

ACOPLAMIENTO MOLECULAR ROR α Y ROR β HUMANOS CON 7-DEHIDROCOLESTEROL: ENFOQUE TERAPÉUTICO EN ENFERMEDADES RELACIONADAS CON COLESTEROGÉNESIS

Daniel Alberto Garzón Pardo¹, Andrea Viviana Rodríguez Archila², Sergio Andrés Morantes Díaz³, Oscar Andrés Moreno Rodríguez⁴

¹ Pontificia Universidad Javeriana, Colombia

garzon-daniel@javeriana.edu.co

RESUMEN

7-dehidro-colesterol, un importante precursor de la vitamina D3 y sus otros derivados, tiene una afinidad relativamente alta para el receptor huérfano Ror α . La afinidad con el receptor huérfano Ror β aún no ha sido estudiada, pero estudios recientes han demostrado sin embargo que el sitio de unión al ligando en Ror α es muy conservado en Ror β , por lo que es muy posible que el ligando natural Ror α pueda ser el mismo para Ror β . Además, se ha revelado que el ligando conocido (ácido esteárico) de ROR β no tiene suficiente energía para generar un acoplamiento biológicamente significativo entre el receptor y el ligando. Proponemos a 7 dehidro-colesterol como un reemplazo para el ligando natural en ambos tipos de receptores huérfanos, la construcción de modelos 3D en Chimera, de 7-dehidro-colesterol con Ror α y Ror β humanas, comparadas con las estructuras de estos Rors (α y β) en el colesterol. De las posibles orientaciones de 7-dehidro-colesterol en Rors, una orientación tuvo los contactos más favorables con ambos Rors. Este estudio es considerado necesario para determinar si el 7- dehidro-colesterol puede ser ligando fisiológico para ambos receptores, y de ser así, delimitar cuáles son las funciones fisiológicas y los genes diana que regula.

INTRODUCCIÓN

La vitamina D3 se forma a partir del precursor esteroide 7-dehidro-colesterol (7-DHC) localizado principalmente en la membrana plasmática de los queratinocitos epidérmicos basales (80% de la piel con contenido de 7-DHC) [1, 4]. Esteroides derivados de animales, conocidos como zooesteroides, son un subconjunto del esteroide y una clase importante de moléculas orgánicas implícitos en diversos procesos biológicos en el metabolismo humano. Tres zooesteroides o derivados de estos con importante actividad estrogénica son el

colesterol, el ácido esteárico y el 7-dehidro-colesterol (Figura 1). El receptor huérfano α es un receptor nuclear que se une a ADN como un monómero a elementos de respuesta ROR (RORE) que contiene un motivo simple nuclear en el sitio 5'-AGGTCA-3' precedido por una secuencia corta rica en AT, y actúa como regulador del desarrollo embrionario, la diferenciación celular, la inmunidad, el ritmo circadiano, así como de lípidos, esteroides, xenobióticos y metabolismo de la glucosa.

Considerado por tener actividad transcripcional intrínseca, tener algunos ligandos naturales como oxiesteros que actúan como agonistas (25-hidroxicolesterol) o agonistas inversos (7-esteros oxigenados), potenciando o reprimiendo la actividad transcripcional, respectivamente, de modo que el 7-dehidro-colesterol, un esteroide de compuestos oxigenados a uno de sus anillos estructurales, puede, en teoría, tener actividad agonista en los receptores A huérfano (Rora) [5-14]. Además, el receptor huérfano β ; se requiere para el desarrollo postnatal normal de las células fotorreceptoras de bastón y cono; y también regula la transcripción de OPN1SW en células fotorreceptoras de cono mediante la unión de la secuencia 5'-AGGTCA-3' en el promotor OPN1SW. Del mismo modo, se considera que tiene actividad transcripcional intrínseca, tiene algunos ligandos naturales tales como todos los ácidos grasos retinoicos (ATRA) y otros retinoides que actúan como agonistas inversos reprimiendo la actividad transcripcional (por similitud).

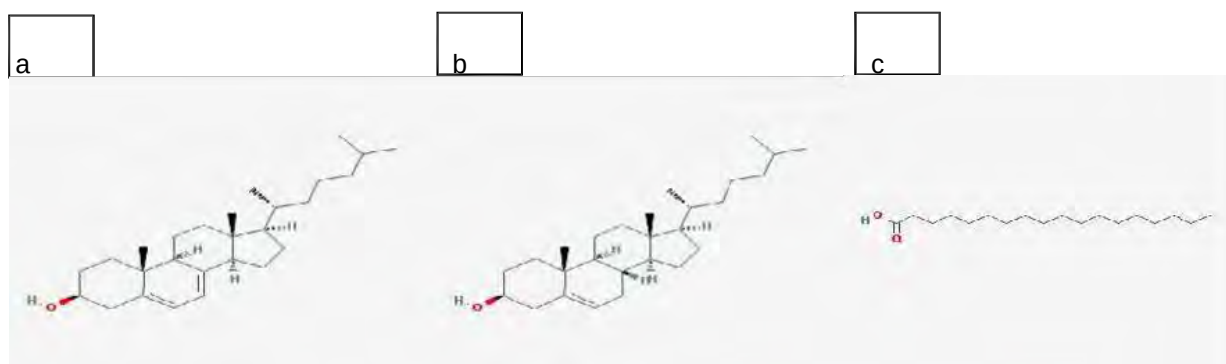


Figura 1. Moléculas orgánicas que actúan como ligandos. a) 7-dehidro-colesterol o provitamina D3, Fórmula Molecular: $C_{27}H_{44}O$ Peso molecular: 384.63766. b) El colesterol, Fórmula Molecular: $C_{27}H_{46}O$ Peso molecular: 386.65354. c) El ácido esteárico o ácido esteárico, Fórmula molecular: $C_{18}H_{36}O_2$ Peso molecular: 284.47724. Datos extraídos de PubChem

