosforilação de fatores nucleares de transcrição é um mecanismo regulatório comum e existem evidências sugerindo que conversas cruzadas entre as vias de sinalização do AMPc e dos receptores nucleares ocorrem através da interação direta da PKA com receptores hormonais (Denner, Schrader et al. 1990; Power, Mani et al. 1991; Rangarajan, Umesono et al. 1992).

Um exemplo de interação entre os sistemas de sinalização de receptores nucleares e AMPc é o aumento da transcrição em um gene responsivo ao RAR, quando se co-transfecta a subunidade catalítica da PKA, sugerindo participação de fosforilação direta do RAR pela PKA (Huggenvik, Collard et al. 1993). Uma análise da seqüência de aminoácidos das isoformas de RAR mostra um potencial sítio de fosforilação pela PKA conservado no LBD de cada uma das isoformas de RAR (Huggenvik, Collard et al. 1993). Este aumento da transcrição do RAR pela PKA poderia ser devida a um estímulo da atividade AF-2 de transativação do LBD (Glass, Devary et al. 1990), que poderia ser estimulada pela fosforilação. De forma alternativa, o LBD fosforilado, poderia ter alterada a sua afinidade pelo RA ou, ainda, modificar a afinidade da ligação do receptor pelo RARE (Huggenvik, Collard et al. 1993).

Ativadores da PKA, como a forskolina, são capazes de potencializar a transcrição mediada por T3 em células promonocíticas humanas (U937) co-transfectadas com um plasmídeo para o receptor TR- β -1 e um plasmídeo repórter DR-4 TK-CAT (*Thymidine kinase-chloramphenicol acetyltransferase*) (Leitman, Costa et al. 1996). A co-transfecção de um plasmídeo contendo um inibidor da PKA eliminou o efeito da potencialização da ação do T3, comprovando o papel central da PKA. A potencialização da transcrição pelo T3 não ocorreu devido a um aumento do número de receptores ou a uma maior afinidade dos mesmos pelo hormônio, tendo sido favorecido pela heterodimerização com RXR α (Leitman, Costa et al. 1996). O efeito da PKA foi restrito ao tipo celular (U937), não sendo reproduzido em outras linhagens testadas, e não foi vinculado à presença do CREB, o qual é o alvo principal para a fosforilação pelo PKA (Leitman, Costa et al. 1996).

Pode-se concluir que esta interação entre os receptores nucleares e outras vias metabólicas, como a desencadeada pelo aumento do AMPc e ativação da PKA, pode afetar a transcrição de forma importante e ser mais uma variável na γ de fatores que alteram a expressão gênica (Sugawara, Yen et al. 1994).

Considerando que existem dados insuficientes em relação à influência de sistemas de segundo mensageiros como AMPc/PKA sobre TR e RXR e para obter mais informações sobre a ação de receptores nucleares em diferentes HREs desenvolvemos o presente trabalho.

1.11. Objetivos

Os objetivos deste estudo foram:

- a. Analisar a ligação e atividade transcricional do TR e do RXR em uma série de elementos responsivos com repetições diretas da seqüência AGGTCA;
- b. Avaliar a possibilidade de conversa cruzada entre o sistema AMPc/PKA e a ação dos TRs e RXRs *in vivo*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Construção de plasmídeos utilizados

Os plasmídeos pRShTR β e pRShRXR α são vetores que contém o DNA complementar (cDNA) do TR β (TR β) e RXR α (RXR α) humanos, respectivamente. A transcrição do RNA codificado por estes cDNAs é controlada pelo promotor do vírus do Sarcoma de Rous, o que permite a expressão destes RNAs em células de mamíferos e, conseqüentemente, das proteínas por eles codificadas. Estes plasmídeos foram generosamente cedidos pelo Dr. Ron Evans (UCSD, *University of California San Diego*), e foram descritos em detalhes em publicações prévias (Weinberger, Thompson et al. 1986; Mangelsdorf, Ong et al. 1990).

Foram utilizados uma série de genes repórteres contendo elementos responsivos para os receptores nucleares nos diferentes estudos. Os vetores, utilizados nos experimentos de transfecção, foram criados utilizando-se plasmídeos derivados do vetor pUC19 (New England Biolabs, Beverly, EUA). Eles foram construídos inserindo-se oligonucleotídeos sintéticos no sítio de clonagem múltipla do pUC19, utilizando-se para isto a enzima Hind III (New England Biolabs, Beverly, EUA). Estes oligonucleotídeos possuem extremidades em fita única, com 4 bases não pareadas cuja seqüência AGCT é compatível com as originadas pelo corte com a enzima de restrição Hind III. Isto possibilita a clonagem destes oligonucleotídeos em um plasmídeo cortado por Hind III. Os oligonucleotídeos sintetizados contém dois sítios AGGTCA para ligação de TR ou RXR, dispostos consecutivamente, ou seja, em repetições diretas (DRs), mas separados por um número variável de nucleotídeos, de 0 a 6, DR-0 a DR-6, (tabela 4). Estas DRs ficam adjacentes ao promotor mínimo (-32/+45) da timidina cinase do vírus do Herpes simplex. O promotor mínimo é assim chamado porque contém apenas as seqüências responsáveis para ligação da maquinaria basal de transcrição e RNA polimerase II (TATA box) e não possui seqüências conhecidas para outros fatores de transcrição, que eventualmente poderiam interferir na transcrição induzida pelo TR β e RXR α . O sítio para ligação do complexo composto pelas proteínas ativadoras 1, AP-1 (*AP-1 activating protein 1*), previamente implicadas na ação de receptores nucleares (Lopez, Schaufele et

al. 1993) e presente nos plasmídeos da série pUC19 foi excluído anteriormente deste conjunto de plasmídeos (Leitman, Costa et al. 1996). Isto permite que o gene repórter seja controlado somente pelo elemento para ligação do receptor (DRs). O promotor mínimo, por sua vez, se localiza imediatamente em frente as seqüências que codificam para a enzima cloranfenicol-acetil-transferase, (CAT) que é o gene repórter.

Tabela 4. Construção do gene repórter. Os DRs DR-0 a DR-6 s o clonados 5', a montante do promotor mínimo da timidina cinase (TK), que se encontra a montante do ãene da enzima cloranfenicol-acetil-transferase (CAT), dentro do vetor pUC-19.

DR-0: AAGCTTC AGGTCA AGGTCA GAGAGCTTGATCC-TK-CAT-pUC19

DR-1: AAGCTTC AGGTCA G AGGTCA GAGAGCTTGATCC-TK-CAT-pUC19

DR-2: AAGCTTC AGGTCA GG AGGTCA GAGAGCTTGATCC-TK-CAT-pUC19

DR-3: AAGCTTC AGGTCA AGG AGGTCA GAGAGCTTGATCC-TK-CAT-pUC19

DR-4: AAGCTTC AGGTCA CAGG AGGTCA GAGAGCTTGATCC-TK-CAT-pUC19

DR-5: AAGCTTC AGGTCA CCAGG AGGTCA GAGAGCTTGATCC-TK-CAT-pUC-19

DR-6: AAGCTTC AGGTCA CCAGGC AGGTCA GAGAGCTTGATCC-TK-CAT-pUC-19

2.2. Cultura de células, método de transfecção e ensaio da enzima CAT

Os procedimentos de cultura de células, transfecção e o ensaio da enzima CAT foram realizados de acordo com os métodos descritos previamente e que são comentados a seguir (Leitman, Ribeiro et al. 1991; Leitman, Costa et al. 1996; Ribeiro, Cavalieri et al. 1996). Utilizamos células derivadas de promonócitos humanos (U937) e de hepatocarcinoma de rato, HTC (*HTC, hepatocarcinoma cells*) obtidas do Centro de Cultura de Células da Universidade da Califórnia, San Francisco (UCSF-*University of California San Francisco*). Estas células foram mantidas em cultura em meio RPMI

1640 contendo 10% de soro de neonato bovino suplementado com 2 mM glutamina, 50 u/ml de penicilina e 50 µg/ml de estreptomicina, e mantidas em uma incubadora a 37 C com 5% de CO₂. As células U937 foram cultivadas em suspensão em frascos de 500 ml (Falcon), enquanto as células HTC foram cultivadas em camada única sobre placas de 10 cm².

Para as transfecções, as células foram coletadas por centrifugação. As células HTC, aderentes aos assoalhos dos frascos de cultura, foram descoladas com tripsina e coletadas por centrifugação. O precipitado contendo as células foi ressuspensado em meio idêntico ao descrito acima mas contendo soro bovino depletado de T3. As células foram novamente coletadas por centrifugação e numa segunda etapa ressuspensas (10 milhões) por 0,5 ml de solução PBS (*Phosphate buffered saline*) contendo 0,1% dextrose e 10 µg/ml de biobrene, (Applied Biosystems). Estas células (10 milhões/0,5ml PBS) foram a seguir misturadas a 10 µg do plasmídeo repórter e/ou 2,5 µg do vetor de expressão do receptor e transferidas para uma cuvetta onde permaneciam em temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, procedia-se a eletroporação destas células utilizando-se um gerador de pulso Bio-Rad com voltagem de 0,3 volts e 960 µFarad. As células eletroporadas foram mantidas em temperatura ambiente por 10 minutos e em seguida transferidas para recipientes contendo 13 ml de RPMI 1640 com soro depletado de T3. Neste meio, as células foram ressuspensas e colocadas em placas de 6 poços (1 ml/poço), e em seguida foram incubadas por 24 horas a 37 C com etanol (controle) ou 100 nM de T3, e/ou 10 µM de forskolina e/ou 100 µM de 9cis-ácido retinóico. Para o ensaio da enzima CAT, as células eram transferidas para tubos Eppendorf de 1,5 ml e centrifugadas por 30 segundos. O sobrenadante foi aspirado e descartado, enquanto que o precipitado celular foi lisado e solubilizado pela adição de 100 µL de 0,25 M Tris-HCl, pH-7,6 contendo o detergente Triton X 100 a 0,1%. O lisado celular foi em seguida usado para o ensaio de atividade da enzima CAT utilizando-se o método de cintilação líquida (Neumann, Morency et al. 1987). A atividade transcricional induzida pelos diversos ligantes foi comparada em relação à atividade basal de células tratadas com veículo (etanol). Os resultados apresentados são derivados de um experimento representativo e repetidos por 3 vezes, pelo menos.

2.3. Transcrição e Tradução *In Vitro*

Para produzirmos receptores para os ensaios de ligação com o DNA, nós utilizamos um sistema de transcrição e tradução *in vitro* de acordo com as instruções do fabricante (TNT T7 - Quick Coupled Transcription/Translation System-Promega, Madison, EUA) (Ribeiro, Apriletti et al. 1994). Neste método, adicionamos os plasmídeos contendo o cDNA que codifica o TR β humano ou o RXR α humano regulado pelo promotor da RNA polimerase do bacteriófago T7, a um sistema que possui todos os componentes necessários para a transcrição do RNAm e tradução da proteína. Este sistema contém a RNA polimerase do bacteriófago T7, ribonucleotídeos, RNAsin (inibidor de RNase) e um lisado de reticulócitos de coelho suplementado com ZnCl₂ (40 μ M), aminoácidos (com exceção da metionina) e metionina marcada com enxofre 35 (³⁵S-Met) ou metionina não marcada, dependendo se o objetivo era a síntese de receptores marcados ou frios, respectivamente. A reação, realizada em tubo de ensaio Eppendorf de 500 μ L foi iniciada pela adição de 1-2 μ g do plasmídeo aos componentes necessários para a transcrição e tradução, seguindo-se de uma incubação a 30 C por 90 minutos. Finda a reação, os tubos foram colocados no gelo e as amostras foram coletadas para a realização da eletroforese de proteínas e o ensaio de ligação com o T3.

2.4. Eletroforese de proteínas

A eletroforese de proteínas, pelo método do sulfato duodecílico de sódio (SDS) (Laemmli 1970), foi utilizada para confirmar o tamanho da proteína sintetizada *in vitro* e também verificar a eficiência da reação de transcrição e tradução. O gel de poliacrilamida, após a eletroforese, foi fixado em uma mistura com 35% metanol e 10% ácido glacial acético durante 30 minutos, sendo em seguida exposto por 30 minutos a uma solução (Amplifier, Amersham) para intensificar a transmissão da energia radioativa, e seco à vácuo à 80 C por 1 hora. O gel seco foi a seguir colocado de encontro a um filme de radiografia durante um período de 8-24 horas.

2.5. Ensaio de Ligação com T3

Este ensaio foi utilizado para quantificar a produção do TR e, assim como a eletroforese de proteínas descrita acima, verificar a eficiência do sistema *in vitro* de transcrição/tradução. Este ensaio utiliza T3 marcado com iodo 125 (Apriletti, Baxter et al. 1988) e consiste na adição a uma solução tampão A (20 mM fosfato de potássio, pH 7.6, 0.4 M KCl, 1 mM MgCl₂, 0,5 mM EDTA, 10% glicerol e 0,1% monotioglicerol) da amostra contendo TR (2 µL da reação de tradução), 1,5 nM ¹²⁵Iodo-T3 (2 µL/ensaio), e uma mistura de histonas 50 µg/ml em volume final de 0,25 ml incubado a 4 C por 12 horas. Para se determinar a ligação inespecífica, adiciona-se 1 µM de T3 não marcado à reação. A separação do T3 ligado ao TR do T3 livre é processada em colunas Quick-Sep Sephadex G-25, previamente equilibrada com o tampão A. Coloca-se 200 µL da reação de ligação na coluna, e após 5 minutos, o T3 ligado ao TR é eluído com a adição de 1 ml do tampão A, ficando o T3 livre retido na coluna. O volume eluído é em seguida colocado em um contador de radiação γ. A ligação específica do T3 ao TR era calculada subtraindo-se a contagem verificada na presença de um excesso de T3 não marcado (ligação inespecífica), do total de contagens.

2.6. Ensaio de Ligação Proteína-DNA

Para se aferir a capacidade dos receptores TR e/ou RXR, produzidos *in vitro*, de se ligarem ao DNA, utilizamos o ensaio de ligação proteína-DNA. Os receptores traduzidos *in vitro* (20-40 fmol, usualmente 1-3 µL da reação de transcrição e tradução), pré-incubados no gelo com 9cisRA (10⁻⁶M) ou T3 (10⁻⁸M) ou veículo, foram incubados com 10.000 a 20.000 cpm de oligonucleotídeos marcados com ³²P-γ-ATP em uma solução tampão (10 mM NaPO₄, 0,5 mM MgCl₂, 0,25 mM EDTA, 20 mM NaCl e 5% glicerol), contendo 2 µg do polinucleotídeo de dupla fita dl-dC (Pharmacia e Upjohn Uppsala, Suécia) em um volume final de 20 µL. Os oligonucleotídeos foram marcados com ³²P utilizando-se a enzima polinucleotídeoquinase e, portanto, possibilitando a visualização de todos os complexos TR-DNA, RXR-DNA ou TR/RXR-DNA na presença e na ausência dos hormônios. Os polímeros de dl-dC são utilizados em grande

quantidade (2 µg) porque constituem sítios de ligações inespecíficas entre proteína e DNA e permitem, portanto, que as ligações específicas ocorram com o oligonucleotídeo marcado com ³²P. Como controle, incubamos nas mesmas condições, lisado de reticulócitos. Todas as adições foram feitas em um tubo Eppendorf de 500 µL mantido em um recipiente com gelo. Os tubos com as reações foram a seguir transferidos para a temperatura ambiente por 20 minutos e ao final deste período a reação foi transferida para a canaleta de um gel de poliacrilamida. O gel foi preparado com 5% de acrilamida/bisacrilamida em uma solução tampão TEA com 67 mM Tris-base, 10 mM EDTA e 33 mM acetato de sódio, pH de 7,5 a 24 C. Após a adição de 500 µL de acetato de amônia 10% e 50 µL de N,N,N',N' - Tetramethylethylenediamine (TEMED), esta mistura foi transferida para um sistema vertical de eletroforese (Hoeffer) onde ocorre a polimerização. O gel foi a seguir submetido a uma eletroforese por 30 minutos sem as amostras. Findo este período, as reações foram transferidas para as canaletas, iniciando-se a eletroforese por 2 horas a 240 V e a 4 C com o mesmo tampão usado na confecção do gel, em um quarto a - 4.C° 0 A seguir o gel foi secado e colocado junto a um filme para autoradiografia a - 80 C. Este ensaio de ligação proteína-DNA, também chamado de ensaio de mudança da mobilidade do DNA no gel (gel shift assays) permite que se visualize os complexos formados pelos receptores ligados ao DNA, que diferem do DNA não ligado pois este se move no gel com maior rapidez. Além disso, a mobilidade do receptor como monômero, homodímero e heterodímero, assim como a influência dos hormônios sobre estes complexos podem ser facilmente observados.

2.7. Análise Estatística

Foram realizadas, para o TR, comparações envolvendo a ação de T3 versus forskolina, versus T3 + forskolina. Para o RXR, foram feitas comparações envolvendo 9cisRA versus forskolina, versus 9cisRA + forskolina. Nestas comparações, foram testadas a hipótese nula de que os tratamentos têm efeitos iguais versus a hipótese alternativa de que pelo menos um dos tratamentos apresenta efeito diferente. Optou-se por aplicar o teste de Friedman. Em todos os testes adotou-se o nível de significância de

5% e, quando da rejeição da hipótese nula, adotou-se o critério de comparações múltiplas associadas ao referido teste.