El Dominio de Unión al Ligando de Rora (DUL) muestra 63% y 58% de homología con los de Ror β y Ror γ , respectivamente, pero sólo 24% -25% con el DUL de otros receptores nucleares tales como T3Rb, VDR, y RAR. La estructura del DUL en Ror β expresada en *Escherichia coli* se resolvió recientemente con un ligando fortuito identificado como ácido esteárico [15]. Sin embargo, el ácido esteárico se considera que es un pseudo-ligando, ya que no provocó ninguna actividad transcripcional intrínseca adicional de Ror β , solo cubrió parcialmente el DUL de Ror β , y aprobó múltiples conformaciones de baja energía.

La actividad estrogénica de 7dehidrocolesterol y sus propiedades estructurales y químicas únicas, en comparación con el colesterol y el ácido esteárico, nos motivó para construir modelos 3D de Rora y Ror β humanos unido a 7dehidrocolesterol por comparación con las estructuras cristalográficas del colesterol y el ácido esteárico en ambos Rors. En la consecución de este objetivo se investigó algunos modos posibles para la unión de 7dehidrocolesterol en Rora y Ror β (Fig. 2). Una o varias poses de 7dehidrocolesterol pueden ser favorecidos en Rora y Ror β . Por otra parte, puede haber diferencias en las posturas favorecidas para 7dehidrocolesterol en Rora y Ror β , como se ha encontrado en otros productos químicos [16].

Para investigar estas posibilidades, hemos utilizado Chimera [17] para acoplar 7-dehidro-colesterol en Rora y Ror β . Estos análisis encontraron una pose favorita similar para 7- dehidro-colesterol en Rora y Ror β . Encontramos que a pesar de las diferencias estructurales entre colesterol y el ácido esteárico con 7-dehidro-colesterol, la flexibilidad en Rora y Ror β permite cambios conformacionales que estabilizan el 7-dehidro-colesterol en el bolsillo de unión de esteroides.

En contraste, una búsqueda realizada en STRING determina la existencia de evidencia marcada entre las interacciones independientes de Rora y Ror β ; por lo tanto, la relación de Rora y Ror β se reveló en las vías patológicas importantes como el ritmo circadiano y el cáncer, que conecta directamente el modo de acción del 7-dehidro-colesterol para revertir estas patologías y estimar así el 7-dehidro-colesterol como ingrediente activo en la construcción de cualquier fármaco que tiene un sitio diana de acción sobre los procesos biológicos a una disminución en el crecimiento de células de melanoma, y un efecto sinérgico sobre la homeostasis del ritmo circadiano, según los estudios científicos revisados.

Independientemente de si este agente (7-dehidro-colesterol) es ligando fisiológico, este estudio valida que la actividad de Rors puede ser modulada por ligandos (sintéticos) y, por lo tanto, apoya el concepto de que los Rors pueden ser dianas potenciales para la intervención farmacológica de procesos patológicos.

A partir de esta información analizada y dispuesta en bases de datos especializadas (UniProtKB, neXprot, GeneCards y Ensembl), se determinó que Rora y Ror β tienen la misma función asociada a su correspondiente ligando, sin embargo, el éxito de la función asociada depende de la posición óptima del ligando en el bolsillo que forma el sitio de unión al ligando del receptor, por lo que el propósito del presente estudio fue determinar la posición correcta de 7dehidrocolesterol en Rora y Ror β y contribuir así al desarrollo de fármacos terapéuticos relacionados con procesos biológicos que dependen de la actividad transcripcional de estos dos receptores nucleares huérfanos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Alineamiento múltiple por ClustalW y TCoFee

A partir la secuencia de cada receptor problema en formato FASTA, un alineamiento múltiple de las secuencias de ambos para Homo sapiens, por lo que los resultados discretos se obtuvieron con un valor estadístico cercano a 1 y el 100% de identidad . Estos fueron comparados con los resultados de UNIPROT para fiabilidad de los datos mayores. Los resultados obtenidos se muestran en más detalle en el material suplementario.

Acoplamiento molecular

Swiss Dock fue utilizado para crear un archivo del 7-dehidro-colesterol en el formato de Banco de Datos de Proteínas [PDB] para acoplar con View Dock en Chimera [18] dentro de las estructuras cristalográficas de Rora [AP: 1n83] [19] y Ror β [PDB: 1K4W] humanas [20]. Para el acoplamiento, la red se centró en el sitio de unión de estrógenos en Rora y Ror β . El sitio web Swiss Dock está disponible en línea en <http://www.swissdock.ch>. Se realizaron gráficos y análisis moleculares con el paquete de UCSF Chimera.

Los parámetros utilizados para el acoplamiento molecular de cada receptor problema fueron puntuación de Energía, Encuadre Estructural y uniones-H. Sin embargo, la puntuación de Energía fue el más decisivo. La superficie de unión al sitio del ligando se calculó utilizando la opción 'Anclaje' de las herramientas en Chimera.

Proyección de las interacciones proteína-proteína

STRING 9, 1 fue utilizado para perfilar los aspectos metabólicos que están implicados Rora y Ror β según una búsqueda detallada de los procesos biológicos, funciones moleculares y componentes celulares; coincidentemente, haciendo hincapié en las interacciones iterativas con la urgencia de establecer un vínculo socio aún no claro de los aspectos metabólicos, patologías encontradas con predicciones en la literatura revisada, o incluso algunas aún no reportadas. Toda la metodología seguida en este artículo se hace completamente especificada y como se muestra en Figura 2.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Acoplamiento molecular de 7-dehidro-cholesterol en Rora

El recurso View Dock de Chimera estimó 261 enlaces de hidrógeno que se encuentran, incluyendo uniones intra-moleculares de H y uniones de residuos internos de H,

sin embargo, sólo 19 fueron considerados viables por las uniones de H. Junto con la puntuación de Energía y el Encuadre Estructural el modelo que mejor se ajustó a los criterios de selección fue el modelo N ° 1.26. Los parámetros de acoplamiento de Rora se aprecian con detalle en el material suplementario.

Los residuos a los que se adhirieron la proteína fueron de mayor y baja afinidad, muy probablemente fue causa de la fuerza iónica presente en este tipo de atracción entre cada átomo, de manera que las fuerzas iónicas generaron más trabajo arduo o de entrada de energía para formar una unión del bolsillo (estructura de encaje) al ligando y por lo tanto, la atracción electrostática para 7-hydroxicholesterol a Rora fueron los formados por los átomos de carbono 1 y aquellos entre el carbono 16 a 20.

Con relación a los átomos implicados en la interacción fueron los cercanos a esta, que promovieron el empalme o acoplamiento completo del ligando dentro del sitio de unión de ligando de residuos de ligando; esto indica que el bolsillo se cierra por completo. Interesante forma como se ve en la Figura 1 ya que la superficie de unión a su vez actúa como una especie de vesícula "intra polimérica", haciendo referencia de alguna manera al ligando; que puede ser debido a una conformación activa de la proteína, es decir, otras regiones en la superficie proporcionaron un sitio de unión para diferentes ligandos, que podrían haber regulado la actividad de regulación de la proteína. Asimismo, aunque los átomos situados en el interior del contacto no- directo con el ligando de proteína, esto proporciona un marco esencial que da el contorno de la superficie y sus propiedades químicas.