Na transfecção de RXR com o gene repórter contendo diferentes DRs, nas células U937, obtivemos os seguintes resultados:

DR0: 9cisRA + forskolina > forskolina $p=0,0494$; 9cisRA versus etanol: ns;

DR1: 9cisRA+ forskolina > forskolina $p=0,0278$; 9cisRA versus etanol: ns;

DR2: 9cisRA + forskolina > forskolina $p=0,0278$; 9cisRA versus etanol: ns;

DR3: 9cisRA + forskolina > forskolina $p=0,0494$; 9cisRA versus etanol: ns;

DR4: 9cisRA + forskolina > forskolina $p=0,0066$; 9cisRA versus etanol: ns;

DR5: 9cisRA + forskolina > forskolina $p=0,0278$; 9cisRA versus etanol: ns;

DR6: 9cisRA + forskolina > forskolina n.s. 9cisRA versus etanol: ns;

TK: 9cisRA + forskolina > forskolina n.s. 9cisRA versus etanol: ns;

3. RESULTADOS

3.1. Resposta ao T3 mediada pelo TR β 1 humano em células de mamíferos

3.1.a. Células HTC

Para avaliarmos a capacidade das repetições diretas AGGTCA (DRs) mediar a ação do T3 via TR em células HTC e a interação entre PKA e T3, transfectamos um plasmídeo repórter produtor de CAT em conjunto com o vetor para a expressão do TR e cultivamos as células na presença de etanol, forskolina, T3, ou T3 + forskolina. Cada plasmídeo repórter continha uma DR espaçada por 0 a 6 nucleotídeos. Como controle, utilizamos o plasmídeo sem DR, que continha apenas o promotor da TK.

Na figura 3 vemos que apenas a DR espaçada por 4 nucleotídeos (DR-4) foi capaz de ativar a produção de CAT em resposta ao T3. Na ausência de DRs (TK, plasmídeo que contém apenas o promotor), ou nos plasmídeos com DRs espaçadas por 0, 1, 2, 3, 5 e 6 nucleotídeos, não houve aumento significativo da produção de CAT na presença de T3, forskolina ou T3 + forskolina. A adição de forskolina, e conseqüentemente a estimulação da PKA, aumentou em torno de 50% a atividade CAT, portanto potencializando a ação do T3 sobre o TR em DR-4 (tabela 5). A atividade de CAT em células HTC não transfectadas com TR não mostrou diferenças entre os diversos tratamentos e o controle etanol (tabela 6). Todos os experimentos com células HTC encontram-se no apêndice 1.

Estes resultados demonstram que a presença de DRs é necessária mas não é suficiente para transmitir a mensagem hormonal, e que o espaçamento entre as DRs é o fator determinante para definir a especificidade do elemento responsivo à ação do T3 em células HTC. Além disto, nossos resultados demonstraram que a ativação de PKA potencializou o efeito de T3.

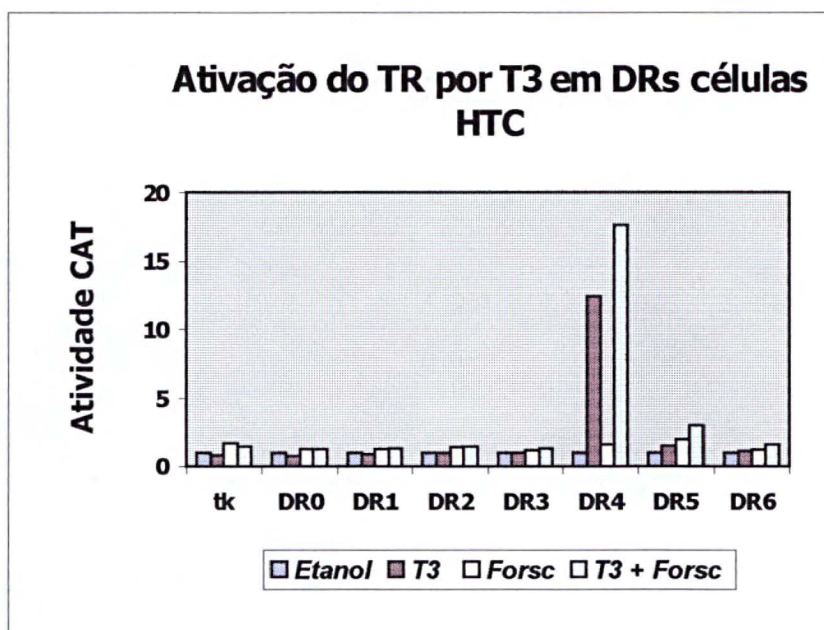


Figura 3. Resposta ao T3 mediada por TR em células HTC (hepatocarcinoma de rato). As células foram co-transfectadas com plasmídeo vetor pRShTRb1, (contendo o cDNA do TR beta1) e o plasmídeo repórter (contendo dois sítios AGGTCA dispostos consecutivamente para ligação de TR, o promotor TK, e as seqüências que codificam para a enzima CAT) e tratadas com etanol, T3 (100 nM), forskolina (10 µM) ou T3 + forskolina por 24 horas e depois coletadas determinando-se a atividade de CAT. Apenas a DR espaçada por 4 nucleotídeos foi capaz de ativar a produção de CAT em resposta ao T3. Os números representam a razão entre a atividade de CAT observada na presença de T3, forskolina, ou T3 + forskolina e a atividade observada no veículo (valor arbitrário =1).

Tabela 5. Co-transfecção de TR e gene repórter em células HTC. Células HTC co-transfectadas com TR e plasmídeos repórter na ausência (TK) ou na presença de DRs separados por um número variável de nucleotídeos (DR-0 a DR-6) ao veículo (etanol), T3, forskolina, ou T3 + forskolina. Os números representam a razão entre a atividade de CAT observada na presença de T3, forskolina, ou T3 + forskolina e a atividade observada no veículo (valor arbitrário =1).

	TK	DR0	DR1	DR2	DR3	DR4	DR5	DR6
Etanol	1	1	1	1	1	1	1	1
T3	0,82	0,75	0,89	1,0	0,96	12,4	1,5	1,12
Forskolina	1,67	1,23	1,23	1,43	1,17	1,59	1,97	1,18
T3 + Forsk.	1,46	1,25	1,29	1,47	1,33	17,61	3,03	1,58

Tabela 6. Transfecção do gene repórter em células HTC. Resposta de células HTC transfectadas com plasmídeos repórter na ausência (TK) ou na presença de DRs separados por um número variável de nucleotídeos (DR-0 a DR-6) ao veículo (etanol), T3, forskolina, ou T3 + forskolina. Estas células não

foram co-transfectadas com TR. Os números representam a razão entre a atividade de CAT observada na presença de T3, forskolina, ou T3 + forskolina e a atividade observada no veículo (valor arbitrário = 1).

	TK	DR0	DR1	DR2	DR3	DR4	DR5	DR6
Etanol	1	1	1	1	1	1	1	1
T3	1,09	0,91	1,14	1	0,88	1,13	1,01	0,86
Forskolina	1,37	1,3	1,49	1,24	1,12	1,22	1,32	1,29
T3 + Forsk	1,8	1,71	1,44	1,54	1,58	1,50	1,29	1,54

3.1.b. Células U937

As células U937 reproduziram o padrão de resultados observados em células HTC (Figura 4). Entretanto, no caso das células U937, a adição da forskolina potencializou ainda mais (mais do que o dobro) o efeito do T3 mediado pelo TR na DR-4 em comparação com o efeito do T3 + forskolina mediado pelo TR na DR-4 em células HTC. Em conjunto, estes resultados sugerem que a especificidade do elemento responsivo ao T3 independe do tipo celular.

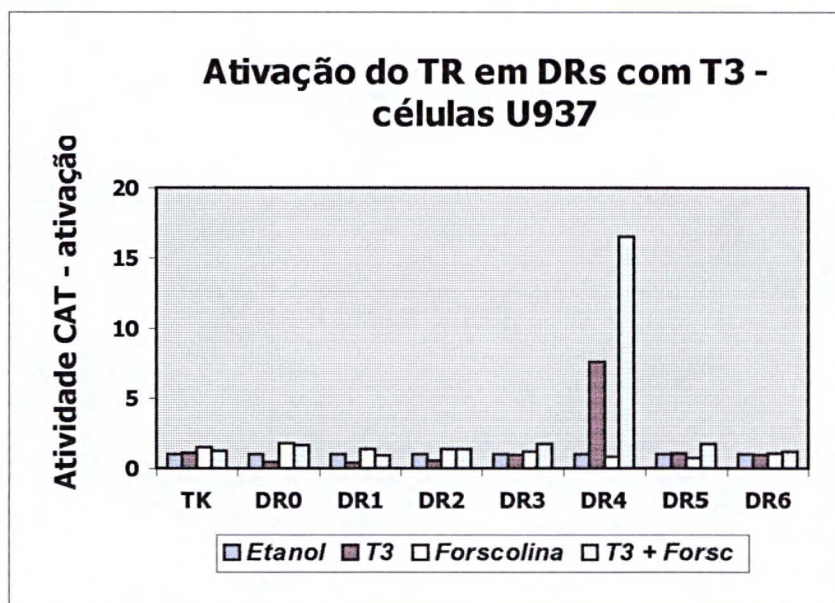


Figura 4. Resposta ao T3 mediada por TR em células U937 (células promonocíticas humanas). As células foram co-transfectadas com plasmídeo vetor pRShTRb1 (contendo o cDNA do TR beta1) e o plasmídeo repórter (contendo dois sítios AGGTCA dispostos consecutivamente para ligação de TR, o promotor TK, e as seqüências que codificam para a enzima CAT) e tratadas com etanol, T3 (100 nM),

forskolina (10 μ M) ou T3+forskolina por 24 horas e depois coletadas determinando-se a atividade de CAT. Apenas a DR espaçada por 4 nucleotídeos foi capaz de ativar produção de CAT em resposta ao T3.

A atividade de CAT em células U937 não transfectadas com TR não mostrou diferenças entre os diversos tratamentos e o controle (etanol). Os valores das transfecções em células U937 na presença e na ausência de TR estão nas tabela 7 e 8, respectivamente. Todos os experimentos com células U937 encontram-se no apêndice 2.

Tabela 7. Co-transfecção de TR e gene repórter em células U937. Resposta de células U937 co-transfectadas com TR e plasmídeos repórter na ausência (TK) ou na presença de DRs separados por um número variável de nucleotídeos (DR-0 a DR-6) ao veículo (etanol), T3, forskolina, ou T3 + forskolina. Os números representam a razão entre a atividade de CAT observada na presença de T3, forskolina, ou T3 + forskolina e a atividade observada no veículo (valor arbitrário =1).

	TK	DR0	DR1	DR2	DR3	DR4	DR5	DR6
Etanol	1	1	1	1	1	1	1	1
T3	1,07	0,46	0,41	0,57	0,93	7,6	1,03	0,93
Forskolina	1,51	1,77	1,35	1,34	1,17	0,85	0,73	1,03
T3 + Forsc.	1,22	1,65	0,91	1,40	1,74	16,5	1,75	1,17

Tabela 8. Transfecção do gene repórter em células U937. Resposta de células U937 transfectadas com plasmídeos repórter na ausência (TK) ou na presença de DRs separados por um número variável de nucleotídeos (DR-0 a DR-6) ao veículo (etanol), T3, forskolina, ou T3 + forskolina. Estas células não foram cotransfectadas com TR. Os números representam a razão entre a atividade de CAT observada na presença de T3, forskolina, ou T3 + forskolina e a atividade observada no veículo (valor arbitrário =1).

	TK	DR0	DR1	DR2	DR3	DR4	DR5	DR6
Etanol	1	1	1	1	1	1	1	1
T3	0,98	0,57	0,85	0,57	0,52	1,38	0,70	0,83
Forskolina	1,27	2,71	1,58	1,34	1,78	1,80	1,12	1,04
T3 + Forsc.	1,62	2,69	2,89	1,40	1,81	3,54	1,09	1,00

3.2. Eletroforese de proteínas

A eletroforese de proteínas confirmou o tamanho das proteínas sintetizadas (Figura 5). No caso do TR β 1 humano, o peso molecular aparente foi de 52kDa, enquanto no caso do RXR alfa humano foi de 54kDa.

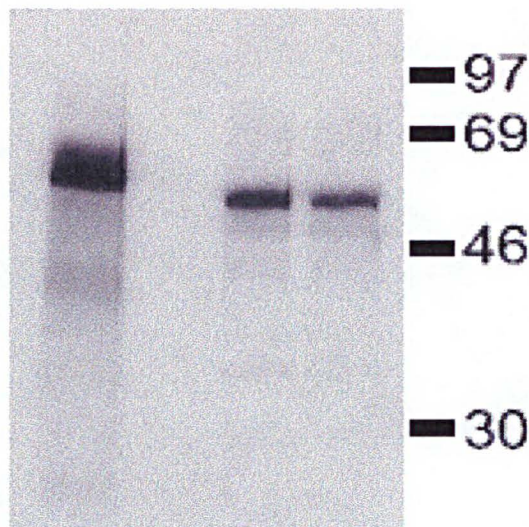


Figura 5. Determinação do peso aparente dos receptores sintetizados pelo método de transcrição e tradução *in vitro* em reticulócitos de carneiro. Os receptores foram sintetizados na presença de metionina marcada com enxofre 35 e submetidos a eletroforese de poliacrilamida com SDS. Na canaleta 1 foi adicionada a reação de síntese do RXR alfa, na canaleta 2 a reação controle (quando não se adiciona qualquer cDNA, na canaleta 3 a reação de síntese do TR beta 1 humano e na canaleta 4 os marcadores moleculares.

Como se observa na eletroforese de proteínas, as reações de síntese do RXR-alfa e TR-beta mostram bandas bem definidas com mobilidade equivalente a 54kDa e 52kDa, respectivamente. Estes pesos moleculares correspondem aos pesos previstos para o RXR-alfa e TR-beta humanos. Na reação controle não se observa qualquer banda, demonstrando que a síntese é completamente dependente da adição do cDNA.

3.3. Análise da ligação do TR com as DRs

A figura 6 mostra a ligação do TR com as diversas DRs na ausência e na presença de T3. Como controle, a primeira canaleta de cada DR mostra as ligações inespecíficas com as proteínas presentes no lisado de reticulócitos que não contém TRb1 (seta li). Como esperado, na presença de TR, o complexo mais proeminente é o formado pelo TR com a DR-4, embora TR também se ligue, menos intensamente, a DR-3, DR-5 e DR-6 (figura 6, seta ho). Estes complexos representam homodímeros de TR,

com menor mobilidade que os monômeros de TR e se dissociam com a adição de T3. Os complexos formados por monômeros (Figura 6, seta m) são vistos em todos os elementos, de DR-0 a DR-6. Nos elementos DR-4 e DR-5 estes monômeros se tornam mais visíveis após a adição de T3, que dissocia os homodímeros, aumentando consequentemente a proporção de monômeros de TR ligados ao DNA.

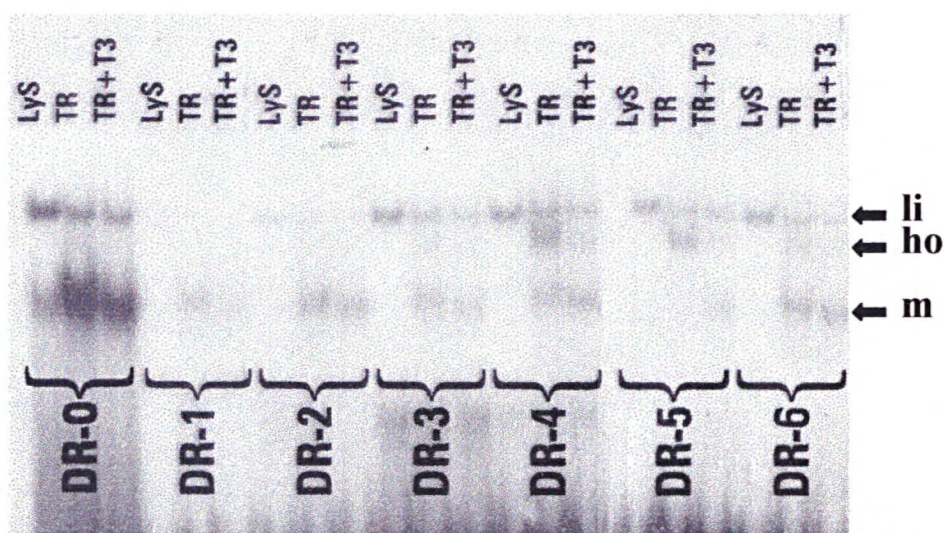


Figura 6. Ligação do TR com DRs na ausência e na presença de T3, em eletroforese de gel de poliacrilamida. O complexo mais proeminente é formado pelo TR com DR-4, embora TR também se ligue menos intensamente a DR-3 e DR-5 (seta ho). Estes complexos representam homodímeros de TR, com menor mobilidade que monômeros de TR e que se dissociam com a adição de T3. Os complexos formados por monômeros são vistos em todos os elementos, de DR-0 a DR-6 (seta m). A seta li representa a formação complexos inespecíficos, na presença apenas do lisado de reticulócitos.

3.4. Resposta ao ácido retinóico 9cis (9cisRA) mediada pelo RXRalfa humano em células de mamíferos.

3.4.a. Células HTC

Para avaliarmos a capacidade das repetições diretas de AGGTCA (DRs) mediarem a ação do 9cisRA via RXR em células HTC, transfectamos um plasmídeo repórter produtor de CAT em conjunto com o vetor para a expressão do RXR e

cultivamos as células na presença de veículo (etanol), forskolina, 9cis, ou 9cis + forskolina. Cada plasmídeo repórter contém uma DR espaçada por 0 a 6 nucleotídeos. Como controle, utilizamos o plasmídeo sem DR, que contém apenas o promotor TK.

Nas células HTC co-transfectadas com RXR-alfa, não se observou em nenhuma das DRs ativação da produção de CAT em resposta ao 9cisRA, à forskolina ou 9cis + forskolina em relação a atividade das células tratadas com o veículo etanol (figura 7 e tabela 9). Tal resultado sugere que estas células possuem os componentes necessários para responder ao T3, mas não ao 9cisRA. Na tabela 10, os resultados da transfecção do plasmídeo repórter na ausência de RXR, mostrando que não há diferença na atividade de CAT entre os diversos tratamentos e o etanol.

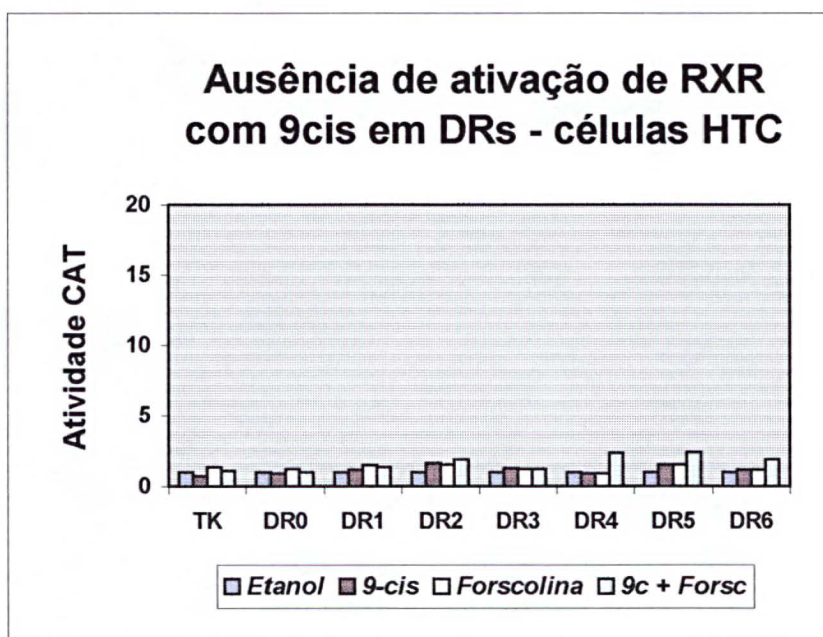


Figura 7. Resposta ao 9cis mediada por RXR em células HTC (células hepatocarcinoma de rato). As células foram co-transfectadas com o plasmídeo vetor pRShRXRa, (contendo o cDNA do RXR alfa) e o plasmídeo repórter (contendo dois sítios AGGTCA dispostos consecutivamente para ligação de RXR, o promotor TK, e as seqüências que codificam para a enzima CAT) e tratadas com etanol, 9cis (100 nM), forskolina (10 µM) ou 9cis + forskolina por 24 horas e depois coletadas determinando-se a atividade de CAT. Nenhuma DR foi capaz de ativar a produção de CAT em resposta ao 9cis.

Tabela 9. Co-transfecção de RXR e gene repórter em células HTC. Resposta de células HTC co-transfectadas com RXR e plasmídeos repórter na ausência (TK) ou na presença de DRs separados por um número variável de nucleotídeos (DR-0 a DR-6) ao veículo (etanol), 9cis, forskolina, ou 9cis + forskolina. Os números representam a razão entre a atividade de CAT observada na presença de 9cis, forskolina, ou 9cis + forskolina e a atividade observada no veículo (valor arbitrário =1).

	TK	DR0	DR1	DR2	DR3	DR4	DR5	DR6
Etanol	1	1	1	1	1	1	1	1
9cis	0,73	0,89	1,18	1,63	1,29	0,91	1,57	1,15
Forskolina	1,39	1,25	1,49	1,54	1,26	1,4	1,20	1,94
9cis + Forsk	1,07	0,97	1,37	1,96	1,25	2,39	2,42	1,92

Tabela 10. Transfecção do gene repórter em células HTC. Resposta de células HTC transfectadas com plasmídeos repórter na ausência (tk) ou na presença de DRs separados por um número variável de nucleotídeos (DR-0 a DR-6) ao veículo (etanol), 9cis, forskolina, ou 9cis + forskolina. Estas células não foram co-transfectadas com RXR. Os números representam a razão entre a atividade de CAT observada na presença de 9cis, forskolina, ou 9cis+forskolina e atividade observada no veículo (valor arbitrário =1).

	TK	DR0	DR1	DR2	DR3	DR4	DR5	DR6
Etanol	1	1	1	1	1	1	1	1
9cis	1,07	0,80	0,75	0,98	2,27	1,51	1,46	0,90
Forskolina	1,27	2,71	2,09	1,58	1,78	1,80	1,12	1,04
9cis + Forsk	1,70	1,64	1,92	2,62	1,97	2,28	3,05	1,34

3.4.b. Células U937

Ao contrário das células HTC, nas células U937 co-transfectadas com RXR α , nota-se que a adição de 9cis ativa a produção de CAT na presença de DRs espaçadas de 0 a 5 nucleotídeos (Figura 8). Tais resultados indicam que há fatores específicos em células que influem na regulação do 9cis mediada pelo RXR. Observamos uma importante potencialização da resposta ao 9cis com a adição de forskolina nas DRs 0 a 5, demonstrando que nestas células a ativação do sistema da PKA interage de forma sinérgica com a sinalização do 9cis (9cis + forskolina versus 9cis: TK n.s.; DR0 p=0,0494; DR1 p=0,0278; DR2 p=0,0278; DR3 p=0,0494; DR4 p=0,0066; DR5 p=0,0278; DR6 n.s.). Na figura 8 e tabela 11 são apresentados os resultados de um

experimento representativo e na figura 9 e tabela 12 a média de 3 experimentos. Estes resultados dependem da presença das DRs e do espaçamento entre elas, porque não se observa ativação por 9cis ou sinergismo com a forskolina na ausência de DRs ou quando estas são espaçadas por 6 nucleotídeos. Estes resultados são mediados pelo RXR, porque na ausência de RXR a resposta ao 9cis ou o sinergismo entre 9cis e forskolina em células U937 é reduzido ou mesmo inexistente nas DRs de 0-5 (tabela 13).

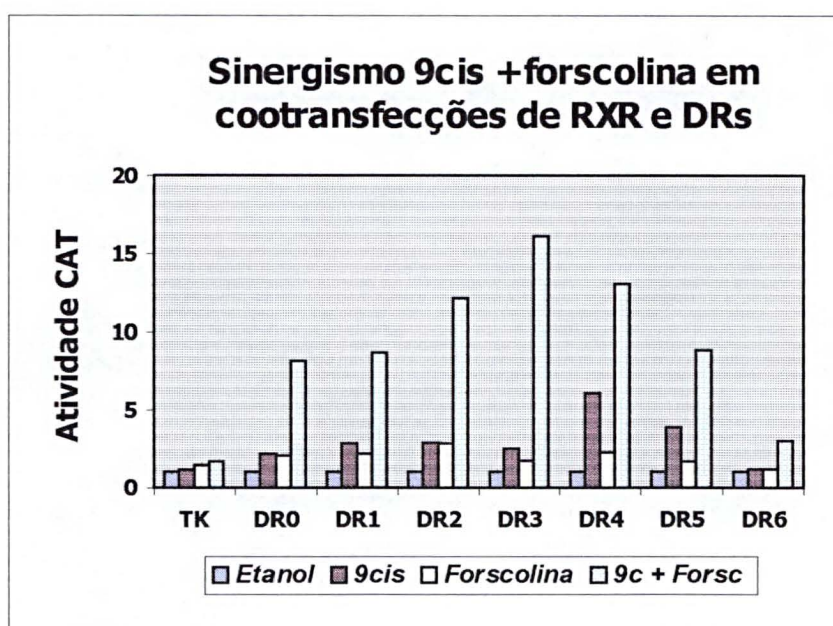


Figura 8. Resposta ao 9cis mediada por RXR em células U937 (células promonocíticas humanas). As células foram co-transfectadas com plasmídeo vetor pRShRXRa, (contendo o cDNA do RXR alfa) e o plasmídeo repórter (contendo dois sítios AGGTCA dispostos consecutivamente para ligação de RXR, o promotor tk, e as seqüências que codificam para a enzima CAT) e tratadas com etanol, 9cis (100 nM), forskolina (10 μ M) ou 9cis + forskolina por 24 horas e depois coletadas determinando-se a atividade de CAT. As DRs espaçadas por 0 a 5 nucleotídeos foram capazes de ativar significativamente a produção de CAT em resposta ao 9cis, com potencialização do efeito com a adição de forskolina).

Tabela 11. Co-transfecção de RXR e gene repórter em células U937. Resposta de células U937 co-transfectadas com RXR e plasmídeos repórter na ausência (TK) ou na presença de DRs separados por um número variável de nucleotídeos (DR-0 a DR-6) ao veículo (etanol), 9cis, forskolina, ou 9cis + forskolina. Os números representam a razão entre a atividade de CAT observada na presença de 9cis, forskolina, ou 9cis + forskolina e a atividade observada no veículo (valor arbitrário =1).

	TK	DR0	DR1	DR2	DR3	DR4	DR5	DR6
Etanol	1	1	1	1	1	1	1	1
9cis	1,13	2,18	2,82	2,87	2,49	6,06	3,90	1,16
Forskolina	1,42	2,03	2,16	2,81	1,72	2,23	1,68	1,21
9cis + Forsk	1,69	8,13	8,66	12,13	16,12	13,05	8,85	2,98

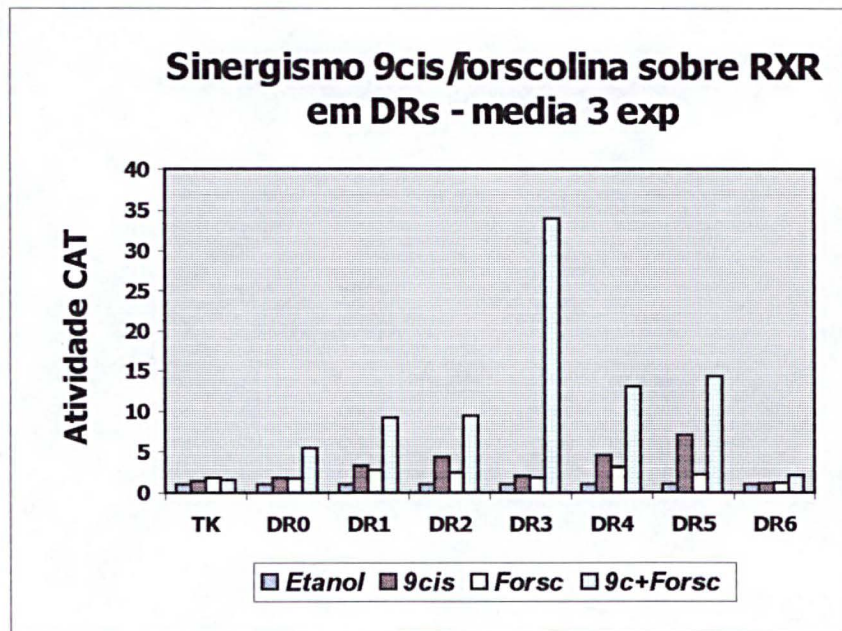


Figura 9. Resposta ao 9cis mediada por RXR em células U937 (células promonocíticas humanas), média de três experimentos. As células foram co-transfectadas com plasmídeo vetor pRShRXRa (contendo o cDNA do RXR alfa) e o plasmídeo repórter (contendo dois sítios AGGTCA dispostos consecutivamente para ligação de RXR, o promotor TK, e as seqüências que codificam para a enzima CAT) e tratadas com etanol, 9cis (100 nM), forskolina (10 µM) ou 9cis + forskolina por 24 horas e depois coletadas determinando-se a atividade de CAT. As DRs espaçada por 0 a 5 nucleotídeos foram capazes de ativar a produção de CAT em resposta ao 9cis, com potencialização do efeito com a adição de forskolina).

Tabela 12. Co-transfecção de RXR e gene repórter em células U937, média de 3 experimentos. Resposta de células U937 co-transfectadas com RXR e plasmídeos repórter na ausência (TK) ou na presença de DRs separados por um número variável de nucleotídeos (DR-0 a DR-6) ao veículo (etanol), 9cis, forskolina, ou 9cis + forskolina, média de três experimentos. Os números representam a razão entre a atividade de CAT observada na presença de 9cis, forskolina, ou 9cis + forskolina e a atividade observada no veículo (valor arbitrário =1).

	TK	DR0	DR1	DR2	DR3	DR4	DR5	DR6
Etanol	1	1	1	1	1	1	1	1
9cis	1,4	1,83	3,27	4,33	2,11	4,57	7,03	1,16
Forskolina	1,82	1,78	2,80	2,49	1,84	3,10	2,21	1,21
9cis + Forsc	1,60	5,39	9,22	9,45	34,0	13,09	14,26	2,14

Tabela 13. Transfecção do gene repórter em células U937. Resposta de células U937 transfectadas com plasmídeos repórter na ausência (TK) ou na presença de DRs separados por um número variável de nucleotídeos (DR-0 a DR-6) ao veículo (etanol), 9cis, forskolina, ou 9cis + forskolina. As células não foram cotransfectadas com RXR. Os números representam a razão entre a atividade de CAT observada na presença de 9cis, forskolina, ou 9cis + forskolina e a atividade observada no veículo (valor arbitrário =1).

	TK	DR0	DR1	DR2	DR3	DR4	DR5	DR6
Etanol	1	1	1	1	1	1	1	1
9cis	1,07	0,80	0,75	0,98	2,27	1,51	1,46	0,90
Forskolina	1,27	2,71	2,09	1,58	1,78	1,80	1,12	1,04
9cis + Forsc	1,70	1,64	1,92	2,62	1,97	2,28	3,05	1,34

3.5. Análise de ligação do RXR com as DRs

Para avaliarmos a ligação do RXR com as DRs, utilizamos novamente o ensaio de eletroforese em poli(acrilamida), que permite distinguir os complexos proteína-DNA do DNA livre, não ligado à proteína. A Figura 10 mostra a ligação do RXR com as diversas DRs em ausência e na presença de 9cis. O RXR se ligou fracamente como homodímero em DR-1, ligação esta que foi muito aumentada na presença do 9cis. Não houve ligação do RXR como homodímero nas demais DRs na ausência de 9cis. Entretanto, a adição de 9cis provocou a formação de homodímeros de RXR em DR-2, DR-3, DR-4, DR-5 e DR-6 (Figura 10, seta ho). Não houve ligação do RX ao DR0. Como controle, a primeira canaleta de cada DR mostra as ligações inespecíficas com as proteínas presentes no lisado de reticulócitos que não contém TRb1 (seta li).

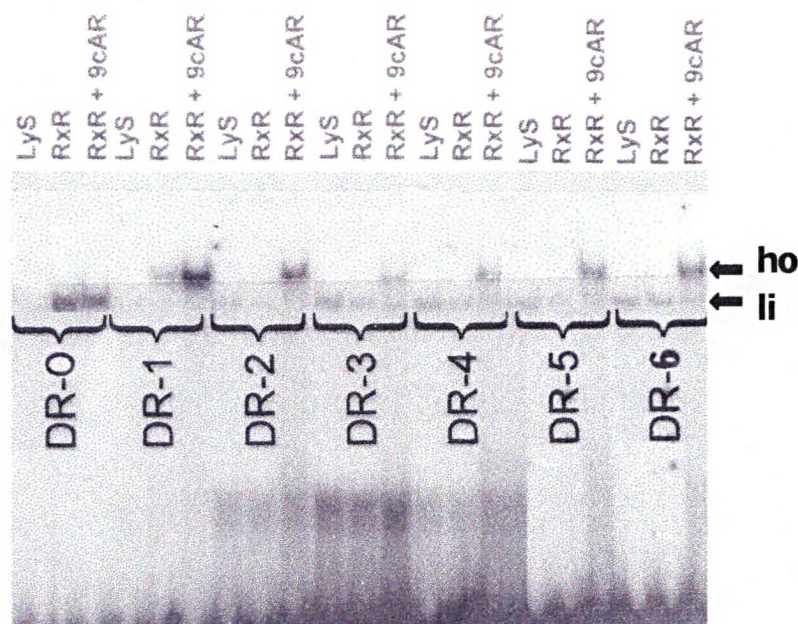


Figura 10. Ligação do RXR com DRs na ausência e na presença de 9cis, em eletroforese de gel de poliacrilamida. O RXR se liga fracamente como homodímero em DR-1, mas a ligação é muito aumentada na presença do 9cis. Não houve ligação do RXR como homodímero nas demais DRs na ausência de 9cis. Entretanto, a adição de 9cis provocou a formação de homodímeros de RXR em DR-2, DR-3, DR-4, DR-5 e DR-6 (seta ho). Não houve ligação do RX ao DR0. A seta li representa a formação de complexos inespecíficos, na presença apenas do lisado de reticulócitos.

3.6. Resposta ao 9cisRA mediada pelo RXRalfa humano em células U937 na presença do TRbeta.

Nossos resultados sugerem que a resposta ao 9cis nas DRs 1 a 6 em células U937 foi mediada por homodímeros de RXR. Na presença de TR, a formação de heterodímeros de TR-RXR prevalece sobre os homodímeros de RXR. Segue-se portanto, que a co-transfecção de TR diminui os homodímeros de RXR e portanto deve inibir a resposta ao 9cis nas células U937 transfectadas apenas com RXR. Os resultados da co-transfecção de TR e RXR em células U937 demonstraram que a resposta ao 9cis + forskolina mediada por RXRs em DRs 0 a 6 foi reduzida pela presença de TR (Figura 11, tabela 14). Na figura 12 e tabela 15 mostramos a média de três experimentos onde se observa a ação inibitória que a presença do TR exerce sobre a resposta do RXR ao 9cis + forskolina. Tais resultados sugerem que a formação de heterodímeros de TR-RXR inibe a resposta deste ao seu ligante.