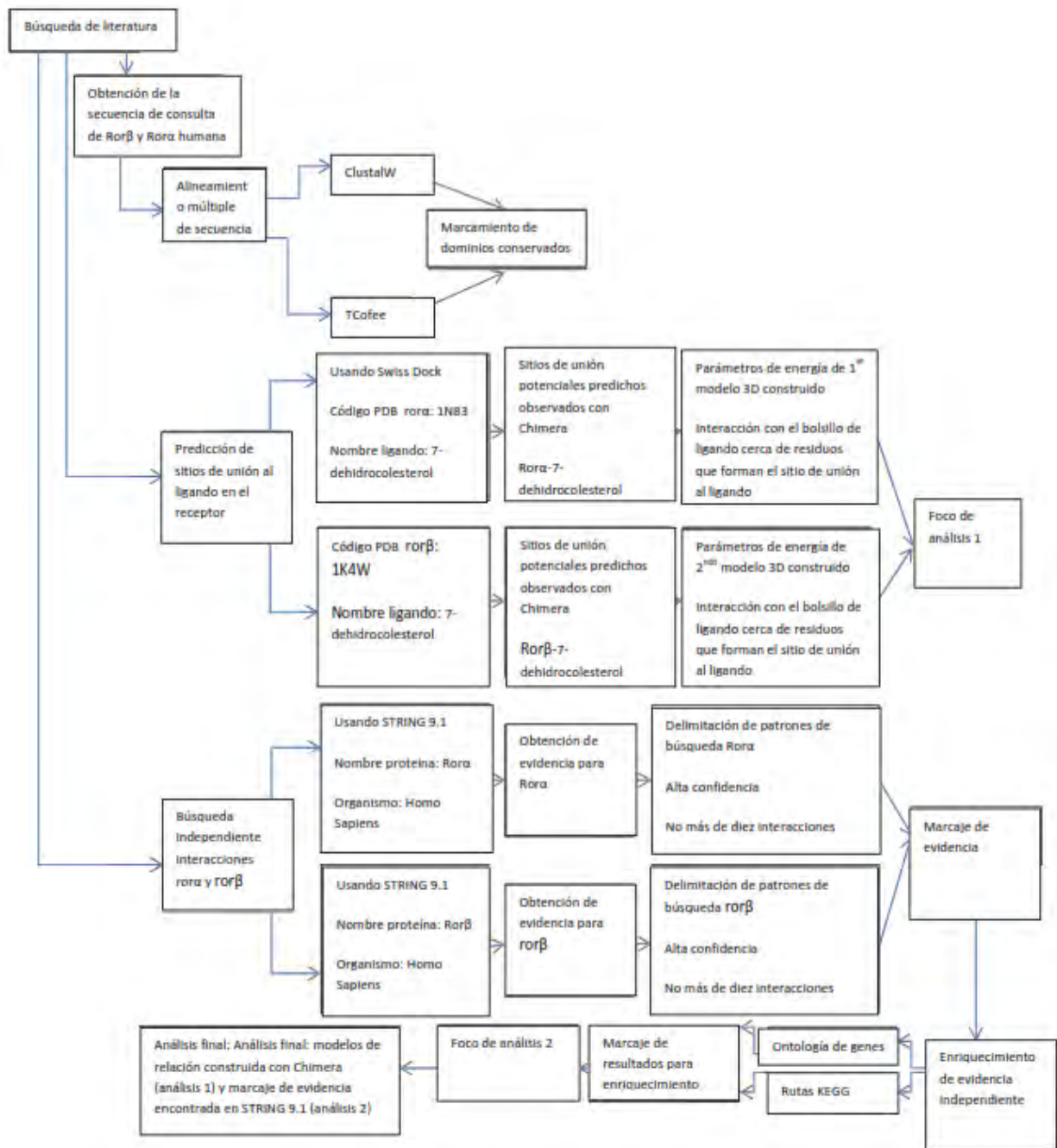


Figura 2. Diagrama de los métodos utilizados por los recursos bioinformáticas. Su esencia implica que las pruebas de análisis estén descritas de la mejor forma posible.

Acoplamiento molecular de 7-dehidro-cholesterol en Ror β

El recurso View Dock de Chimera estimó 277 enlaces de hidrógeno que se encuentran, incluyendo uniones intra moleculares de H y uniones de residuos internos de H, sin embargo, sólo 36 fueron considerados viables por las uniones de H. Junto con la puntuación de Energía y el Encuadre Estructural, el modelo que mejor se ajustó a los criterios de selección fue el modelo N ° 1.65. Los parámetros de acoplamiento de Ror β se aprecian con detalle en el material suplementario.

Los residuos a los que se adhirieron la proteína fueron de mayor y baja afinidad, muy probablemente fue causa de la fuerza iónica presente en este tipo de atracción entre cada átomo, de manera que las fuerzas iónicas generaron más trabajo arduo o el suministro de energía para formar una unión del bolsillo (estructura de encaje) al ligando y por lo tanto, la atracción electrostática para 7-hydroxicholesterol a Rora fueron los formados por los átomos de carbono 1 y aquellos entre el carbono 11 a 24.

Curiosamente, hay 6 residuos de aminoácidos involucrados en el gasto de energía más alto, dos de ellos (TRP 239 y 235 HSD) se comportan como aminoácidos cargados positivamente, dos (312 y 399 ASN ASN) se comportan como polares sin carga, y otros dos (Gly 353 y MET 231) con el comportamiento alifático no polar.

En la Figura 1 suplementaria el modelo 3D de la interacción del receptor Rora con su ligando natural (colesterol) se pone de relieve, mientras que la Figura 2 suplementaria expone el modelo 3D de la interacción del receptor Ror β con uno de sus ligandos propios. Los modelos 3D de 7 dehidrocolesterol en diferentes poses, indican que 7-hidroxicolesterol conserva muchos contactos clave al igual que el colesterol y el ácido esteárico con Rora y Ror β humana, respectivamente.

En general, la capacidad de ambas proteínas (Rora y Ror β humana) para unirse selectivamente y con alta afinidad más que en Rora que en Ror β humana fue debido a la formación de un grupo de enlaces no covalentes débiles, enlaces de hidrógeno, enlaces iónicos y las fuerzas de van de Waals acopladas con interacciones hidrófobas favorables. La mayoría de las uniones son débiles, de modo que cada interacción efectiva es requerida para establecer simultáneamente muchos enlaces débiles. Esto fue posible sólo en la medida en que el contorno de la superficie de la molécula de ligando con alta precisión se ajustó a cada receptor.

Proyección de las interacciones proteína-proteína

STRING 9, 1 fue utilizado para perfilar los aspectos metabólicos que están implicados Rora y Ror β según una búsqueda detallada de los procesos biológicos, funciones moleculares y componentes celulares; coincidentemente, haciendo hincapié en las interacciones iterativas con la urgencia de establecer un vínculo socio aún no claro de los aspectos metabólicos, patologías encontradas con predicciones en la literatura revisada, o incluso algunas aún no reportadas. Los datos obtenidos de STRING se observan con más detalle en el registro suplementario, pero los datos que sirvieron de pruebas para comparar los resultados obtenidos con estudios recientes, se presentan a través de la Tabla 1.

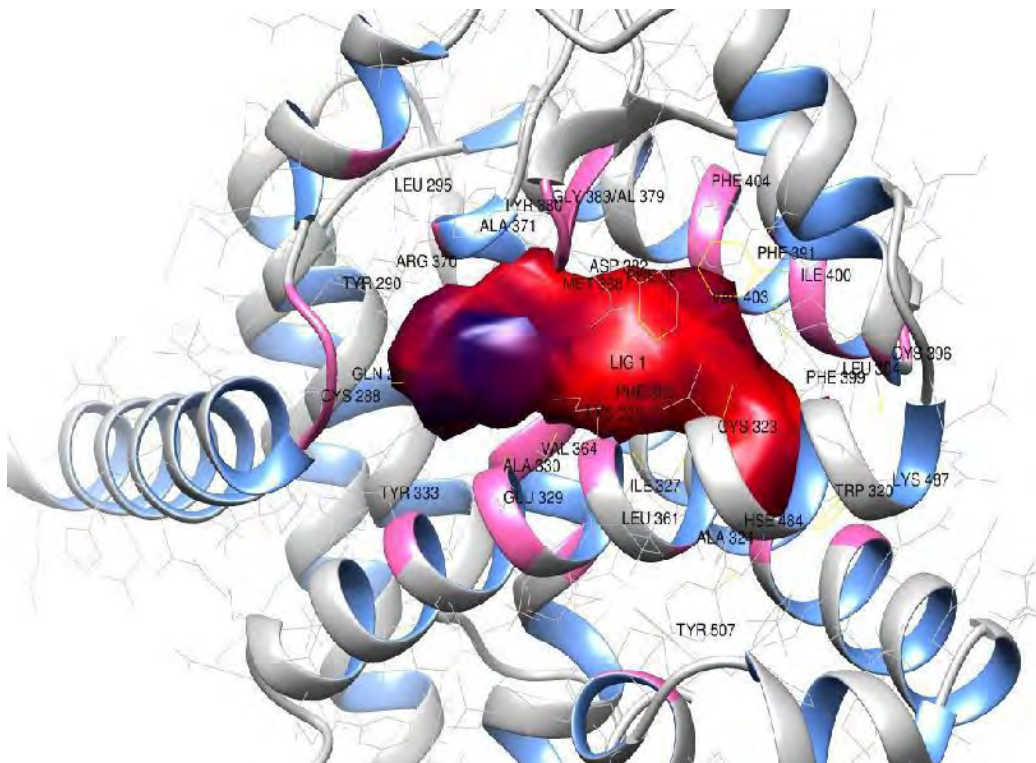


Figura 1. Modelo 3D del sitio de unión al ligando para Rora a 7 - dehidrocolesterol. El bolsillo del sitio de unión de ligando se colorea por hidrofobicidad, con un valor de -10 kcal / (mol * e) a la zona roja y 10 kcal / (mol * e) para la zona azul. Las etiquetas de residuos están marcadas en negro y marcadas con color verde claro. La cinta de hélice interior es de color azul, mientras que las etiquetas de los átomos son de color rosa. 16 a 20 átomos de carbono y el número de carbonos 1 del ligando tienen un mayor grado de interacción con Phe 391, Phe 381, Phe 365, TRP 320, MET 368, CYS 323 residuos y menos medida con residuos distantes ILE327, GLN 289, VAL 364, 394 LEU, ILE 400, y GLU 329.

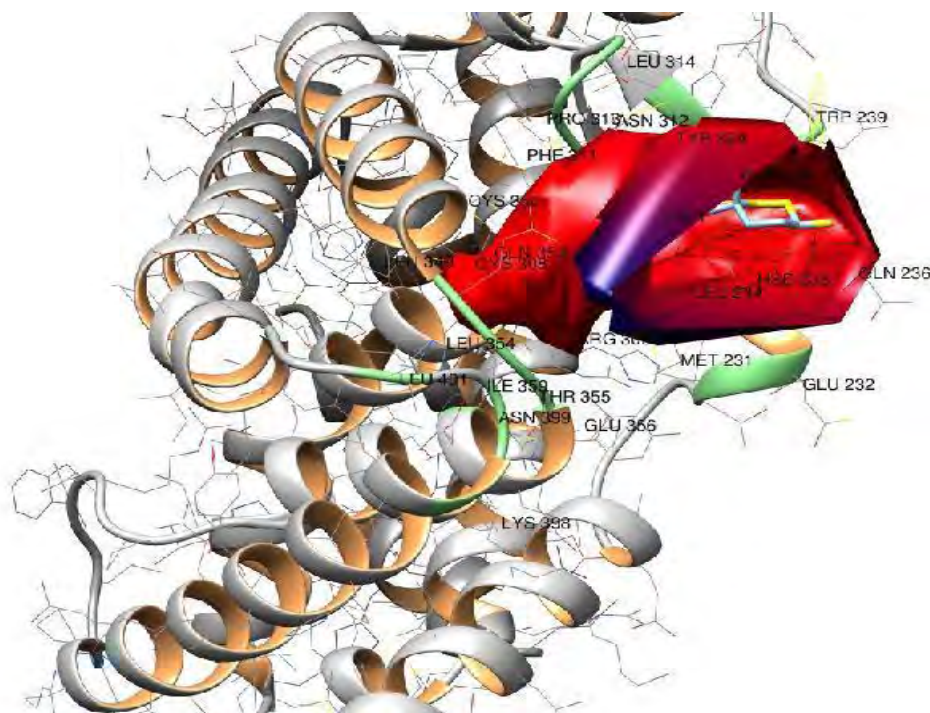


Figura 2. Modelo 3D del sitio de unión al ligando para Ror β a 7 - dehidrocolesterol. El bolsillo del sitio de unión se colorea por hidrofobicidad, con un valor de -10 kcal / (mol * e) a la zona roja y 10 kcal / (mol * e) para la zona azul. Las etiquetas de residuos están marcadas en negro y marcadas con color verde claro. La cinta de hélice interior es de color azul, mientras que las etiquetas de los átomos son de color rosa. Los átomos de carbono 11 a 24 del ligando tienen un alto grado de interacción con TRP 239, HSD 235, ASN 312, Gly 353 y un bajo grado de interacción con ASN 399, 231 MET.