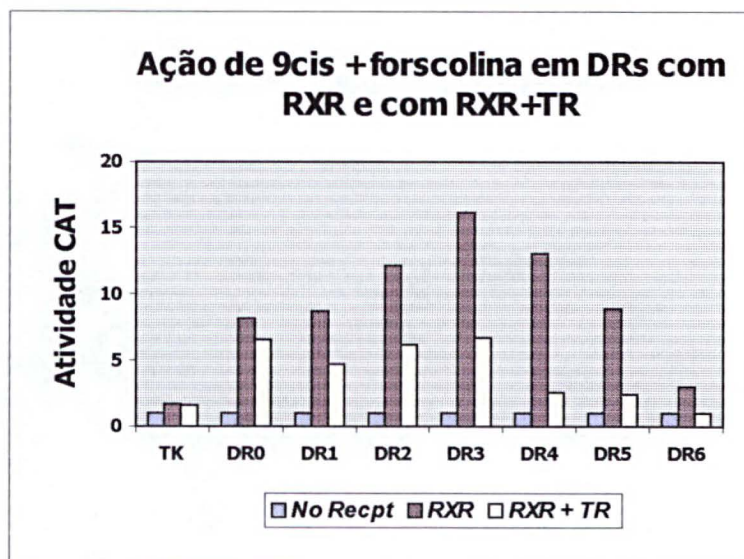


Figura 11. Resposta ao 9cis + forskolina mediada por RXR em células U937 (células promonocíticas humanas), na presença de TR. As células foram co-transfectadas com plasmídeo vetor pRShRXRa (contendo o cDNA do RXR alfa), isoladamente, ou junto com o plasmídeo vetor pRShTRb, (contendo o cDNA do TR beta), e o plasmídeo repórter (contendo dois sítios AGGTCA dispostos consecutivamente para ligação de RXR, o promotor TK, e as seqüências que codificam para a enzima CAT) e tratadas com 9cis + forskolina por 24 horas e depois coletadas determinando-se a atividade de CAT. Os resultados da co-transfecção de TR e RXR em células U937 demonstraram que a resposta ao 9cis + forskolina mediada por RXRs em DRs 0 a 6 foi reduzida pela presença de TR.

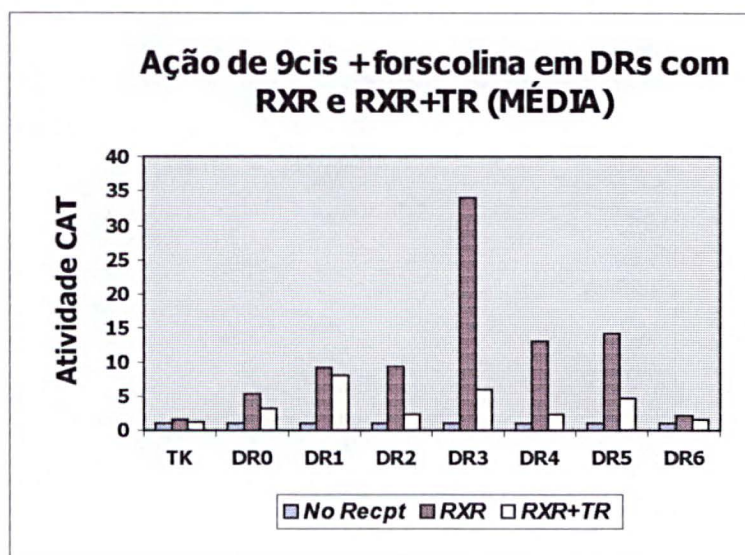


Figura 12. Resposta ao 9cis + forskolina mediada por RXR em células U937 (células promonocíticas humanas), na presença de TR (média de tres experimentos). Resposta ao 9cis + forskolina mediada por RXR em células U937 (células promonocíticas humanas), na presença de TR. As células foram

cotransfectadas com plasmídeo vetor pRShRXRa, (contendo o cDNA do RXR alfa), isoladamente ou junto com o plasmídeo vetor pRShTRb, (contendo o cDNA do TR beta), e o plasmídeo repórter (contendo dois sítios AGGTCA dispostos consecutivamente para ligação de RXR, o promotor TK, e as seqüências que codificam para a enzima CAT e tratadas com 9cis + forskolina por 24 horas e depois coletadas determinando-se a atividade de CAT. Os resultados da co-transfecção de TR e RXR em células U937 demonstraram que a resposta ao 9cis + forskolina mediada por RXRs em DRs 0 a 5 foi reduzida pela presença de TR.

Tabela 14. Co-transfecção de RXR, RXR + TR e gene repórter em células U937. Ativação sinérgica das DRs por 9cis + forskolina em células U937 em RXR e a diminuição desta ativação sinérgica na co-transfecção de RXR + TR.

	TK	DR0	DR1	DR2	DR3	DR4	DR5	DR6
Etanol	1	1	1	1	1	1	1	1
RXR	1,69	8,13	8,66	12,13	16,12	13,05	8,85	2,98
RXR + TR	1,62	6,53	4,73	6,13	6,66	2,57	2,42	1,02

Tabela 15. Co-transfecção de RXR, RXR + TR e gene repórter em células U937, média de 3 experimentos. Ativação sinérgica das DRs por 9cis + forskolina em células U937 em RXR e a diminuição desta ativação sinérgica na co-transfecção de RXR + TR. (média de três experimentos).

	TK	DR0	DR1	DR2	DR3	DR4	DR5	DR6
Etanol	1	1	1	1	1	1	1	1
RXR	1,60	5,39	9,22	9,45	34,0	13,09	14,26	2,14
RXR + TR	1,24	3,24	8,11	2,33	5,95	2,32	4,74	1,60

3.7. Ligação de RXR + TR em DR-1

Para confirmarmos os dados da literatura que indicam que na presença de TR ocorre dissociação de homodímeros de RXR, mesmo na presença de 9cis, e formação de heterodímeros de TR-RXR, utilizamos novamente o ensaio de ligação proteína-DNA em gel de poliacrilamida. A Figura 13 mostra que a ligação dos homodímeros de RXR na presença do seu ligante 9cis a DR1 (Figura 13, seta ho) é diminuída quando se adiciona TR na reação. Neste caso, como os heterodímeros de TR-RXR não se ligam a DR-1, não se observa a formação de homodímeros.

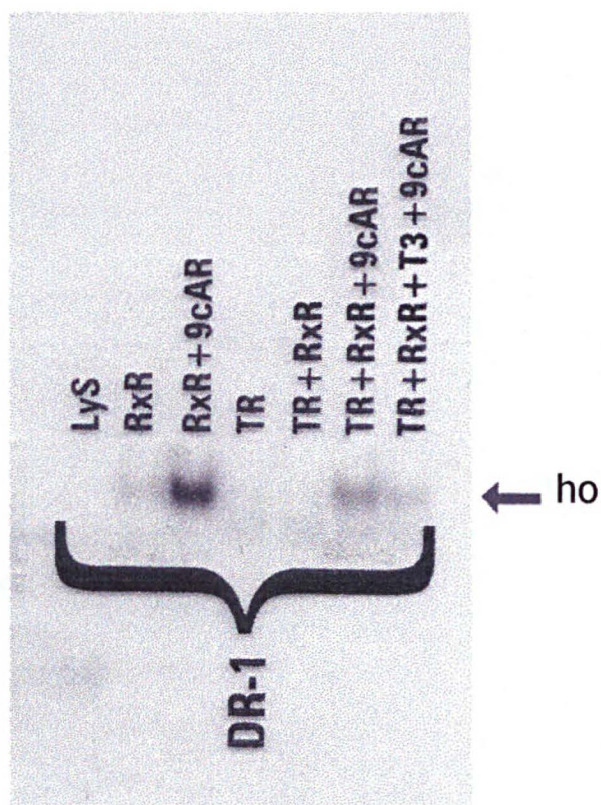


Figura 13. Ligação homodimérica de RXR em DR1, na presença de TR. A ligação homodimérica de RXR em DR1 é diminuída na presença de TR.

3.8. Ligação de RXR + TR em DRs

Na presença de DR-4, observa-se nitidamente a imediata formação de heterodímeros entre RXR e TR (Figura 14, seta he), e com menor intensidade em DR3 e DR5. Não se observa ligação específica de TR com RXR em DR0, DR1, DR2 e DR6.

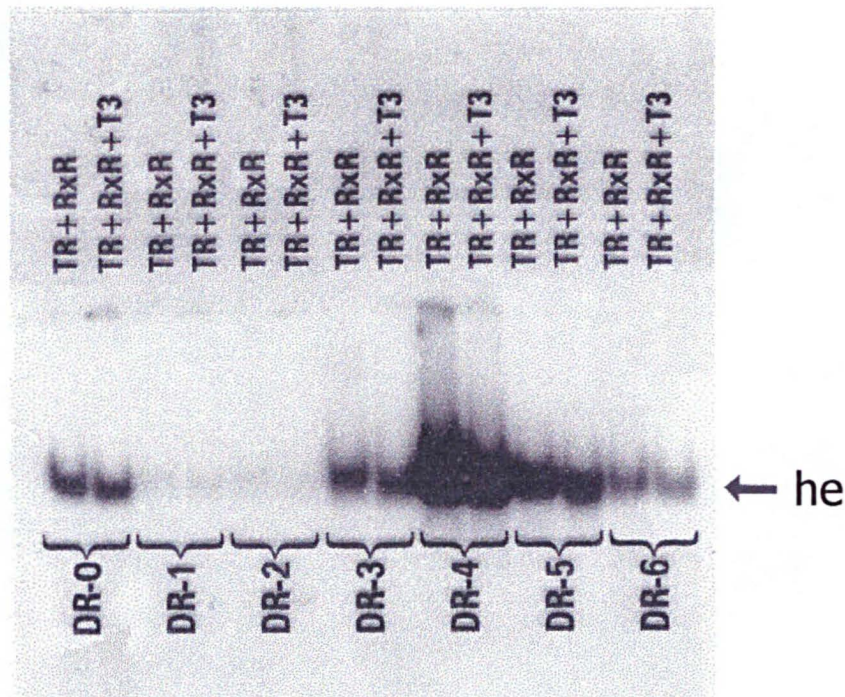


Figura 14. Formação de heterodímeros entre RXR e TR em diferentes DRs. Formação de heterodímeros entre RXR e TR intensa em DR4 e com menor intensidade em DR3 e DR5. Não se observa ligação de TR com RXR em DR0, DR1, DR2 e DR6.

4. DISCUSSÃO

Nosso estudo analisou a ligação do TR e do RXR a um grupo de DRs, duas cópias de AGGTCA repetidas e separadas por um número variável de nucleotídeos, de 0 a 6. Dois aspectos importantes foram investigados, um relativo à ligação *in vitro* dos receptores às DRs, evidenciada pela mudança da mobilidade dos complexos receptor-DNA durante eletroforese em gel de poliacrilamida (ensaios de ligação proteína-DNA) e outro relacionado a resposta mediada *in vivo* pelas diversas DRs ao T3 e /ou 9cisRA em ensaios com células transfectadas com TR e/ou RXR.

Nossos resultados mostraram que a resposta ao T3 mediada pelo TR- β 1 humano depende do espaçamento existente entre as DRs e da ativação do sistema da proteína cinase A. Os testes funcionais em células co-transfectadas com o TR e com o plasmídeo repórter contendo DRs espaçadas de 0 a 6 nucleotídeos, confirmaram que o espaçamento ideal para a resposta ao T3 mediada pelo TR é de 4 nucleotídeos. A ativação da enzima CAT foi bem evidente na DR-4, independente do tipo celular, com resposta tanto nas células HTC como nas células U937. Não observamos ativação pelo T3 nos experimentos em que apenas o plasmídeo repórter contendo DR-4 foi transfectado, demonstrando que a expressão do TR é essencial para a ativação da transcrição em células HTC e em células U937. Por outro lado, é importante ressaltar que não houve diferença significativa entre a ativação do T3 em células transfectadas com TR comparadas às co-transfectadas com TR e RXR, sugerindo que a expressão de RXR exógeno não potencializa a ação do TR nestas células. Acredita-se que RXR está presente em praticamente todos os tecidos, estando presente tanto em células HTC como U937 (Leid, Kastner et al. 1992). Desta forma, a ativação que observamos em DR-4 pode ser atribuída à formação de heterodímeros entre RXR e TR. Tal modelo de ação do T3 se baseia no fato de que o TR se liga ao DR-4 como homodímero e reprime a transcrição basal. A adição do T3 desfaz os homodímeros do TR favorecendo indiretamente a formação de heterodímeros entre RXR e TR e promovendo a ativação da transcrição (Andersson, Nordstrom et al. 1992; Ribeiro, Kushner et al. 1992; Yen, Darling et al. 1992). O ensaio de ligação proteína-DNA em gel de poliacrilamida comprovou a eficiente associação dos heterodímeros de TR-RXR com a DR-4, embora

estes também tenham se formado em menor intensidade em DR0, DR3, DR5 e DR-6. Além disso, o ensaio da ligação proteína-DNA também comprovou que a adição de T3 reduz a formação de homodímeros de TR-TR e aumenta a de monômeros em DR-4, mas não a de heterodímeros entre RXR e TR. Portanto, concluímos que a resposta nas células HTC e U937 ao T3 é mediada pela ligação à DR-4 de heterodímeros entre TR e RXR, endógenos ou transfectados.

A estrutura cristalográfica de heterodímeros formados pelos DBDs de TR com RXR associados a DR-4 explica porque este espaçamento de 4 nucleotídeos é necessário para o estabelecimento de uma interface de dimerização entre os DBDs (Rastinejad, Perlmann et al. 1995). Esta interface utiliza aminoácidos do primeiro dedo de zinco do TR e do segundo dedo de zinco do RXR. Neste caso, o RXR se liga na posição 5' e o TR na posição 3'. Esta interface envolve também seqüências de aminoácidos situados na região carboxi-terminal do DBD do TR, a T-box e a A-box. Na T-box do TR, que se inicia logo após o seu segundo dedo de zinco, há um ácido aspártico que faz contato com uma arginina na base do segundo dedo de zinco do RXR reforçando a interface de dimerização. Na A-box do TR, que se inicia após a T-box forma-se uma hélice α que possui 24 aminoácidos e se projeta sobre a fenda menor do DNA onde estabelece inúmeros contatos que estabilizam a interação com o DNA (Rastinejad, Perlmann et al. 1995; Feng, Ribeiro et al. 1998).

Em outros TREs, que não a DR-4, a co-transfecção de RXR pode inibir ou aumentar a transcrição mediada por homodímeros de TR (Hsu, Zavacki et al. 1995). A multiplicidade de TRs, RXRs, e TREs sugere que podem existir combinações distintas para o controle específico dos genes responsivos ao hormônio tireoideano. Ligado ao DNA, a formação RXR/TR é favorecida nos TREs do tipo DR-4 e TRE-pal (Ribeiro, Kushner et al. 1992). No palíndromo invertido (Pal-inv), prevalece o homodímero TR/TR, cuja ligação é diminuída quando na presença de RXR, que forma heterodímeros com TR em solução, ou pelo T3, que inibe a formação de homodímeros de TR em Pal-inv (Ribeiro, Kushner et al. 1992; Piedrafita, Bendik et al. 1995).

Além do RXR, outras proteínas podem interferir na capacidade transcricional do TR. Recentemente, a descoberta de proteínas co-reguladoras, que se associam com o TR

para a ativação ou repressão da transcrição, adicionou mais um elemento de complexidade ao sistema (Horlein, Naar et al. 1995). A expressão destas proteínas co-reguladoras em quantidades diferentes em tipos celulares distintos, pode modular a resposta hormonal de maneira específica. Portanto, variações no número de TRs e RXRs, de proteínas co-reguladoras podem dar origem à diferentes respostas transcricionais observadas em ensaios de transfecção.

Tanto nas células HTC como nas células U937, a forskolina potencializou significativamente o aumento da transcrição mediada por TR em DR-4 em resposta ao T3. Este sinergismo entre T3 ligado ao TR com PKA é muito mais acentuado nas células U937, mostrando a importância do contexto celular neste mecanismo. Uma vez que os receptores TR e RXR são fosforilados *in vitro* pela PKA (Leitman, Costa et al. 1996), este mecanismo pode ser o responsável pela potencialização da PKA na ação do TR ligado ao T3. A fosforilação do TR- β pode aumentar seletivamente a formação de homodímeros (Chin 1994; Sugawara, Yen et al. 1994). Entretanto, ainda é controverso se a fosforilação aumenta a formação de heterodímeros entre TR e RXR (Chin 1994). Por outro lado, a fosforilação da variante endógena TR- $\alpha 2$, inibe a sua ligação ao DNA e pode modular o efeito dominante negativo do TR- $\alpha 2$ ao reduzir a competição desta isoforma com as outras isoformas pela ligação aos TREs (Lazar 1993). A observação de que a ação do T3 é aumentada pela inibição farmacológica de fosfatases e diminuída pela inibição de proteína-quinases celulares sugere que a fosforilação é importante para a ação do TR *in vivo* (Lin, Ashizawa et al. 1992; Aronica, Kraus et al. 1994). Em função da interação entre TR e outras proteínas, todas potencialmente alvos de fosforilação, é possível que o sítio de fosforilação não seja o TR e sim outros fatores de transcrição regulados pela PKA e/ou PKC (*Protein kinase C*) como por exemplo, CREB e o complexo AP-1, que podem também modular a função do TR (Lopez, Schaufele et al. 1993).

Nossos resultados anteriores mostraram que a potencialização do TR pela PKA não depende da estrutura do TRE, uma vez que esta ocorre tanto em DRs, como no TREpal ou no palíndromo invertido Pal-Inv (Leitman, Costa et al. 1996). A presença de um TRE é essencial para este sinergismo, já que o plasmídeo sem o TRE não demonstrou resposta ao T3 e/ou a PKA. Mutações no DBD ou no LBD do TR, que impedem a

ligação do TR com o TRE ou com o T3, também interferem na ação da PKA sobre o TR, demonstrando que estes sítios são essenciais para implementação do sinergismo (Leitman, Costa et al. 1996). Por outro lado, a porção amino-terminal é totalmente dispensável, já que a sua exclusão não interfere com o sinergismo (Leitman, Costa et al. 1996).

Nós demonstramos anteriormente que o sinergismo entre TR e PKA depende do contexto celular, ou seja, embora ocorra com as células U937, o mesmo não é observado em outras linhagens como células F9, JEG-3, CV-1, HeLa e L929 (Leitman, Costa et al. 1996). Esta especificidade celular no sinergismo da PKA com o TR contrasta com outros receptores nucleares, como RAR, GR (*Glucocorticoid receptors*), ER (*Estrogen receptor*) e PR (*Progesterone receptor*), onde tal sinergismo ocorre em várias linhagens celulares (Denner, Weigel et al. 1990; Rangarajan, Umesono et al. 1992; Huggenvik, Collard et al. 1993; Rochette-Egly, Oulad-Abdelghani et al. 1995). Estes resultados indicam que as células U937 e células HTC possuem fatores específicos que são ativados pela PKA, que podem estar ausentes em outros tipos celulares que são responsivos ao T3. Nossos estudos anteriores sugerem que o fator potencial CREB, que também é fosforilado pelo PKA e está ausente nas células F9 (Rangarajan, Umesono et al. 1992) não é o responsável pela falta de sinergismo nas células F9, uma vez que a co-transfecção de CREB com TR em células F9 não restituiu o sinergismo (Leitman, Costa et al. 1996).

Estudos com os outros membros da família dos receptores nucleares, têm demonstrado a potencial interação entre as vias de sinalização destes receptores e do AMPc. As ações dos receptores nucleares sabidamente são influenciadas por sistemas de sinalização de segundo mensageiros, como o AMPc/adenil ciclase/PKA e fosfolipase/PKC. Além de TR, a PKA estimula a ativação transcricional ligante-dependente de glicocorticóides, ácido retinóico, estrogênio, progesterona e Vitamina D (Denner, Schrader et al. 1990; Denner, Weigel et al. 1990; Rangarajan, Umesono et al. 1992; Rochette-Egly, Oulad-Abdelghani et al. 1995).

A fosforilação de receptores nucleares tem sido implicada em diversas atividades, como ligação hormonal, translocação nuclear, ligação ao DNA, dimerização e atividade transcricional (Leitman, Costa et al. 1996). Entretanto, estudos de receptores

mutantes nem sempre fornecem um quadro claro do papel da fosforilação na função do receptor. A fosforilação do RAR aumenta de forma importante a transcrição gênica, efeito que ainda é amplificado com a presença do ligante RA (Huggenvik, Collard et al. 1993). O RAR é fosforilado diretamente pela PKA *in vivo* na serina 369, mas mutações da serina 369 para alanina não abolem o aumento da transcrição induzida pela PKA. Este achado sugere que a PKA pode afetar a atividade de outras proteínas envolvidas na transcrição mediada pelo RAR (Rochette-Egly, Oulad-Abdelghani et al. 1995). Desta forma, a questão se o sinergismo entre receptores nucleares e PKA é devido a fosforilação de receptores e/ou outras proteínas ainda não está devidamente esclarecida.

Como vimos, o TR é um alvo potencial para a fosforilação pela PKA. A PKA fosforila de forma eficiente a molécula intacta do TR, mas não o fragmento isolado do LBD do TR *in vitro* (Leitman, Costa et al. 1996). Estes resultados, combinados com aqueles que sugerem que o TRE influencia alostericamente o DBD do TR, que é essencial para o sinergismo, são consistentes com a noção de que o DBD do TR pode ser o alvo da ação da PKA. Entretanto, não existem sítios de consenso para a fosforilação no DBD e portanto, necessitamos de mais estudos para localizar os aminoácidos do TR que são fosforilados pela PKA. Outros estudos com GRs (Rangarajan, Umesono et al. 1992) sugerem que o sinergismo possa ser devido em parte a uma ligação aumentada do TR fosforilado ao DNA. Entretanto, é improvável que uma maior ligação de TR fosforilado seja responsável pelo sinergismo, uma vez que não foi observada qualquer diferença na ligação ao DNA, quando o TR fosforilado era comparado ao TR não-fosforilado (Leitman, Costa et al. 1996).

O sinergismo TR-PKA também difere de outros receptores nucleares pelo fato de que ocorre apenas quando o T3 está ligado ao TR, ao passo que a PKA ativa outros receptores nucleares não ligados aos seus respectivos ligantes, como os receptores para progesterona, vitamina D, estrogênio e ácido retinóico (Denner, Weigel et al. 1990; Aronica, Kraus et al. 1994).

Os resultados do presente estudo fornecem evidência de que as vias de sinalização do TR estão acopladas a outras vias de sinalização como as do AMPc, podendo levar a fosforilação destes receptores e aumento de suas atividades

transcricionais, caracterizando uma “conversa cruzada” entre ativadores da PKA e T3 na transcrição mediada pelo TR.

A mudança de mobilidade do DNA durante eletroforese em gel de poliacrilamida, utilizando as seqüências DR-0 a DR-6, marcadas com ^{32}P , mostraram que a ligação do TR como homodímero ocorreu mais intensamente em DR-4, mas foi diminuída com a adição de T3. A ação de T3, diminuindo a formação de homodímeros de TRs, é bem conhecida e descrita. Menos intensamente do que em DR-4, o TR também formou homodímeros em DR3, DR-5 e DR-6, formações estas sempre desfeitas com a adição de T3. O TR se ligou fracamente, como monômero, em DR1 a DR-6, com ligação intensa apenas em DR-0, onde não existe espaçamento entre os agrupamentos AGGTCA. Nossos resultados estão de acordo com relatos prévios (Lazar 1993), demonstrando que a DR-4 é a seqüência mais efetiva para a ligação de homodímeros do TR, que são diminuídos quando se adiciona T3.

A resposta ao 9cisRA pelo RXR α humano foi também avaliada em células HTC e U937, co-transfectadas com um plasmídeo repórter contendo DRs da seqüência consenso AGGTCA. Ao contrário dos resultados com a transfecção de TR, não se observou com RXR qualquer ativação das DRs em células HTC em resposta ao 9-cisRA, forskolina ou ambos. Pode-se inferir que estas células não possuem os componentes necessários para responder ao 9cisRA. Em contrapartida, houve resposta positiva do RXR ao 9-cisRA em DR-1, DR-2, DR-3, DR-4 e DR-5 nas células U937, com evidente ação sinérgica quando se acrescentou forskolina.

Demonstramos que o 9cisRA estimulava em 3 vezes a transcrição via DR-1, e que na presença de forskolina este aumento era de 9 vezes, indicando que ativadores do AMPc podem potencializar a transcrição mediada por RXR ligado pelo 9cisRA. Na ausência de 9cisRA, a forskolina estimulou a transcrição em 2 vezes. A co-transfecção do plasmídeo expressando RXR junto com um plasmídeo controle sem DRs (TK), não apresentou resposta ao 9cisRA e/ou forskolina mostrando que a resposta depende da presença de DRs. O 9cisRA também estimulou outras DRs: DR-2 (4 vezes), DR-3 (2 vezes), DR-4 (4 vezes) e DR-5 (7 vezes). Em todos os casos, a adição de forskolina aumentou a estimulação pelo 9cisRA de 2 a 5 vezes. Na ausência de RXR não se

observou qualquer resposta dos DRs ao 9-cAR, forskolina, ou a ambos mostrando que a resposta depende da presença de RXR.

Nossos ensaios de mudança de mobilidade em gel, empregando RXR α , mostraram que o RXR se liga a todos os elementos DR testados (DR-1 a DR-6), com exceção de DR-0, numa forma 9cisRA-dependente. Na ausência do ligante 9cisRA, observou-se a formação de homodímeros do RXR apenas em DR-1, conforme anteriormente descrito (Levin, Sturzenbecker et al. 1992; Zhang, Lehmann et al. 1992). Neste caso, a adição de 9cisRA aumentou de forma importante a formação de homodímeros de RXR. Nossos dados sugerem que os homodímeros de RXR se ligam e ativam DRs com diferentes espaçamentos, ao contrário da regra que confere aos homodímeros de RXR o acesso restrito a DR-1. Outros autores demonstraram que RXRs podem se ligar como homodímeros a variantes de DR1, a DR-2 e DR-5 (Zhang, Lehmann et al. 1992; Dowhan, Downes et al. 1994; Subauste, Katz et al. 1994; Castelein, A et al. 1996). Dowhan e colaboradores (1994) mostraram que RXRs podem se ligar a DRs espaçadas por 2, 4 e 8 bases e ao TRE-pal, embora o grau de ativação transcricional tenha sido menos intenso que em DR-1. A sugestão de que homodímeros de RXR podem ter uma especificidade maior de ligação ao DNA do que se supunha anteriormente, foi também sugerido por Castelein e colaboradores (1996) que mostraram ligação homodimérica de RXR a DR2 e DR6 (Castelein, A et al. 1996) (Dowhan, Downes et al. 1994). Os resultados do presente estudo confirmam e expandem estes dados, já que mostramos que RXRs também estimulam a transcrição mediada através de DR-3 e DR-4 e que estes efeitos dependem do contexto celular, pois são observados em U937, mas não em células derivadas de hepatócitos, HTC.

Embora não se possa excluir a possibilidade de formação de heterodímeros entre RXR transfectado e RAR endógeno das células U937, acreditamos que a ação do RXR nos DRs é devida a formação de homodímeros de RXR nestes elementos.

Na formação de heterodímeros em DR-1 com o RAR, o RXR ocupa a posição 3', e neste caso não há ativação da transcrição porque o co-repressor permanece ligado aos receptores mesmo na presença do ligante (Kurokawa, DiRenzo et al. 1994). Desta forma, as nossas transfecções de RXR em DR-1 sugerem a formação de homodímeros de RXR na ativação da transcrição.

Embora apenas o DR-1 seja considerado um RXRE característico, demonstramos que homodímeros de RXR também se ligam a outros DRs, como DR-2, DR-3, DR-4, DR-5 e DR-6, como sugerido por outros autores (Mader, Leroy et al. 1993; Force, Tillman et al. 1994). Estes dados reforçam a possibilidade de que o RXR tenha um papel mais generalizado na transcrição gênica atuando como homodímeros na presença de seu ligante 9-cRA, podendo ser fosforilado após sua ligação ao DNA, com ampliação da transcrição gênica

Uma vez que o RXR não ligado ao 9cisRA é uma proteína que forma heterodímeros com vários receptores nucleares, incluindo o RAR, é difícil determinar a distribuição do RXR ligado e ativado *in vivo*. Recentemente, foi demonstrado em camundongos transgênicos a expressão do RXR ligado e ativado na medula espinhal num padrão indicativo da importância do RXR na maturação de neurônios motores para os membros inferiores (Solomin, Johansson et al. 1998). Níveis elevados de RA foram detectados na medula espinhal embrionária de camundongos, mas a função do RXR ativado por seu ligante 9-cisRA é mais difícil de detectar, porque o RXR age como parceiro silencioso de vários receptores nucleares, ao formar heterodímeros com estes na ausência de 9cisRA. Entretanto, a ativação simultânea por ligantes específicos para RAR e RXR promove várias respostas fisiológicas sinérgicas *in vitro* (Durand, Saunders et al. 1994; Bissonnette, Brunner et al. 1995; Roy, Taneja et al. 1995; Botling, Castro et al. 1997).

A demonstração da importância da sinalização por RXR *in vivo* na inervação motora sugere um papel mais abrangente para este receptor nuclear na transcrição gênica (Solomin, Johansson et al. 1998). A região carboxi-terminal do LBD do RXR, que contém uma função AF-2, de transativação, dependente do ligante, parece ser importante para as funções de desenvolvimento. Mutações em camundongos, que excluem a região AF-2 do RXR α , mostraram uma variação grande de malformações, que recapitulam o espectro pleno dos defeitos que caracterizam a síndrome de deficiência fetal de Vitamina A (Mascrez, Mark et al. 1998).

Nós demonstramos que a sinalização pela PKA aumenta as propriedades transcricionais de TR e RXR de uma maneira específica, dentro do contexto celular, e que a conversa cruzada pode depender de outros fatores além dos receptores nucleares e

da PKA. Ainda não se sabe se a conversa cruzada entre TR ou RXR com PKA requer a fosforilação destes receptores nucleares ou de outras proteínas co-ativadoras. Tanto o TR como o RXR são alvos da PKA *in vitro*, mas outros estudos são necessários para definir os sítios e o papel da fosforilação.

Vários grupos mostraram recentemente que o TR e outros receptores nucleares, bem como o SRC-1, também interagem com um co-ativador caracterizado na via de sinalização do AMPc, a CBP, que é a proteína ligadora do CREB. (Chakravarti, LaMorte et al. 1996; Kamei, Xu et al. 1996). Desta forma, SRC-1 e CBP cooperam com os TRs para o estímulo sinérgico da transcrição mediada pelos hormônios tireoideanos, permitindo a convergência de duas importantes vias de sinalização na célula, uma via membrana plasmática e outra via receptor nuclear, caracterizando a conversa cruzada. Finalmente, é provável que outros co-ativadores adicionais para os TRs e RXRs sejam identificados, como já demonstrado para os ERs (Halachmi, Marden et al. 1994), e que estes se distribuam de forma variável entre os diferentes tecidos (Chin and Yen 1997).

Também demonstramos que o RXR como homodímero pode exercer um papel transcricional mais amplo que aquele restrito ao de um parceiro silencioso quando heterodimerizado com outros receptores. A potencialização de sua ação transcricional como homodímero ligado ao 9cisRA aumenta a possibilidade que o RXR atue como um genuíno e independente fator de transcrição.

5. CONCLUSÕES

1. A repetição direta DR-4 representa o elemento responsivo ideal para o receptor tireoideano (TR);
2. Ativadores do sistema AMPc/PKA aumentam a resposta transcricional do TR induzida pelo T3 em DR-4, em cultura de células de hepatocarcinoma de rato (HTC) e células promonocíticas humanas (U937), caracterizando uma interação entre sistemas distintos de sinalização;
3. O Receptor do Retinoide X (RXR) se liga como homodímero a DR1. Na presença de seu ligante, ácido *9cis*-retinóico (*9cis*RA), o RXR se liga como homodímero fortemente a DR1 e com menor intensidade em DR2, DR3, DR4, DR5 e DR-6;
4. Ativadores do sistema AMPc/PKA, sinergizam a resposta transcricional do RXR a seu ligante *9cis*RA em DR1, DR2, DR3, DR4 e DR5 em cultura de células HTC e U937, caracterizando uma interação entre sistemas distintos de sinalização;
5. Receptores nucleares como TR e RXR mantem conversa cruzada com sistemas de sinalização que atuam via sistema AMPc/PKA.

6. APÊNDICE 1

Tabela com Resultados das Transfecções em células HTC

TK

	TK	TK + TR	TK + RXR	TK + TR + RXR
Etanol	1	1	1	1
T3	1,09	0,82	1,06	0,53
9cis	1,16	1,21	0,73	0,92
Forscolina (F)	1,37	1,67	1,39	1,53
T3 + 9cis	1,43	1,31	0,88	0,62
T3 + F	1,80	1,46	1,48	0,87
9cis + F	1,58	1,35	1,07	1,17
T3 + 9cis + F	2,23	1,10	0,94	0,58

DR0

	DR0	DR0 + TR	DR0 + RXR	DR0 + TR + RXR
Etanol	1	1	1	1
T3	0,91	0,75	0,98	0,48
9cis	1,14	0,75	0,89	1,02
F	1,30	1,23	1,25	1,19
T3 + 9cis	1,62	1,21	0,97	0,82
T3 + F	1,71	1,25	1,49	0,88
9cis + F	1,58	1,49	0,97	1,33
T3 + 9cis + F	1,64	1,15	1,13	0,93

DR1

	DR1	DR1 + TR	DR1 + RXR	DR1 + TR + RXR
Etanol	1	1	1	1
T3	0,92	0,78	1,14	0,71
9cis	1,22	1,23	1,18	1,33
F	1,24	1,41	1,49	1,27
T3 + 9cis	1,48	1,35	1,17	1,01
T3 + F	1,52	1,48	1,44	1,00
9cis + F	1,44	1,52	1,37	1,43
T3 + 9cis + F	1,72	1,61	1,55	1,39

DR2

	DR2	DR2 + TR	DR2 + RXR	DR2 + TR + RXR
Etanol	1	1	1	1
T3	1,0	1,0	1,23	0,65
9cis	1,27	1,26	1,63	1,40
F	1,24	1,43	1,54	0,98
T3 + 9cis	1,57	1,36	2,0	0,94
T3 + F	1,54	1,47	1,84	0,76
9cis + F	1,49	1,59	1,96	1,44
T3 + 9cis + F	1,80	1,52	2,19	0,91

DR3

	DR3	DR3 + TR	DR3 + RXR	DR3 + TR + RXR
Etanol	1	1	1	1
T3	0,88	0,96	0,99	0,85
9cis	2,27	1,11	1,29	1,54
F	1,12	1,17	1,26	1,42
T3 + 9cis	1,56	1,43	1,52	1,24
T3 + F	1,58	1,33	1,35	1,52
9cis + F	1,64	1,51	1,25	1,94
T3 + 9cis + F	1,48	1,51	1,01	2,41