Del mismo modo, en atención a la evidencia obtenida por ontología de genes y vías asociadas con la búsqueda independiente para la interacción en Rora y Ror β , revalidado mediante la demostración de estudios en los que se entiende que ROR α es comúnmente regulado y / o hipo activado en el cáncer de mama en comparación al tejido mamario normal, para resaltar los estudios que muestran que la expresión de ROR α suprime los fenotipos malignos en las células de cáncer de mama, in vitro e in vivo. Por otra parte, la actividad de ROR α se puede clasificar en las vías del receptor nuclear canónico y no canónico, que a su vez regulan diversas funciones celulares de cáncer de mama, incluyendo la proliferación celular, la apoptosis y la invasión.

Vías asociadas a ROR α y ROR β

Ritmo circadiano - mamífero

Vías asociadas con Cáncer

Tabla 1. Búsqueda de vías asociadas con Rora y Ror β , identificados por la característica de enriquecimiento en STRING.

Esta información sugiere que es un potente supresor de tumores y una posible diana terapéutica para el cáncer de mama [24]. De hecho, un estudio farmacocinético reciente indica que SR1078, un agonista sintético para los receptores nucleares huérfanos Rora y Ror γ , induce la expresión de dos genes diana ROR, glucosa-6-fosfatasa y FGF21 en ratones [25]. El tratamiento con SR1078 potencia la apoptosis de las células de cáncer de hígado en cultivo, lo que sugiere que el agonista puede ser un potente inhibidor de la progresión del cáncer [26]. Según estudios recientes, y en relación a haber encontrado la evidencia marcada, el 7-dehidro-colesterol tiene una participación directa significativa en las patologías asociadas a la homeostasis del ritmo circadiano y en los tumores cancerosos. De conformidad, todos los datos crecientes epidemiológicos apoyan el papel que la vitamina D (7-dehidroxicolesterol) podría desempeñar en el control del riesgo de muchas enfermedades crónicas, incluyendo los cánceres comunes, miopatía, enfermedad autoinmune, la diabetes y el síndrome metabólico, las infecciones y las enfermedades cardiovasculares [21-23].

Los receptores nucleares y receptores huérfanos de ácido retinoico (Rors; consistiendo en Rora, Ror β y Ror γ) están implicados en muchos procesos fisiológicos, incluyendo la regulación del metabolismo, el desarrollo y la inmunidad, así como el ritmo circadiano. La reciente caracterización de ligandos endógenos para estos receptores nucleares huérfanos ha estimulado el desarrollo de ligandos sintéticos y ha abierto la posibilidad de dirigirse a estos receptores para tratar varias enfermedades, incluyendo la diabetes, la aterosclerosis, la autoinmunidad y el cáncer [27]; esta es la razón por la que el 7-dehidro-colesterol se considera un candidato para convertirse en un ligando sintético de Rora y Ror β .

Sobre la base de estas observaciones en la literatura y dado el reciente progreso que caracteriza agonistas ROR α , nuevas investigaciones de actividades supresoras de tumores por ROR α en los cánceres de mama pueden conducir al descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas para esta enfermedad mortal.

CONCLUSIONES

Las múltiples alineaciones siempre dan una indicación sobre los elementos guardados entre dos secuencias diferentes, en este caso la herramienta se justifica por apreciación de la literatura, la marcada similitud entre el dominio de unión a ligando de Rora con Ror β así como otros motivos estructurales también altamente conservados. En general, los resultados obtenidos por ambos modelos construidos revalidan el comienzo y la información probada y sirven como evidencia para estudios adicionales, mas sin embargo es conveniente un refinamiento de cada modelo para apoyar la exploración de cada ligando del receptor.

Desde que Rora presentó casi el mismo número y tipo de residuos cerca del ligando en Ror β , lo que confirma la hipótesis de que el dominio de unión a ligando y los dos receptores, es altamente conservado, por lo que posiblemente el 7-hidroxicoolesterol así no haya demostrado una mayor interacción de afinidad con cada receptor , puede servir como base para la construcción de ligandos sintéticos a modo de marcador biológico, esto indica que, independientemente de los resultados, cada modelo mostró evidencia construida con alta significancia biológica. Las pocas interacciones por enlaces de hidrógeno mostraron baja afinidad por el 7- dehidro-colesterol en ambos receptores, sin embargo, cada modelo construido se estimó bajo los parámetros de afinidad altamente probables con la energía de empalme más negativa, siendo éste el más viable. Del mismo modo, las fuerzas de Van der Waals que pudieron actuar no se consideraron adecuadas, ya que un número suficiente de las interacciones entre las moléculas de agua no se expusieron, ni entre los residuos como se esperaba.