DR4 - Exp 1

	DR4	DR4 + TR	DR4 + RXR	DR4 + TR + RXR
Etanol	1	1	1	1
T3	0,79	7,75	0,48	5,86
9cis	0,46	1,55	1,52	1,82
F	0,57	2,26	1,57	1,68
T3 + 9cis	0,26	7,96	1,50	8,22
T3 + F	0,21	19,21	1,83	10,28
9cis + F	0,18	2,17	1,37	5,65
T3 + 9cis + F	0,15	19,19	1,75	8,67

DR4 - Exp II

	DR4	DR4 + TR	DR4 + RXR	DR4 + TR + RXR
Etanol	1	1	1	1
T3	1,13	12,40	1,38	5,77
9cis	1,58	1,87	3,06	1,48
F	1,22	1,59	1,40	1,03
T3 + 9cis	2,03	15,69	3,00	7,26
T3 + F	1,50	17,61	1,90	6,89
9cis + F	1,97	2,46	2,39	2,09
T3 + 9cis + F	2,67	19,90	2,92	8,20

DR5

	DR5	DR5 + TR	DR5 + RXR	DR5 + TR + RXR
Etanol	1	1	1	1
T3	1,01	1,50	1,10	0,80
9cis	1,83	2,53	1,57	1,70
F	1,32	1,97	1,30	1,37
T3 + 9cis	2,03	5,07	2,49	2,72
T3 + F	1,29	3,03	1,21	0,93
9cis + F	2,12	3,44	2,42	2,71
T3 + 9cis + F	2,92	5,47	2,03	2,56

DR6

	DR6	DR6 + TR	DR6 + RXR	DR6 + TR + RXR
Etanol	1	1	1	1
T3	0,86	1,30	0,96	0,79
9cis	1,45	1,13	1,15	1,40
F	1,29	1,24	1,04	1,10
T3 + 9cis	1,80	2,07	1,53	1,29
T3 + F	1,54	2,06	1,59	1,02
9cis + F	1,87	2,23	1,92	1,90
T3 + 9cis + F	2,00	1,98	1,74	1,04

7. APÊNDICE 2

Tabela com Resultado das Transfecções com células U937

TK - Exp. I

	TK	TK+ TR	TK + RXR	TK + TR + RXR
Etanol	1	1	1	1
T3	0,98	1,07	1,05	0,87
9cis	1,07	0,97	1,13	1,22
Forscolina (F)	1,27	1,51	1,42	1,46
T3 + 9cis	1,11	1,02	1,23	1,07
T3 + F	1,62	1,22	1,33	0,77
9cis + F	1,7	1,58	1,69	1,62
T3 + 9cis + F	1,18	1,44	1,4	1,15

TK - Exp. II

	TK	TK+ TR	TK + RXR	TK + TR + RXR
Etanol	1	1	1	1
T3	0,93	0,52	1,14	0,81
9cis	0,89	0,74	0,98	0,91
F	1,07	0,84	1,29	1,20
T3 + 9cis	0,93	0,55	0,84	1,07
T3 + F	1,09	0,62	1,00	0,98
9cis + F	0,91	0,68	1,35	1,03
T3 + 9cis + F	1,03	0,51	1,31	0,91

TK - Exp. III

	TK	TK+ TR	TK + RXR	TK + TR + RXR
Etanol	1	1	1	1
T3	0,87	1,12	1,60	0,74
9cis	0,92	1,01	2,09	0,93
F	1,08	1,18	2,75	1,02
T3 + 9cis	0,75	1,10	1,91	0,69
T3 + F	0,98	1,17	1,91	1,52
9cis + F	1,02	1,30	1,77	1,07
T3 + 9cis + F	1,05	1,10	2,10	0,81

DR0 - Exp. I

	DR0	DR0 + TR	DR0 + RXR	DR0 + TR + RXR
Etanol	1	1	1	1
T3	0,57	0,46	0,26	0,80
9cis	0,80	0,88	2,18	1,58
F	2,71	1,77	2,03	1,93
T3 + 9cis	0,61	0,45	0,85	1,57
T3 + F	2,69	1,65	0,63	2,17
9cis + F	1,64	1,41	8,14	6,53
T3 + 9cis + F	2,15	1,18	3,16	7,24

DR0 - Exp. II

	DR0	DR0 + TR	DR0 + RXR	DR0 + TR + RXR
Etanol	1	1	1	1
T3	0,86	0,81	0,99	0,70
9cis	1,01	0,90	1,73	1,03
F	1,23	1,23	1,82	1,14
T3 + 9cis	0,97	0,77	1,44	0,80
T3 + F	1,42	1,23	1,46	0,95
9cis + F	1,58	1,03	4,54	1,74
T3 + 9cis + F	1,18	1,22	2,91	1,50

DR0 - Exp. III

	DR0	DR0 + TR	DR0 + RXR	DR0 + TR + RXR
Etanol	1	1	1	1
T3	1,05	0,46	1,19	0,72
9cis	1,14	0,75	1,57	1,07
F	1,35	1,39	1,50	1,04
T3 + 9cis	1,12	0,94	1,20	0,91
T3 + F	1,26	1,06	1,65	0,77
9cis + F	2,15	1,08	3,51	1,45
T3 + 9cis + F	1,17	1,08	3,39	1,08

DR1 - Exp. I

	DR1	DR1 + TR	DR1 + RXR	DR1 + TR + RXR
Etanol	1	1	1	1
T3	1,07	0,41	0,62	0,34
9cis	0,75	0,60	2,82	1,76
F	2,09	1,35	2,16	2,26
T3 + 9cis	0,98	0,45	2,50	0,97
T3 + F	1,99	0,91	1,64	0,90
9cis + F	1,92	0,96	8,66	4,73
T3 + 9cis + F	1,74	0,89	8,58	2,05

DR1 - Exp. II

	DR1	DR1 + TR	DR1 + RXR	DR1 + TR + RXR
Etanol	1	1	1	1
T3	0,96	0,94	1,20	1,11
9cis	1,15	0,72	2,67	2,23
F	1,26	1,35	2,53	1,79
T3 + 9cis	0,88	0,96	1,22	2,07
T3 + F	1,42	1,22	1,50	1,81
9cis + F	1,63	1,30	7,30	6,65
T3 + 9cis + F	1,33	1,25	2,24	7,09

DR1 - Exp. III

	DR1	DR1 + TR	DR1 + RXR	DR1 + TR + RXR
Etanol	1	1	1	1
T3	0,73	0,71	0,86	0,86
9cis	1,00	0,44	4,33	5,85
F	3,40	2,33	3,72	2,45
T3 + 9cis	1,00	0,73	4,48	3,11
T3 + F	2,83	1,61	3,18	1,51
9cis + F	3,54	2,43	11,70	12,96
T3 + 9cis + F	3,24	1,66	10,30	5,03

DR2 - Exp. I

	DR2	DR2 + TR	DR2 + RXR	DR2 + TR + RXR
Etanol	1	1	1	1
T3	0,85	0,57	0,92	0,74
9cis	0,98	0,64	2,87	3,06
F	1,58	1,34	2,81	2,55
T3 + 9cis	1,11	0,56	3,91	1,41
T3 + F	2,89	1,40	2,29	0,96
9cis + F	2,62	1,67	12,13	6,13
T3 + 9cis + F	1,94	0,89	15,87	3,90

DR2 - Exp. II

	DR2	DR2 + TR	DR2 + RXR	DR2 + TR + RXR
Etanol	1	1	1	1
T3	1,09	0,44	0,62	0,57
9cis	1,05	1,33	4,28	3,54
F	1,95	2,17	1,83	3,20
T3 + 9cis	1,05	0,52	3,22	1,01
T3 + F	1,88	1,04	1,91	0,92
9cis + F	2,67	2,37	9,65	11,80
T3 + 9cis + F	2,48	1,21	8,59	2,09

DR2 - Exp. III

	DR2	DR2 + TR	DR2 + RXR	DR2 + TR + RXR
Etanol	1	1	1	1
T3	0,64	0,47	0,79	0,15
9cis	1,20	1,18	5,83	4,02
F	2,15	1,27	2,82	1,23
T3 + 9cis	1,17	0,33	5,74	1,80
T3 + F	2,01	0,71	2,67	0,62
9cis + F	2,98	1,64	6,58	5,35
T3 + 9cis + F	2,48	0,75	5,95	3,03

DR3 - Exp. I

	DR3	DR3 + TR	DR3 + RXR	DR3 + TR + RXR
Etanol	1	1	1	1
T3	0,52	0,93	0,82	1,03
9cis	2,27	1,02	2,49	2,90
F	1,78	1,17	1,72	1,31
T3 + 9cis	0,83	0,93	3,66	1,91
T3 + F	1,81	1,74	2,32	1,52
9cis + F	1,97	1,19	16,12	6,66
T3 + 9cis + F	2,36	1,69	14,56	7,28

DR3 - Exp. II

	DR3	DR3 + TR	DR3 + RXR	DR3 + TR + RXR
Etanol	1	1	1	1
T3	2,67	1,08	0,64	0,92
9cis	1,96	0,72	2,43	1,55
F	4,19	1,85	2,56	1,57
T3 + 9cis	1,90	1,12	2,62	1,23
T3 + F	3,40	2,10	1,98	3,25
9cis + F	2,81	1,86	15,94	5,32
T3 + 9cis + F	4,17	1,94	11,67	5,04

DR3 - Exp. III

	DR3	DR3 + TR	DR3 + RXR	DR3 + TR + RXR
Etanol	1	1	1	1
T3	0,72	0,83	1,00	1,40
9cis	0,40	0,83	1,41	2,29
F	1,85	3,60	1,25	2,25
T3 + 9cis	0,90	0,16	0,75	1,89
T3 + F	0,52	0,54	1,50	3,12
9cis + F	0,43	1,30	69,92	5,88
T3 + 9cis + F	2,21	1,16	63,50	5,52

DR4 - Exp. I

	DR4	DR4 + TR	DR4 + RXR	DR4 + TR + RXR
Etanol	1	1	1	1
T3	1,38	7,43	1,24	6,28
9cis	1,51	1,76	6,06	2,37
F	1,80	0,85	2,23	1,00
T3 + 9cis	2,10	9,39	7,14	12,94
T3 + F	3,54	16,10	4,05	22,80
9cis + F	2,28	1,29	13,05	2,57
T3 + 9cis + F	4,20	15,14	14,10	33,09

DR4 - Exp. II

	DR4	DR4 + TR	DR4 + RXR	DR4 + TR + RXR
Etanol	1	1	1	1
T3	0,86	7,60	1,07	6,88
9cis	0,84	0,90	3,32	1,90
F	2,00	0,90	2,89	1,95
T3 + 9cis	1,30	5,66	5,11	19,30
T3 + F	3,18	23,30	6,17	30,12
9cis + F	2,20	1,42	12,56	7,78
T3 + 9cis + F	4,04	21,90	15,58	55,0

DR4 - Exp. III

	DR4	DR4 + TR	DR4 + RXR	DR4 + TR + RXR
Etanol	1	1	1	1
T3	1,96	6,22	1,44	3,49
9cis	1,45	1,05	1,88	1,21
F	2,84	1,69	2,19	1,31
T3 + 9cis	2,35	9,36	2,69	5,74
T3 + F	5,03	36,90	5,45	25,30
9cis + F	3,59	2,18	6,10	2,03
T3 + 9cis + F	9,60	35,90	13,08	28,69

DR4 - Exp. IV

	DR4	DR4 + TR	DR4 + RXR	DR4 + TR + RXR
Etanol		1	1	1
T3		20,01	1,88	7,39
9cis		1,31	5,77	0,17
F		1,81	4,88	0,80
T3 + 9cis		26,72	9,38	12,90
T3 + F		43,76	9,81	18,26
9cis + F		1,50	20,14	2,37
T3 + 9cis + F		41,22	23,63	23,18

DR5 - Exp. I

	DR5	DR5 + TR	DR5 + RXR	DR5 + TR + RXR
Etanol	1	1	1	1
T3	0,70	1,03	1,00	0,88
9cis	1,46	0,41	3,90	1,35
F	1,12	0,73	1,68	0,83
T3 + 9cis	1,70	0,94	2,75	1,00
T3 + F	1,09	1,75	1,85	1,35
9cis + F	3,05	1,15	8,85	2,38
T3 + 9cis + F	2,25	1,62	10,18	3,17

DR5 - Exp. II

	DR5	DR5 + TR	DR5 + RXR	DR5 + TR + RXR
Etanol	1	1	1	1
T3	0,60	0,65	1,69	0,46
9cis	2,47	2,46	11,30	5,80
F	1,03	0,85	1,30	1,37
T3 + 9cis	2,47	1,95	11,74	4,89
T3 + F	1,12	1,55	3,38	0,38
9cis + F	2,94	2,69	13,20	7,10
T3 + 9cis + F	2,77	2,78	12,92	6,52

DR5 - Exp. III

	DR5	DR5 + TR	DR5 + RXR	DR5 + TR + RXR
Etanol	1	1	1	
T3	0,60	0,63	0,70	
9cis	6,30	3,89	5,89	
F	1,85	2,73	3,66	
T3 + 9cis	2,83	2,02	4,34	
T3 + F	1,63	2,30	2,73	
9cis + F	9,72	8,35	20,73	
T3 + 9cis + F	7,86	5,09		

DR6- Exp. I

	DR6	DR6 + TR	DR6 + RXR	DR6 + TR + RXR
Etanol	1	1	1	1
T3	0,83	0,93	0,88	0,90
9cis	0,90	0,98	1,16	0,98
F	1,04	1,03	1,21	1,12
T3 + 9cis	1,07	0,95	1,08	1,05
T3 + F	1,00	1,17	1,43	1,29
9cis + F	1,34	1,00	2,98	1,69
T3 + 9cis + F	1,25	1,01	2,37	2,16

DR6- Exp. II

	DR6	DR6 + TR	DR6 + RXR	DR6 + TR + RXR
Etanol	1	1	1	1
T3	1,41	0,79	1,00	1,00
9cis	1,25	0,76	1,15	1,30
F	1,12	1,94	1,22	1,00
T3 + 9cis	1,29	0,67	1,44	1,26
T3 + F	1,54	0,97	1,27	1,73
9cis + F	0,87	1,26	1,31	1,52
T3 + 9cis + F	1,12	1,03	1,86	1,69

8. GLOSSÁRIO

α hélice - elementos encontrados na estrutura protéica na qual uma sequência de aminoácidos consecutivos forma uma estrutura helicoidal;

anfipático - dito de proteínas ou outras moléculas que possuem regiões ou domínios domínios hidrofóbicos (não-polares) e hidrofílicos (polares);

autoradiografia - técnica na qual moléculas marcadas com radioatividade são detectadas por seu efeito em criar uma imagem num filme fotográfico;

bacteriófago - vírus que infectam bactérias; utilizado como vetor em procedimentos de clonagem e expressão;

cinase - enzima que fosforila (adiciona um grupo fosfato) a um substrato; os substratos para as proteino cinases são aminoácidos em outras proteínas;

cDNA, (DNA complementar) - fita única de DNA complementar a um RNA, sintetizado por transcrição reversa ;

conformação protéica - arranjo tridimensional da proteína que pode ser modificado por interações com ligantes, com outras proteínas ou por modificações enzimáticas;

controle alostérico - capacidade de uma interação em um sítio de uma proteína influenciar a atividade em outro sítio;

conversa cruzada (“crosstalk”) - interação entre dois sistemas distintos de sinalização, por exemplo entre AMPc e receptores nucleares;

co-ativador - molécula que desencadeia ativação da transcrição ao se ligar a uma proteína reguladora; por exemplo, receptores nucleares;

co-repressor - molécula que desencadeia repressão da transcrição ao se ligar a uma proteína reguladora; por exemplo, receptores nucleares;

co-transfecção - introdução de mais de um DNA estranho em uma célula eucariótica, usualmente seguida de expressão de um ou mais genes codificados pelos DNAs recém introduzidos;

crystalografia - análise dos padrões de difração dos raios-X de um composto, empregada para determinar a estrutura tridimensional da molécula;

cuveta – tubo de laboratório transparente, geralmente para pequenos volumes (inferiores a 05 mL) usados em fotometria e espectrometria; uma cuveta especial é utilizada para os experimentos de electroporação;

DBD (“DNA binding domain”) - domínio do receptor nuclear que se liga ao DNA de forma específica;

domínio ou módulo - porção de uma proteína que geralmente cumpre uma função particular;

elemento responsivo ao hormônio - sequência de DNA ao qual se ligam os receptores nucleares e outros fatores de transcrição, que respondem aos respectivos hormônios ou ligantes, influenciando a transcrição gênica;

electroporação - método de transfecção no qual DNA é introduzido em células de mamíferos, utilizando-se um gerador de pulso com determinada voltagem para tornar as células permeáveis ao DNA exógeno;

elementos amplificadores da transcrição (“enhancers”) - seqüências regularias de DNA, às quais se ligam proteínas reguladoras e que podem atuar tanto a montante opo a jusante promotor;

enzima de restrição – são endodesoxirribonucleases que reconhecem e cortam seqüências curtas e específicas de DNA;

expressão gênica - transcrição de um gene, segmento codificador de DNA, em RNA mensageiro;

fator de transcrição - proteína necessária para iniciar ou regular a transcrição em eucariócitos.

gene repórter - unidade codificadora cujo produto é facilmente detectável (como a cloranfenicol acetiltransferase), podendo ser conectada a qualquer promotor de interesse, de maneira que a expressão do gene pode ser usado para mensurar a função do promotor;