En última instancia, el 7- dehidrocolesterol se convierte en una opción viable para futuros estudios relacionados con la implicación de este en el cáncer y el ciclo circadiano, de acuerdo a la información extraída de STRING estas dos patologías están asociadas a los receptores Rora y Ror β y en adición como lo mencionan algunas investigaciones sobre el 7- dehidrocolesterol están asociados con melanomas. Así, se encontró una relación directa del 7- dehidro-colesterol con el cáncer y el ritmo circadiano en este estudio, mediante la construcción de modelos 3D y, a continuación, filiación de los datos filtrados por STRING, donde una parte de la relación de ambos receptores está marcada con las proteínas NR1D2 y NR1D1 envueltas en la participación de los procesos biológicos, funciones moleculares, dominios asociados y en especial la prueba más importante, la asociación con las vías patológicas destacadas.

En comparación con los ligandos naturales de Rora y (colesterol y ácido esteárico, respectivamente) 7- dehidrocolesterol mostró una afinidad interesante, esto significa que este ligando también actúa como un agonista en función de la actividad transcripcional,

puede estar muy involucrado y probablemente dependiente de ligando celular. Uniéndose el 7-dehidro-colesterol con Rora proporciona un espectro de sitios de unión predichos en la que el valor total de la energía contribuye a la correlación evidenciada con otras fuerzas iónicas a una mejor cobertura conjunta y llena del ligando. En resumen, esto indica que el 7- dehidro-colesterol puede ser la sustitución de la forma sintética del ligando natural (colesterol), actuando como posibles vías farmacológicas para la mejora terapéutica de los trastornos asociados con el ciclo circadiano y el cáncer. Mientras que una característica más común en el acoplamiento de Ror β , que no desmerece, por el contrario, sirve como un modelo para el modelado posterior a favor de tratar de encontrar un sitio de unión quizás lo más favorable; sin su modelo de evidencia corroborado por alineaciones en lo evidenciado en el dominio de unión del ligando implicado en la formación del bolsillo receptor y por lo tanto de todo el acoplamiento.

APÉNDICE A. MATERIAL SUPLEMENTARIO

Los datos complementarios se muestran en la carpeta adjunto a este artículo.

AGRADECIMIENTOS

Especialmente apreciar el consejo de Janneth González (janneth.gonzalez@gmail.com) y George Barreto (gesbarreto@gmail.com) del grupo de Bioinformática y Biología Computacional de la Pontificia Universidad Javeriana.

CONFLICTOS DE INTERÉS

Los autores no tienen ningún conflicto de intereses.

BIBLIOGRAFIA

1. Holick, M.F. (2003) Vitamin D: a millennium perspective. J. Cell Biochem. 88, 296–307.
2. Kamradt, J., Rafi, L., Mitschele, T., Meineke, V., Gartner, B.C., Wolfgang, T., Holick, M.F. & Reichrath, J. (2003) Analysis of the vitamin D system in cutaneous malignancies. Recent Results Cancer Res. 164, 259–269.
3. Holick, M.F. (2003) Evolution and function of vitamin D. Recent Results Cancer Res. 164, 3–28.

4. FTian, X.Q. & Holick, M.F. (1999) A liposomal model that mimics the cutaneous production of vitamin D3. Studies of the mechanism of the membrane-enhanced thermal isomerization of previtamin D3 to vitamin D3. J. Biol. Chem. 274, 4174–4179.
5. "Isoform-specific amino-terminal domains dictate DNA-binding properties of ROR alpha, a novel family of orphan hormone nuclear receptors." Giguere V., Tini M., Flock G., Ong E., Evans R.M., Otulakowski G. Genes Dev. 8:538-553(1994) [PubMed] [Europe PMC] [Abstract] Cited for: NUCLEOTIDE SEQUENCE [MRNA] (ISOFORMS 1; 2 AND 3), FUNCTION AS TRANSCRIPTION ACTIVATOR, DNA-BINDING, SUBUNIT. Tissue: Retina and Testis.
6. "Identification of nuclear receptor mRNAs by RT-PCR amplification of conserved zinc-finger motif sequences." Becker-Andre M., Andre E., Delamarter J.F. Biochem. Biophys. Res. Commun. 194:1371-1379(1993) [PubMed] [Europe PMC] [Abstract] Cited for: NUCLEOTIDE SEQUENCE [MRNA] (ISOFORM 4), TISSUE SPECIFICITY. Tissue: Umbilical vein endothelial cell.
7. "Isolation of cDNA coding for multiple human nuclear receptor clones." Kaighin V.A., Martin A.L., Aronstam R.S. Submitted (DEC-2010) to the EMBL/GenBank/DBJ databases Cited for: NUCLEOTIDE SEQUENCE [MRNA] (ISOFORM 4). Tissue: Kidney.
8. "Analysis of the DNA sequence and duplication history of human chromosome 15." Zody M.C., Garber M., Sharpe T., Young S.K., Rowen L., O'Neill K., Whittaker C.A., Kamal M., Chang J.L., Cuomo C.A., Dewar K., FitzGerald M.G., Kodira C.D., Madan A., Qin S., Yang X., Abbasi N., Abouelleil A. Nusbaum C. Nature 440:671-675(2006) [PubMed] [Europe PMC] [Abstract] Cited for: NUCLEOTIDE SEQUENCE [LARGE SCALE GENOMIC DNA].
9. Mural R.J., Istrail S., Sutton G., Florea L., Halpern A.L., Mobarry C.M., Lippert R., Walenz B., Shatkay H., Dew I., Miller J.R., Flanigan M.J., Edwards N.J., Bolanos R., Fasulo D., Halldorsson B.V., Hannenhalli S., Turner R. Venter J.C. Submitted (JUL-2005) to the EMBL/GenBank/DBJ databases Cited for: NUCLEOTIDE SEQUENCE [LARGE SCALE GENOMIC DNA].
10. "The status, quality, and expansion of the NIH full-length cDNA project: the Mammalian Gene Collection (MGC)." Team The MGC Project Genome Res. 14:2121-2127(2004) [PubMed] [Europe PMC] [Abstract] Cited for: NUCLEOTIDE SEQUENCE [LARGE SCALE MRNA] (ISOFORMS 1 AND 4). Tissue: Muscle.
11. "Transcriptional activation and repression by Rora, an orphan nuclear receptor required for cerebellar development." Harding H.P., Atkins G.B., Jaffe A.B., Seo