LBD (“ligand binding domain”) - domínio do receptor nuclear com seqüência aminoácida específica ao qual se liga o hormônio ou ligante;

palíndromo - seqüência de DNA contendo geralmente 6 ou mais bases em que a seqüência de bases de uma das fitas lidas no sentido 5’- 3’ é idêntica a seqüência da outra fita lida também no sentido 5’- 3’;

plasmídeo - pequena molécula circular de DNA, extracromossômica, que se replica de forma independente do genoma, comumente empregada como vetor na clonagem de DNA;

polímeros - molécula grande formada por uma série de ligações covalentes que ligam múltiplas unidades idênticas ou similares (monômeros);

pós-traducional - alterações induzidas por enzimas a uma proteína após a mesma ter sido sintetizada por exemplo glicosilação, fosforilação e metilação;
processamento alternativo

promotor - região do DNA envolvida na ligação da RNA polimerase para iniciar a transcrição;

promotor mínimo – região do DNA envolvida na ligação da RNA polimerase para iniciar a transcrição e que geralmente não contém sítios para ligação de fatores reguladores da transcrição

proteína cinase A - enzima que fosforila proteínas alvo em resposta a uma elevação intracelular de AMPc

proteína cinase C - enzima que fosforila proteínas alvo em resposta a um aumento na concentração intracelular de cálcio e ativação por diacilglicerol;

proteínas modulares - proteínas que apresentam seqüências de aminoácidos com

proto-oncogene - gene normal que geralmente codifica uma proteína envolvida na regulação da proliferação celular;

repetições diretas – seqüências idênticas ou relacionadas de nucleotídeos, presentes em uma ou mais cópias, na mesma orientação na mesma molécula de DNA, e que podem ter um número variável de nucleotídeos entre as cópias;

repressão – inibição da transcrição pela ligação de uma proteína repressora a um sítio específico do DNA;

repressor – proteína que se liga a uma região reguladora ou operadora do DNA que previne a transcrição de um determinado gene;

RNA polimerase - enzima que catalisa a formação do RNA, a partir de ribonucleotídeos 5'-trifosfato, usando uma fita do DNA ou RNA como molde;

seqüências flanqueadoras - nucleotídeos ou seqüências nucleotídicas que se localizam imediatamente a montante ou a jusante de elementos responsivos hormonais;

seqüestro (“*squelching*”) – seqüestro de determinado fator de transcrição, como o receptor nuclear, por ligação a outra proteína, o que o impede de exercer a sua ação;

sinergismo - interação de dois ou mais agentes de maneira que o seu efeito combinado é maior que a soma dos seus efeitos individuais;

tradução - processo pelo qual a seqüência de nucleotídeos numa molécula de RNA mensageiro dirige a incorporação de aminoácidos em proteínas;

transativação constitutiva

transcrição - processo enzimático através do qual a informação genética contida em uma fita de DNA é usada para especificar uma seqüência de bases complementares numa cadeia de RNA mensageiro;

transcrição gênica

transfecção - introdução de DNA exógeno em uma célula;

translocação - no caso de proteínas, se refere a transferência de proteínas no interior das células, por exemplo do citoplasma ao núcleo; no caso de genes se refere a transferência uma porção do cromossoma para uma nova localização no cromossomo ou para outro cromossoma;

ubíqua - se refere a presença de moléculas que são encontradas de forma generalizada em todos os tecidos;

vetor de clonagem - plasmídeo ou fago utilizado para carregar DNA exógeno para o interior da célula;

vetor de expressão - vetor de clonagem que contém as seqüências que codificam para uma determinada proteína.

9. REFERÊNCIAS

- Andersson, M. L., K. Nordstrom, et al. (1992). "Thyroid hormone alters the DNA binding properties of chicken thyroid hormone receptors alpha and beta." Nucleic Acids Res. **20**: 4803-4810.
- Apriletti, J. W., J. D. Baxter, et al. (1988). "Large scale purification of the nuclear thyroid hormone receptor from rat liver and sequence-specific binding of the receptor to DNA." J. Biol. Chem. **263**: 9409-9417.
- Aronica, S. M., W. L. Kraus, et al. (1994). "Estrogen action via the cAMP signaling pathway: stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription." Proc Natl Acad Sci USA **91**(18): 8517-21.
- Baniahmad, A., I. Ha, et al. (1993). "Interaction of human thyroid hormone receptor beta with transcription factor TFIIB may mediate target gene derepression and activation by thyroid hormone." Proc Natl Acad Sci USA **90**(19): 8832-6.
- Baniahmad, A., X. Leng, et al. (1995). "The tau 4 activation domain of the thyroid hormone receptor is required for release of a putative corepressor(s) necessary for transcriptional silencing." Mol Cell Biol **15**(1): 76-86.
- Baniahmad, A., C. Steiner, et al. (1990). "Modular structure of a chicken lysozyme silencer: involvement of an unusual thyroid hormone receptor binding site." Cell **61**: 505-514.
- Baniahmad, A., S. Y. Tsai, et al. (1992). "Kindred S thyroid hormone receptor is an active and constitutive silencer and a repressor for thyroid hormone and retinoic acid responses." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **89**: 10633-10637.
- Baretino, D., M. M. Vivanco Ruiz, et al. (1994). "Characterization of the ligand-dependent transactivation domain of thyroid hormone receptor." EMBO J **13**(13): 3039-3049.
- Beebe, J. S., D. S. Darling, et al. (1991). "3,5,3'-triiodothyronine receptor auxiliary protein (TRAP) enhances receptor binding by interactions within the thyroid hormone response element." Mol. Endocrinol. **5**: 85-93.
- Berrodin, T. J., M. S. Marks, et al. (1992). "Heterodimerization among thyroid hormone receptor, retinoic acid receptor, retinoid X receptor, chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor, and an endogenous liver protein." Mol. Endocrinol. **6**: 1468-1478.
- Bissonnette, R. P., T. Brunner, et al. (1995). "9-cis retinoic acid inhibition of activation-induced apoptosis is mediated via regulation of fas ligand and requires retinoic acid receptor and retinoid X receptor activation." Mol Cell Biol **15**(10): 5576-85.
- Botling, J., D. S. Castro, et al. (1997). "Retinoic acid receptor/retinoid X receptor heterodimers can be activated through both subunits providing a basis for synergistic transactivation and cellular differentiation." J Biol Chem **272**(14): 9443-9.

- Bradley, D. J., H. C. Towle, et al. (1992). "Spatial and temporal expression of alpha- and beta-thyroid hormone receptor mRNAs, including the beta 2-subtype, in the developing mammalian nervous system." J.Neurosci. **12**: 2288-2302.
- Brent, G. A. (1994). "The molecular basis of thyroid hormone action." N Engl J Med **331**(13): 847-853.
- Brent, G. A., M. K. Dunn, et al. (1989). "Thyroid hormone aporeceptor represses T3-inducible promoters and blocks activity of the retinoic acid receptor." New Biol. **1**: 329-336.
- Brent, G. A., D. D. Moore, et al. (1991). "Thyroid hormone regulation of gene expression." Annu.Rev.Physiol. **53**: 17-35.
- Brent, G. A., G. R. Williams, et al. (1991). "Effects of varying the position of thyroid hormone response elements within the rat growth hormone promoter: implications for positive and negative regulation by 3,5,3'-triiodothyronine." Mol.Endocrinol. **5**: 542-548.
- Bugge, T. H., J. Pohl, et al. (1992). "RXR alpha, a promiscuous partner of retinoic acid and thyroid hormone receptors." EMBO J. **11**: 1409-1418.
- Burnside, J., D. S. Darling, et al. (1990). "A nuclear factor that enhances binding of thyroid hormone receptors to thyroid hormone response elements." J.Biol.Chem. **265**: 2500-2504.
- Carlstedt-Duke, A. W. J., et al. (1994). Molecular mechanisms of hormone action: regulation of target cell function by the steroid hormone receptor supergene family. Endocrinology and Metabolism. P. F. Felig, J. D. Baxter and C. A. Frohman. New York, MacGraw-Hill.
- Carr, F. E., L. L. Kaseem, et al. (1992). "Thyroid hormone inhibits thyrotropin gene expression via a position-independent negative L-triiodothyronine-responsive element." J.Biol.Chem. **267**: 18689-18694.
- Casanova, J., E. Helmer, et al. (1994). "Functional evidence for ligand-dependent dissociation of thyroid hormone and retinoic acid receptors from an inhibitory cellular factor." Mol Cell Biol **14**(9): 5756-5765.
- Castelein, H., J. A, et al. (1996). "Sequence requirements for high affinity retinoid X receptor-alpha homodimer binding." Mol Cell Endocrinol **119**(1): 11-20.
- Chakravarti, D., V. J. LaMorte, et al. (1996). "Role of CBP/P300 in nuclear receptor signalling." Nature **383**(6595): 99-103.
- Chambon, P. (1994). "The retinoid signaling pathway: molecular and genetic analyses." Semin Cell Biol **5**(2): 115-25.
- Chen, J. D. and R. M. Evans (1995). "A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors." Nature **377**(6548): 454-457.
- Chin, W. (1991). Nuclear thyroid hormone receptor. Nuclear hormone receptors. M. G. Parker. London, Academic: 79-102.

- Chin, W. W. (1994). "Molecular mechanisms of thyroid hormone action." Thyroid **4**(3): 389-93.
- Chin, W. W., F. E. Carr, et al. (1993). "Thyroid hormone regulation of thyrotropin gene expression." Recent Prog Horm Res. **48**: 393-414.
- Chin, W. W. and P. Yen (1997). Molecular Mechanism of nuclear thyroid hormone action. Diseases of the Thyroid. L. E. Braverman. Totowa, New Jersey, Humana Press. **2**: 1-15.
- Cook, C. B., I. Kakucska, et al. (1992). "Expression of thyroid hormone receptor beta 2 in rat hypothalamus." Endocrinology **130**: 1077-1079.
- Darling, D. S., J. S. Beebe, et al. (1991). "3,5,3'-triiodothyronine (T3) receptor-auxiliary protein (TRAP) binds DNA and forms heterodimers with the T3 receptor." Mol.Endocrinol. **5**: 73-84.
- Denner, L. A., W. T. Schrader, et al. (1990). "Hormonal regulation and identification of chicken progesterone receptor phosphorylation sites." J Biol Chem **265**(27): 16548-55.
- Denner, L. A., N. L. Weigel, et al. (1990). "Regulation of progesterone receptor-mediated transcription by phosphorylation." Science **250**(4988): 1740-3.
- Dowhan, D. H., M. Downes, et al. (1994). "Identification of deoxyribonucleic acid sequences that bind retinoid-X receptor-gamma with high affinity." Endocrinology **135**(6): 2595-607.
- Durand, B., M. Saunders, et al. (1994). "Activation function 2 (AF-2) of retinoic acid receptor and 9-cis retinoic acid receptor: presence of a conserved autonomous constitutive activating domain and influence of the nature of the response element on AF-2 activity." EMBO J **13**(22): 5370-5382.
- Durand, B., M. Saunders, et al. (1992). "All-trans and 9-cis retinoic acid induction of CRABP II transcription is mediated by RAR-RXR heterodimers bound to DR1 and DR2 repeated motifs." Cell **71**: 73-85.
- Evans, R. M. (1988). "The steroid and thyroid hormone receptor superfamily." Science **240**: 889-895.
- Feng, W., R. C. Ribeiro, et al. (1998). "Hormone-dependent coactivator binding to a hydrophobic cleft on nuclear receptors." Science **280**(5370): 1747-1749.
- Fondell, J. D., A. L. Roy, et al. (1993). "Unliganded thyroid hormone receptor inhibits formation of a functional preinitiation complex: implications for active repression." Genes Dev. **7**: 1400-1410.
- Force, W. R., J. B. Tillman, et al. (1994). "Homodimer and heterodimer DNA binding and transcriptional responsiveness to triiodothyronine (T3) and 9-cis-retinoic acid are determined by the number and order of high affinity half-sites in a T3 response element." J Biol Chem **269**(12): 8863-71.
- Forman, B. M., J. Casanova, et al. (1992). "Half-site spacing and orientation determines whether thyroid hormone and retinoic acid receptors and related factors bind to

- DNA response elements as monomers, homodimers, or heterodimers." Mol.Endocrinol. **6**: 429-442.
- Forman, B. M. and H. H. Samuels (1990). "Interactions among a subfamily of nuclear hormone receptors: the regulatory zipper model." Mol.Endocrinol. **4**: 1293-1301.
- Forman, B. M., K. Umesono, et al. (1995). "Unique response pathways are established by allosteric interactions among nuclear hormone receptors." Cell **81**(4): 541-550.
- Forman, B. M., C. R. Yang, et al. (1989). "A domain containing leucine-zipper-like motifs mediate novel in vivo interactions between the thyroid hormone and retinoic acid receptors." Mol.Endocrinol. **3**: 1610-1626.
- Giguere, V. (1994). "Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins: complex interplay in retinoid signaling." Endocr Rev **15**(1): 61-79.
- Giguere, V., E. S. Ong, et al. (1987). "Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid." Nature **330**: 624-629.
- Glass, C. K. (1994). "Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers." Endocr Rev **15**(3): 391-407.
- Glass, C. K., O. V. Devary, et al. (1990). "Multiple cell type-specific proteins differentially regulate target sequence recognition by the alpha retinoic acid receptor." Cell **63**: 729-738.
- Glass, C. K., J. DiRenzo, et al. (1991). "Regulation of gene expression by retinoic acid receptors." DNA Cell Biol. **10**: 623-638.
- Glass, C. K., J. M. Holloway, et al. (1988). "The thyroid hormone receptor binds with opposite transcriptional effects to a common sequence motif in thyroid hormone and estrogen response elements." Cell **54**: 313-323.
- Glass, C. K., S. M. Lipkin, et al. (1989). "Positive and negative regulation of gene transcription by a retinoic acid-thyroid hormone receptor heterodimer." Cell **59**: 697-708.
- Gudas, L. J. (1994). "Retinoids and vertebrate development." J Biol Chem **269**(22): 15399-402.
- Habener, J. F. (1990). "Cyclic AMP response element binding proteins: a cornucopia of transcription factors." Mol Endocrinol **4**(8): 1087-94.
- Halachmi, S., E. Marden, et al. (1994). "Estrogen receptor-associated proteins: possible mediators of hormone-induced transcription." Science **264**(5164): 1455-8.
- Hallenbeck, P. L., M. Phyllaier, et al. (1993). "Divergent effects of 9-cis-retinoic acid receptor on positive and negative thyroid hormone receptor-dependent gene expression." J.Biol.Chem. **268**: 3825-3828.
- Heyman, R. A., D. J. Mangelsdorf, et al. (1992). "9-cis retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor." Cell **68**: 397-406.

- Hodin, R. A., M. A. Lazar, et al. (1990). "Differential and tissue-specific regulation of the multiple rat c-erbA messenger RNA species by thyroid hormone." J.Clin.Invest. **85**: 101-105.
- Hodin, R. A., M. A. Lazar, et al. (1989). "Identification of a thyroid hormone receptor that is pituitary-specific." Science **244**: 76-79.
- Hoffmann, B., J. M. Lehmann, et al. (1990). "A retinoic acid receptor-specific element controls the retinoic acid receptor-beta promoter." Mol.Endocrinol. **4**: 1727-1736.
- Horlein, A. J., A. M. Naar, et al. (1995). "Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor." Nature **377**(6548): 397-404.
- Hsu, J. H., A. M. Zavacki, et al. (1995). "Retinoid-X receptor (RXR) differentially augments thyroid hormone response in cell lines as a function of the response element and endogenous RXR content." Endocrinology **136**(2): 421-30.
- Huan, B. and A. Siddiqui (1992). "Retinoid X receptor RXR alpha binds to and transactivates the hepatitis B virus enhancer." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. **89**: 9059-9063.
- Huggenvik, J. I., M. W. Collard, et al. (1993). "Modification of the retinoic acid signaling pathway by the catalytic subunit of protein kinase-A." Mol Endocrinol **7**(4): 543-50.
- Jameson, J. L. and L. J. DeGroot (1995). Mechanism of Thyroid Hormone Action. Endocrinology. J. L. DeGroot. Philadelphia, W.B.Saunders Company. **1**: 583-601.
- Jameson, J. L. P., R. G. (1995). Transcriptional regulation of endocrine genes by second-messenger signaling pathways. Molecular Endocrinology, Basic Concepts and Clinical Correlations. B.I.Weintraub. New York, Raven Press. **1**: 59-76.
- Jones, K. E., J. H. Brubaker, et al. (1994). "Evidence that phosphorylation events participate in thyroid hormone action." Endocrinology **134**(2): 543-8.
- Kamei, Y., L. Xu, et al. (1996). "A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors." Cell **85**(3): 403-14.
- Katz, D., T. J. Berrodin, et al. (1992). "The unique C-termini of the thyroid hormone receptor variant, c-erbA alpha 2, and thyroid hormone receptor alpha 1 mediate different DNA-binding and heterodimerization properties." Mol.Endocrinol. **6**: 805-814.
- Katz, D. and R. J. Koenig (1994). "Specificity and mechanism of thyroid hormone induction from an octamer response element." J. Biol. Chem. **269**(28): 18915-18920.