- W.J., Lazar M.A. Mol. Endocrinol. 11:1737-1746(1997) [PubMed] [Europe PMC] [Abstract] Cited for: FUNCTION AS TRANSCRIPTION ACTIVATOR, INTERACTION WITH NCOR1, DNA-BINDING, SUBUNIT.
12. "Coactivators for the orphan nuclear receptor Rora." Atkins G.B., Hu X., Guenther M.G., Rachez C., Freedman L.P., Lazar M.A. Mol. Endocrinol. 13:1550-1557(1999) [PubMed] [Europe PMC] [Abstract] Cited for: FUNCTION AS TRANSCRIPTION ACTIVATOR, INTERACTION WITH MED1 AND NCOA2, MUTAGENESIS OF VAL-335 AND 510-LEU-PHE-511.
 13. "Exogenous expression of a dominant negative Roralpha1 vector in muscle cells impairs differentiation: Roralpha1 directly interacts with p300 and myoD." Lau P., Bailey P., Dowhan D.H., Muscat G.E. Nucleic Acids Res. 27:411-420(1999) [PubMed] [Europe PMC] [Abstract] Cited for: FUNCTION IN MYOGENESIS, INTERACTION WITH EP300.
 14. "Identification of a novel peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma promoter in man and transactivation by the nuclear receptor Roralpha1." Sundvold H., Lien S. Biochem. Biophys. Res. Commun. 287:383-390(2001) [PubMed] [Europe PMC] [Abstract] Cited for: FUNCTION AS TRANSCRIPTION ACTIVATOR, DNA-BINDING.
 15. Stehlin, C., Wurtz, J.-M., Steinmetz, A., Greiner, E., Schu"le, R., Moras, D., and Renaud, J.-P. (2001). X-ray structure of the orphan receptor ROR ligand-binding domain in the active conformation. EMBO J. 20, 5822-5831.
 16. J.A.Kallen et al. (2002). X-ray structure of the Rora LBD at 1.63 Å: structural and functional data that cholesterol or a cholesterol derivative is the natural ligand of Rora. *Structure*, 10, 1697-1707
 17. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE. *J Comput Chem*. 2004 Oct; 25(13):1605-12.
 18. SwissDock, a protein-small molecule docking web service based on EADock DSS Nucleic Acids Res. Jul 1, 2011;39 (Web Server issue): W270-W277.
 19. X-ray Structure of ROR (alpha) LBD at 1.63Å: Structural and Functional data that Cholesterol or a Cholesterol derivative is the natural ligand of ROR (alpha) (2002) *Structure* 10: 1697-1702
 20. X-ray structure of the orphan nuclear receptor Rorβ ligand-binding domain in the active conformation. (2001) EMBO J. 20: 5822-5831
 21. Bouillon R, Bischoff-Ferrari H, Willet W. Vitamin D and health: perspectives from mice to man. *J Bone Miner Res* 2008; 23(7): 974-9.

22. Norman AW. From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health. *Am J Clin Nutr* 2008; 88(suppl): 491S–9S.
23. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 2007; 357(3): 266–81.
24. Xu, J. D. (2012). ROR α , a Potential Tumor Suppressor and Therapeutic Target of Breast Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 15755-15766.
25. Wang, Y.; Kumar, N.; Nuhant, P.; Cameron, M.D.; Istrate, M.A.; Roush, W.R.; Griffin, P.R.; Burris, T.P. Identification of SR1078, a synthetic agonist for the orphan nuclear receptors Rora and ROR gamma. *ACS Chem. Biol.* 2010, 5, 1029–1034.
26. Wang, Y.; Solt, L.A.; Kojetin, D.J.; Burris, T.P. Regulation of p53 stability and apoptosis by a ROR agonist. *PLoS One* 2012, 7, e3492.
27. Kojetin, D. J. (2014). REV-ERB and ROR nuclear receptors as drug targets. *Nature Reviews Drug Discovery*, 197-216.