- Katz, D. and M. A. Lazar (1993). "Dominant negative activity of an endogenous thyroid hormone receptor variant (alpha 2) is due to competition for binding sites on target genes." *J. Biol. Chem.* **268**(28): 20904-10.
- Katz, D., M. J. Reginato, et al. (1995). "Functional regulation of thyroid hormone receptor variant TR alpha 2 by phosphorylation." *Mol Cell Biol* **15**(5): 2341-8.
- Katz, R. W. and R. J. Koenig (1993). "Nonbiased identification of DNA sequences that bind thyroid hormone receptor alpha 1 with high affinity." *J Biol Chem* **268**(26): 19392-7.
- Keller, H., C. Dreyer, et al. (1993). "Fatty acids and retinoids control lipid metabolism through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimers." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **90**: 2160-2164.
- Kliwer, S. A., J. M. Lenhard, et al. (1995). "A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation." *Cell* **83**(5): 813-819.
- Kliwer, S. A., K. Umesono, et al. (1992). "Retinoid X receptor-COUP-TF interactions modulate retinoic acid signaling." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **89**: 1448-1452.
- Kliwer, S. A., K. Umesono, et al. (1992). "Retinoid X receptor interacts with nuclear receptors in retinoic acid, thyroid hormone and vitamin D3 signalling." *Nature* **355**: 446-449.
- Kliwer, S. A., K. Umesono, et al. (1992). "Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors." *Nature* **358**: 771-774.
- Koenig, R. J. (1998). "Thyroid Hormone Receptor Coactivators and Corepressors." *Thyroid* **8**(8): 703-713.
- Krust, A., P. Kastner, et al. (1989). "A third human retinoic acid receptor, hRAR-gamma." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **86**: 5310-5314.
- Kurokawa, R., J. DiRenzo, et al. (1994). "Regulation of retinoid signalling by receptor polarity and allosteric control of ligand binding." *Nature* **371**(6497): 528-31.
- Kurokawa, R., M. Soderstrom, et al. (1995). "Polarity-specific activities of retinoic acid receptors determined by a co-repressor." *Nature* **377**(6548): 451-454.
- Kurokawa, R., V. C. Yu, et al. (1993). "Differential orientations of the DNA-binding domain and carboxy-terminal dimerization interface regulate binding site selection by nuclear receptor heterodimers." *Genes Dev.* **7**: 1423-1435.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(259): 680-685.
- Lazar, M. A. (1993). "Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities." *Endocr.Rev.* **14**: 184-193.
- Lazar, M. A. and W. W. Chin (1990). "Nuclear thyroid hormone receptors." *J.Clin.Invest.* **86**: 1777-1782.

- Leblanc, B. P. and H. G. Stunnenberg (1995). "9-cis retinoic acid signaling: changing partners causes some excitement." Genes Dev **9**(15): 1811-6.
- Lee, I. J., P. H. Driggers, et al. (1994). "Recombinant thyroid hormone receptor and retinoid X receptor stimulate ligand-dependent transcription in vitro." Proc Natl Acad Sci USA **91**(5): 1647-51.
- Lehmann, J. M., L. Jong, et al. (1992). "Retinoids selective for retinoid X receptor response pathways." Science **258**: 1944-1946.
- Leid, M., P. Kastner, et al. (1992). "Multiplicity generates diversity in the retinoic acid signalling pathways." Trends.Biochem.Sci. **17**: 427-433.
- Leid, M., P. Kastner, et al. (1992). "Purification, cloning, and RXR identity of the HeLa cell factor with which RAR or TR heterodimerizes to bind target sequences efficiently." Cell **68**: 377-395.
- Leitman, D. C., C. H. Costa, et al. (1996). "Thyroid hormone activation of transcription is potentiated by activators of cAMP-dependent protein kinase." Journal of Biological Chemistry **271**(36): 21950-5.
- Leitman, D. C., R. C. Ribeiro, et al. (1991). "Identification of a tumor necrosis factor-responsive element in the tumor necrosis factor alpha gene." J.Biol.Chem. **266**: 9343-9346.
- Leng, X., S. Y. Tsai, et al. (1993). "Ligand-dependent conformational changes in thyroid hormone and retinoic acid receptors are potentially enhanced by heterodimerization with retinoic X receptor." J Steroid Biochem Mol Biol **46**(6): 643-661.
- Levin, A. A., L. J. Sturzenbecker, et al. (1992). "9-cis retinoic acid stereoisomer binds and activates the nuclear receptor RXR alpha." Nature **355**: 359-361.
- Lin, K. H., K. Ashizawa, et al. (1992). "Phosphorylation stimulates the transcriptional activity of the human beta 1 thyroid hormone nuclear receptor." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. **89**: 7737-7741.
- Lopez, G., F. Schaufele, et al. (1993). "Positive and negative modulation of Jun action by thyroid hormone receptor at a unique AP1 site." Mol.Cell Biol. **13**: 3042-3049.
- Lotan, R., X. C. Xu, et al. (1995). "Suppression of retinoic acid receptor-beta in premalignant oral lesions and its up-regulation by isotretinoin." N Engl J Med **332**(21): 1405-10.
- Lucas, P. C., R. M. O'Brien, et al. (1991). "A retinoic acid response element is part of a pleiotropic domain in the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. **88**: 2184-2188.
- Luisi, B. F., W. X. Xu, et al. (1991). "Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA." Nature **352**: 497-505.

- Mader, S., J. Y. Chen, et al. (1993). "The patterns of binding of RAR, RXR and TR homo- and heterodimers to direct repeats are dictated by the binding specificities of the DNA binding domains." EMBO J **12**(13): 5029-41.
- Mader, S., P. Leroy, et al. (1993). "Multiple parameters control the selectivity of nuclear receptors for their response elements. Selectivity and promiscuity in response element recognition by retinoic acid receptors and retinoid X receptors." J.Biol.Chem. **268**: 591-600.
- Mangelsdorf, D. J., U. Borgmeyer, et al. (1992). "Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9- cis retinoic acid." Genes Dev. **6**: 329-344.
- Mangelsdorf, D. J. and R. M. Evans (1995). "The RXR heterodimers and orphan receptors." Cell **83**(6): 841-50.
- Mangelsdorf, D. J., E. S. Ong, et al. (1990). "Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway." Nature **345**: 224-229.
- Mangelsdorf, D. J., C. Thummel, et al. (1995). "The nuclear receptor superfamily: the second decade." Cell **83**(6): 835-9.
- Mascrez, B., M. Mark, et al. (1998). "The RXRalpha ligand-dependent activation function 2 (AF-2) is important for mouse development." Development **125**(23): 4691-4707.
- Mitchell, P. J. and R. Tjian (1989). "Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins." Science **245**(4916): 371-8.
- Mitsushashi, T. and V. M. Nikodem (1989). "Regulation of expression of the alternative mRNAs of the rat alpha-thyroid hormone receptor gene." J.Biol.Chem. **264**: 8900-8904.
- Miyamoto, T., S. Suzuki, et al. (1993). "High affinity and specificity of dimeric binding of thyroid hormone receptors to DNA and their ligand-dependent dissociation." Mol.Endocrinol. **7**: 224-231.
- Murray, M. B. and H. C. Towle (1989). "Identification of nuclear factors that enhance binding of the thyroid hormone receptor to a thyroid hormone response element." Mol.Endocrinol. **3**: 1434-1442.
- Naar, A. M., J. M. Boutin, et al. (1991). "The orientation and spacing of core DNA-binding motifs dictate selective transcriptional responses to three nuclear receptors." Cell **65**: 1267-1279.
- Nakshatri, H. and P. Chambon (1994). "The directly repeated RG(G/T)TCA motifs of the rat and mouse cellular retinol-binding protein II genes are promiscuous binding sites for RAR, RXR, HNF-4, and ARP-1 homo- and heterodimers." J Biol Chem **269**(2): 890-902.
- Nelson, C. C., J. S. Faris, et al. (1993). "Functional analysis of the amino acids in the DNA recognition alpha-helix of the human thyroid hormone receptor." Mol Endocrinol **7**(9): 1185-95.

- Neumann, J. R., C. A. Morency, et al. (1987). "A novel rapid assay for chloramphenicol acetyltransferase gene expression." BioTechniques **5**: 444-447.
- Nigg, E. A., H. Hilz, et al. (1988). "Rapid and reversible translocation of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase II from the golgi complex of the nucleus." Embo J(4): 2801-2806.
- O'Malley, B. W. and O. M. Conneely (1992). "Orphan receptors: in search of a unifying hypothesis for activation." Mol. Endocrinol. **6**: 1359-1361.
- Onate, S. A., S. Y. Tsai, et al. (1995). "Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily." Science **270**(5240): 1354-7.
- Oppenheimer, J. H. (1991). Thyroid hormone action at the cellular level. The Thyroid: A fundamental and Clinical Text. L. E. Braverman and R. D. Utiger. Philadelphia, Lippincot. **1**: 204-224.
- Oppenheimer, J. H., H. L. Schwartz, et al. (1995). An Integrated View of Thyroid Hormone Actions In Vivo. Molecular Endocrinology, Basic Concepts and Clinical Correlations. B. D. Weintraub. New York, Raven Press. **1**: 249-268.
- Oppenheimer, J. H., H. L. Schwartz, et al. (1974). "Tissue differences in the concentration of triiodothyronine nuclear binding sites in the rat: liver, kidney, pituitary, heart, brain, spleen, and testis." Endocrinology **95**(3): 897-903.
- Perlmann, T. and L. Jansson (1995). "A novel pathway for vitamin A signaling mediated by RXR heterodimerization with NGFI-B and NURR1." Genes Dev **9**(7): 769-82.
- Piedrafita, F. J., I. Bendik, et al. (1995). "Thyroid hormone receptor homodimers can function as ligand-sensitive repressors." Mol Endocrinol **9**(5): 563-78.
- Power, R. F., S. K. Mani, et al. (1991). "Dopaminergic and ligand-independent activation of steroid hormone receptors." Science **254**(5038): 1636-9.
- Predki, P. F., D. Zamble, et al. (1994). "Ordered binding of retinoic acid and retinoid-X receptors to asymmetric response elements involves determinants adjacent to the DNA-binding domain." Mol Endocrinol **8**(1): 31-9.
- Rangarajan, P. N., K. Umesono, et al. (1992). "Modulation of glucocorticoid receptor function by protein kinase." Mol. Endocrinol. **6**: 1451-1457.
- Rastinejad, F., T. Perlmann, et al. (1995). "Structural determinants of nuclear receptor assembly on DNA direct repeats." Nature **375**(6528): 203-211.
- Ribeiro, R. C., J. W. Apriletti, et al. (1994). "Heterodimerization and deoxyribonucleic acid-binding properties of a retinoid X receptor-related factor." Endocrinology **135**(5): 2076-85.
- Ribeiro, R. C., P. J. Kushner, et al. (1992). "Thyroid hormone alters in vitro DNA binding of monomers and dimers of thyroid hormone receptors." Mol. Endocrinol. **6**: 1142-1152.

- Ribeiro, R. C. J., J. W. Apriletti, et al. (1998). "Mechanisms of Thyroid Hormone Action: Insights from X-ray Crystallographic and Functional Studies." Recent Prog Horm Res **53**.
- Ribeiro, R. C. J., J. W. Apriletti, et al. (1995). "The molecular biology of thyroid hormone action." Ann. N. Y. Acad. Sci. **758**: 366-389.
- Ribeiro, R. C. J., R. R. Cavalieri, et al. (1996). "Thyroid hormone export regulates cellular hormone content and response." J Biol Chem **271**(29): 17147-51.
- Rochette-Egly, C., M. Oulad-Abdelghani, et al. (1995). "Phosphorylation of the retinoic acid receptor-alpha by protein kinase A." Mol Endocrinol **9**(7): 860-71.
- Rosen, E. D., A. L. O'Donnell, et al. (1992). "Ligand-dependent synergy of thyroid hormone and retinoid X receptors." J Biol Chem. **267**: 22010-22013.
- Rottman, J. N., R. L. Widom, et al. (1991). "A retinoic acid-responsive element in the apolipoprotein AI gene distinguishes between two different retinoic acid response pathways." Mol Cell Biol **11**: 3814-3820.
- Roy, B., R. Taneja, et al. (1995). "Synergistic activation of retinoic acid (RA)-responsive genes and induction of embryonal carcinoma cell differentiation by an RA receptor alpha (RAR alpha)-, RAR beta-, or RAR gamma-selective ligand in combination with a retinoid X receptor-specific ligand." Mol Cell Biol **15**(12): 6481-7.
- Sakurai, A., A. Nakai, et al. (1989). "Expression of three forms of thyroid hormone receptor in human tissues." Mol Endocrinol **3**: 392-399.
- Santos, A., H. C. Freake, et al. (1988). "Triiodothyronine nuclear binding capacity in rat tissues correlates with a 6.0 kilobase (kb) and not a 2.6 kb messenger ribonucleic acid hybridization signal generated by a human c-erbA probe." Mol Endocrinol **2**: 992-998.
- Sap, J., A. Munoz, et al. (1986). "The c-erb-A protein is a high-affinity receptor for thyroid hormone." Nature **324**: 635-640.
- Schrader, M., M. Becker-Andre, et al. (1994). "Thyroid hormone receptor functions as monomeric ligand-induced transcription factor on octameric half-sites. Consequences also for dimerization." J Biol Chem **269**(9): 6444-9.
- Schwartz, H. L., K. A. Strait, et al. (1992). "Quantitation of rat tissue thyroid hormone binding receptor isoforms by immunoprecipitation of nuclear triiodothyronine binding capacity." J Biol Chem. **267**: 11794-11799.
- Solomin, L., C. B. Johansson, et al. (1998). "Retinoid-X receptor signalling in the developing spinal cord." Natures **395**(6700): 398-402.
- Strait, K. A., H. L. Schwartz, et al. (1990). "Relationship of c-erbA mRNA content to tissue triiodothyronine nuclear binding capacity and function in developing and adult rats." J Biol Chem. **265**: 10514-10521.
- Subauste, J. S., R. W. Katz, et al. (1994). "DNA binding specificity and function of retinoid X receptor alpha." J Biol Chem **269**(48): 30232-7.

- Sucov, H. M., K. K. Murakami, et al. (1990). "Characterization of an autoregulated response element in the mouse retinoic acid receptor type beta gene." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. **87**: 5392-5396.
- Sugawara, A., P. M. Yen, et al. (1994). "Phosphorylation selectively increases triiodothyronine receptor homodimer binding to DNA." J Biol Chem **269**(1): 433-7.
- Sugawara, A., P. M. Yen, et al. (1994). "9-cis retinoic acid regulation of rat growth hormone gene expression: potential roles of multiple nuclear hormone receptors." Endocrinology **135**(5): 1956-62.
- Tagami, T., H. Nakamura, et al. (1993). "Estimation of the protein content of thyroid hormone receptor alpha 1 and beta 1 in rat tissues by western blotting." Endocrinology **132**: 275-279.
- Tagami, T., Y. Park, et al. (1999). "Mechanisms that mediate negative regulation of the thyroid-stimulating hormone alpha gene by the thyroid hormone receptor." J Biol Chem **274**(32): 22345-53.
- Takeshita, A., P. M. Yen, et al. (1996). "Molecular cloning and properties of a full-length putative thyroid hormone receptor coactivator." Endocrinology **137**(8): 3594-7.
- Teboul, M., E. Enmark, et al. (1995). "OR-1, a member of the nuclear receptor superfamily that interacts with the 9-cis-retinoic acid receptor." Proc Natl Acad Sci USA **92**(6): 2096-100.
- Tone, Y., T. N. Collingwood, et al. (1994). "Functional analysis of a transactivation domain in the thyroid hormone beta receptor." J Biol Chem **269**(49): 31157-31161.
- Tran, P., X. K. Zhang, et al. (1992). "COUP orphan receptors are negative regulators of retinoic acid response pathways." Mol.Cell Biol. **12**: 4666-4676.
- Umesono, K. and R. M. Evans (1989). "Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors." Cell **57**: 1139-1146.
- Umesono, K., K. K. Murakami, et al. (1991). "Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D3 receptors." Cell **65**: 1255-1266.
- Utiger, R. D. (1995). The thyroid: physiology, thyrotoxicosis, hypothyroidism, and the painful thyroid. Endocrinology and Metabolism. P. F. Felig, J. D. Baxter and C. A. Frohman. New York, MacGraw-Hill: 435-519.
- Wagner, R. L., J. W. Apriletti, et al. (1995). "A structural role for hormone in the thyroid hormone receptor." Nature **378**(6558): 690-697.
- Wahlstrom, G. M., M. Sjoberg, et al. (1992). "Binding characteristics of the thyroid hormone receptor homo- and heterodimers to consensus AGGTCA repeat motifs." Mol.Endocrinol. **6**: 1013-1022.

- Weinberger, C., C. C. Thompson, et al. (1986). "The c-erb-A gene encodes a thyroid hormone receptor." Nature **324**: 641-646.
- Williams, G. and G. A. Brent (1995). Thyroid Hormone Response Elements. Molecular Endocrinology - Basic Concepts and Clinical Correlations. B. D. Weintraub. New York, Raven Press. **1**: 217-239.
- Willy, P. J., K. Umesono, et al. (1995). "LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway." Genes Dev **9**(9): 1033-45.
- Yen, P. M., D. S. Darling, et al. (1992). "Triiodothyronine (T3) decreases binding to DNA by T3-receptor homodimers but not receptor-auxiliary protein heterodimers." J.Biol.Chem. **267**: 3565-3568.
- Yen, P. M., A. Sugawara, et al. (1992). "Triiodothyronine (T3) differentially affects T3-receptor/retinoic acid receptor and T3-receptor/retinoid X receptor heterodimer binding to DNA." J.Biol.Chem. **267**: 23248-23252.
- Yen, P. M., A. Sugawara, et al. (1992). "New insights on the mechanism(s) of the dominant negative effect of mutant thyroid hormone receptor in generalized resistance to thyroid hormone." J.Clin.Invest. **90**(A): 1825-1831.
- Yu, V. C., C. Delsert, et al. (1991). "RXR beta: a coregulator that enhances binding of retinoic acid, thyroid hormone, and vitamin D receptors to their cognate response elements." Cell **67**: 1251-1266.
- Zhang, X. K., B. Hoffmann, et al. (1992). "Retinoid X receptor is an auxiliary protein for thyroid hormone and retinoic acid receptors." Nature **355**: 441-446.
- Zhang, X. K., J. Lehmann, et al. (1992). "Homodimer formation of retinoid X receptor induced by 9-cis retinoic acid." Nature **358**: 587-591.
- Zhang, X. K., K. N. Wills, et al. (1991). "Ligand-binding domain of thyroid hormone receptors modulates DNA binding and determines their bifunctional roles." New Biol. **3**: 169-181.